

8. DISCUSIONES

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

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

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

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

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

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

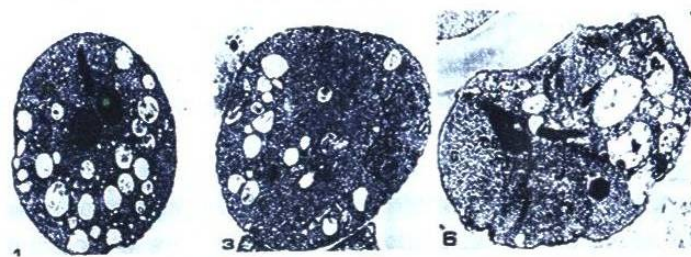


Figura 45. Morfología diversa de quistes de *E. histolytica*. Imágenes reportada por Proctor y Gregory, que muestra que los quistes de *E. histolytica* obtenidos *in vivo* no siempre son esféricos, tal como se les describe en la literatura

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

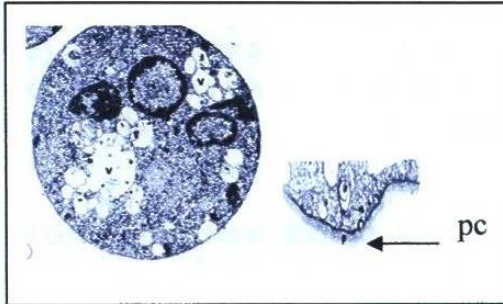


Figura 46. Quiste y pared celular de *E. histolytica*. Imagen reportada por Chávez, 1978.

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

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

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

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

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

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

Existen una serie de trabajos que sustentan la idea de que los cuerpos cromatoides o hélices de ribonucleoproteínas no son solamente un evento sin significado biológico, sino más bien un mecanismo estratégico de acumulación de ribosomas previo a, o asociado a un inminente enquistamiento, para su posterior utilización en una rápida proliferación celular en el subsiguiente proceso de desenquistamiento, aunque este proceso pueda también ser artificialmente inducido por inhibición de la síntesis de proteínas. Esto último es explicable por la aparente capacidad innata de agregación de los ribosomas no asociados a polisomas.

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

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

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

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

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

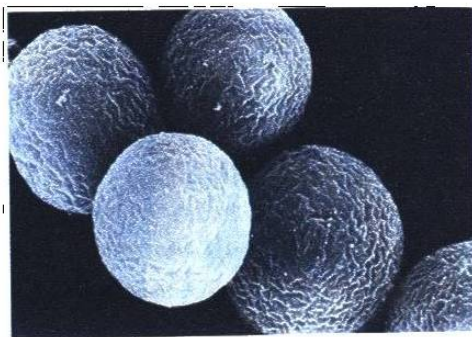


Figura 47. Quistes de *E. histolytica*. Quistes obtenidos de pacientes con amibiasis, imagen reportada por Martínez, 1987.

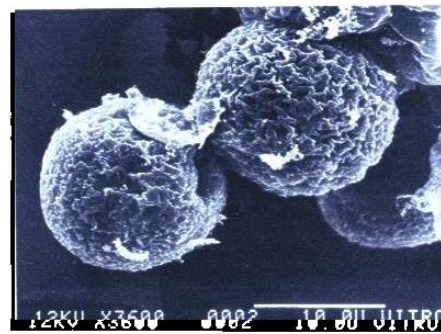


Figura 48. Quistes de *E. invadens*. Quistes obtenidos *in vitro* y reportados por Morales, 1989.

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

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

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

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

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

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

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

9. CONCLUSIONES

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

10. PERSPECTIVAS

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

11. LITERATURA CITADA

- Acevedo Garibay, M.A., 1993. Niveles de RNA en trofozoítos de *Entamoeba invadens* cepa IP-1 crecidos axenicamente con tensión normal y alta tensión de CO₂ en medio TYI-S-33 sin vitaminas. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL, Monterrey, N.L.
- Algranati, D.I., Serra M. P., Carrillo C. y González. N., 2006. Modulation of oat arginine decarboxylase gene expression and genome organization in transgenic *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Federation of Biochemical Societies Journal* **273**:628-637.
- Arroyo-Begovich, A., Carabéz-Trejo A., Ruíz-Herrera, J., 1980. Identification of the structural components in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. *Journal of Parasitology* **66**:735-741.
- Arroyo-Begovich, A., Carabéz-Trejo A., 1982. Location of chitin in the wall of *Entamoeba invadens* with colloidal gold tracers. *Journal of Parasitology* **68**:253-258.
- Avron B, Stolarsky T., Chaayen A, Mirelman D., 1986. Encystation of *E. invadens* IP-1 is induced by lowering the osmotic pressure and depletion of nutrients from the medium. *Journal of Protozoology* **33**:522-525.
- Avron, B., R. M. Deutsch, and D. Mirelman. 1982. Chitin synthesis inhibitors prevent cyst formation by trophozoites. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **108**:815-821.
- Balamuth, W., 1946. Improved egg yolk medium for cultivation of *Entamoeba histolytica* and other intestinal protozoa. *American Journal of Clinical Pathology* **16**:380-384.
- Barker, D.C. y Deutsch, K., 1958. The chromatoid body of *Entamoeba invadens*. *Experimental Cell Research* **15**:604-639.
- Barrón-González, M.P., Villarreal-Treviño, L., Verduzco-Martínez, J.A., Mata-Cárdenas B.D., y Morales-Vallarta M.R., 2005. *Entamoeba invadens*: *In vitro* axenic encystation with a serum substitute. *Experimental Parasitology* **110**:318-321.

- Batchricki-García, S. 1989. The biochemical cytology of chitin and chitosan synthesis in fungi. In *Chitin and Chitosan*. Ed. By Skjak-Brack G., Anthousen T. And Sadford P. London; Elsevier Applied Science, pp.23-36.
- Boeck, W.C. and Drbohlav, J., 1925. The cultivation of *Endamoeba histolytica*. *American Journal of Hygiene* **5**:371-407.
- Boucher, S.E. y Guillin F.D., 1990. Excystation of *in vitro*-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infection and Immunity* **58**:3516-3522.
- Bray, R.S. 1996. Amoebiasis, The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases. The Wellcome Trust, London, United Kingdom. In F.E.C.Cox (ed), pp. 170-177.
- Burk R.R., 1968. Reduced adenyl ciclase activity in a polyoma virus transformed cell line. *Nature* **219**:1272-1275.
- Byers, T.J. 1986. Molecular biology of DNA in *Acanthamoeba*, *amoeba*, *Entamoeba* and *Naegleria*. *International Journal of Cytology* **99**:311-341.
- Caballero-Salcedo, A., M. Viveros-Rogel, B. Salvatierra, R. Tapia-Conyer, J. Sepúlveda-Amor, G. Gutiérrez, and L. Ortiz-Ortiz. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **50**:412-419.
- Calzado-Flores C., Verde-Star J., Morales-Vallarta M., Segura-Luna J.J., 2007. Inhibición del proceso de enquistamiento de *E. invadens* por *Castela texana*. *Revista Ciencia UANL* **10**:44-48.
- Campos-Góngora E, Ebert F, Willhoeft U, Said-Fernández S, Tannich E. 2004. Characterization of chitin synthases from *Entamoeba*. *Protist* **155**:323-330.
- Carliss J.O., Gojides M, Hall R.D., Kudo R.R., Levine N.D., Loeblich A.R., Jr Weiser J. and Wenrich D.H. 1969. A revised classification the phyllus protozoa. *Journal of Protozoology* **12**:11-17.
- Cervantes-Mamoa A. y Martínez-Palomo, A., 1980. Estudio del ciclo vital de *Entamoeba invadens* mediante cinematografía espaciada. *Archivos de Investestigación Médica (México)* **11**:31-40.
- Chang S. L., 1946. Studies in *Entamoeba histolytica* IV. The relation of oxidation reduction potentials to the growth, encystations and excistations of *Entamoeba histolytica* in culture. *Journal of Parasitology* **37**:101-112.

- Chávez-Munguía B., Martínez Palomo A., De la Torre M., 1978. Estructura ultramicroscópica de la pared de quistes de *Entamoeba invadens*, *E. histolytica* y *E. coli*. *Archivos de Investigación Médica* **9**:113-116.
- Chávez-Munguía B., Cristóbal-Ramos AR., González-Robles A., Tsutsumi V., and Martínez-Palomo A., 2003. Ultrastructural study of *Entamoeba invadens* encystation and excystation. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* **35**:235-243.
- Chávez-Munguía B., Hernández-Ramírez V., Angel A., Rios A., Talamas-Rohana P., González-Robles A., González-Lazaro M., Martínez-Palomo A., 2004. *Entamoeba histolytica*: ultrastructure of trophozoites recovered from experimental liver lesions. *Experimental Parasitology* **107**:39-46.
- Chinn B., Jacobs L., Reardon L. and Rees C., 1942. The influence of the bacterial flora on the cultivation of *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **22**:137-146.
- Clark, C.G., Espinosa Cantellano, M. and Bhattacharya, A. 2000 *Entamoeba histolytica*: an overview of the biology of the organism. in: Amebiasis (Ravdin J.I., ed.) Imperial College Press, London, pp. 1-45.
- Clark, C.G., and L.S. Diamond. 2002. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clinical Microbiology Reviews* **15**:329-341.
- Cleveland, L.R. and Sanders, E.P., 1930. The production of bacteria-free amoebic abscesses in the liver of cats and observations on the amoebae in various media with and without bacteria. *Science* **77**:149-151.
- Councilman, W. T., and H. A. Lafleur., 1891. Amebic dysentery. *Johns Hopkins Hospital Reports* **2**:395-548.
- Crosby, A. W., 1986. *Ecological imperialism : the biological expansion of Europe, 900-1900*. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom.
- Das S.R., Rastogi, A.K., Sagar P., y Singh, M.P., 1980. Axenic encystation of *Entamoeba invadens*. *Indian Journal of Experimental Biology* **18**:333-336.
- Das S.R. y Guillin F.D., 1991. Chitin synthase in encysting of *Entamoeba invadens*. *Biochemical Journal* **280**:641-647
- Diamond L.S., 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science* **134**:336-337.

- Diamond L.S., 1968. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amoeba. *Journal of Parasitology* **54**:1047-1056.
- Diamond L.S., Harlow D. y Cunnick C.C., 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**:431-432.
- Diamond L.S. y Cunnick C.C., 1991. A serum-free, partly defined medium, PDM-805, for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* schaudinn and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**:431-432.
- Diamond, L.S. y Clark, C.G., 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *Journal of Eukariotic Microbiology* **40**:340-344.
- Dobell, C. y Laidlaw, P.P., 1926. On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other entozoic amoebae. *Parasitology* **18**:238-318.
- Dobell C., 1928. Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. I. General Introduction. II. Description of the whole life-history of *Entamoeba histolytica* in culture. *Parasitology* **20**:357-412.
- Dobell C., 1932. Antony van Leeuwenhoek and his "little animals". John Bale Sons and Danielsson, London, United Kingdom, pp.224-225.
- Fahey, R.C., Newton G.L., Arrick B., Overdank-Bogart, T. Y Aley S.B., 1984. *Entamoeba histolytica*: a eukariote without glutathione metabolism, *Science* **224**:70-72.
- Feria-Velasco A. and Tapia-Arizmendi G., 1977. Qualitative X-ray spectrometric study of *E. histolytica* trophozoite nuclei. *Archives of Medical Research* **8**:199-208.
- Frye, W.W. y Melenay, H.E., 1939. Liver extract as a substitute for serum in the culture medium for *Entamoeba histolytica*. *Science* **89**:564-565.
- Garibay de Hoyos, C.A., 1991. Niveles de RNA en trofozoítos de *Entamoeba invadens* IP-1 crecidos axenicamente en medio TP-S-1 con tensión normal y alta tensión de CO₂. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Monterrey, N.L.
- Garcia. L.S., and D.A. Bruckner. 1997. *Diagnostic medical parasitology*, 3rd ed. ASM Press.

- Gerisch, G., 1987. Cycline AMP and other signals controlling cell development and differentiation in *Dictyostelium*. *Annual Review of Biochemistry* **56**:853-879.
- González A.R., Haque R., Rehman T., 1992. A monoclonal antibody for distinction of invasive and noninvasive clinical isolates of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology* **30**:2807-2813.
- González J., Guangxing B., Frevert U., Corey, E. J. y Eichinger D., 1999. Proteasome-dependent cyst formation and stage-specific ubiquitin mRNA accumulation in *Entamoeba invadens*. *European Journal of Biochemistry* **264**:897-904.
- Gutiérrez G. y Muñoz O., 1994. Epidemiología de la amibiasis. Ed. Kretschmer R. Amibiasis, Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas.
- Horsch M., Mayer C, and Rast D.M., 1996. Stereochemical requirements of chitin synthase for ligand binding at the allosteric site for N-acetylglucosamine *European Journal of Biochemistry* **237**:476-482.
- Horst M.N., 2005. The biosynthesis of crustacean chitin by a microsomal enzyme from brine shrimp. *Journal of Biological Chemistry* **10**:1412-1419.
- Imperato P.J. 1981. A historical overview of amebiasis. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* **57**:175-187.
- Ivey, M. 1980. Phylum Protozoa, *In* A. C. Sonnenwirth and L. Jarett (ed.), *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*. The C. V. Mosby Co., St. Louis, Mo, pp. 2081-2093.
- Jackson T, 2000. Epidemiology. En: Ravdin J.I., editor. *Amebosis*. Londres: Imperial College Press, pp.47-63.
- Kapoor O. P., 2006. Amoebic liver abscess. *Bombay Hospital Journal* **48**:4-6.
- Katz M., Despommier DD. and Gwadz RW. 1989. *Parasitic diseases*. Springer-Verlag, New York, N.Y., pp.129-135.
- Kartulis, S. 1886. Zur etiologie der dysenterie in Aegyptien. *Virchows Archives A: Pathological Anatomy and Histopathology* **105**:521-531.
- Kean, B.H., 1988. A history of amebiasis., *In* J. I. Ravdin (ed.), *Amebiasis: human infection bu Entamoeba histolytica*. John Wiley&Sons. Inc., New York, N.Y., pp.1-10.

- Kessel, J., Allison, D., Kaime, M., Quiros, M. y Gloeckner, A., 1944. The cysticidal effects of chlorine and ozone on cysts of *Entamoeba histolytica*, together with a comparative study of several encystment media. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **24**:177-183.
- Kusamram, T., Sobhon, P., Bailey, G.B., 1975. The mechanism of formation of inhibitor induced ribosome helices in *Entamoeba invadens*. *The Journal of Cell Biology* **65**:529-539.
- Lambl, V., 1859. Microscopische untersuchungen der darmexcrete. Beitrag zur pathologisches des darmes und zur diagnostik am krankenbette. *Viert. Prakt. Heilkd. (Prague)* **61**:1-57.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lazos Ochoa M., 1994. Patología y patógena de la amibiasis, Segunda Reunión de Expertos en amibiasis. SERLE, Primera Edición 41-52.
- Levine N.D., Carliss J.O., Cox F.E.G., Deroux G., Grain J., Honinger B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lin D., Lom J., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljanski G., Sprague V., Vavra J. and Walalace F.G., 1980. A new revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology* **27**:37-58.
- Lösch F.A., 1875. Massive development of amoebae in the large intestine. *Arch. F. Path. Anat.*, LXV 196.
- López-Romero, E. y Villagómez-Castro, J.C., 1993. Encystation in *Entamoeba invadens*. *Parasitology Today* **9**:225-227.
- Loftus B., Anderson I., Davies R., Alsmark UCM., Samuelson J., Amedeo P., Roncaglia P., Beriman M., Hirt R.P., Mann B.J., Nozaki T., Suh. B., Pop M., Duchene M., Ackers J., Tannich E., Leippe M., Hofer M., Brucchaus I., Willhoeft U., Bhattacharya A., Chillingworth T., Churcher C., Hance Z., Harris B., Harris D., Jagel K., Moule S., Mungall K., Ormond D., Squares R., Whitehead S., Quail M.A., Rabbinowitsh E., Norbertczak H., Price C., Wang Z., Guillén N., Grilchrist C., Stroup S.E., Bhattacharya S., Lohia A., Foster P.G., Sicheritz-Ponten T., Weber C., Singh U., Mukherjee C., El-Sayed N.M., Petri W.A., Clark C.G., Embley M.T., Barrell B., Fraser C.M., Hall N. 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**:865-868.
- Makioka, A., Kumagai, M., Kobayashi, S. & Takeuchi, T., 2004. Different effects of cytochalasins on the growth and differentiation of *Entamoeba invadens*. *Parasitology Research* **93**:68-71.

- Martínez-Palomo A.. 1982. The biology of *Entamoeba histolytica*. Primera Edición. Research studies Press-John Wiley & Sons LTD. pp 161.
- Martínez-Palomo A., 1986. The biology of *Entamoeba histolytica*. Ed. Elsevier, Amsterdam, 2:11-43.
- Martínez-Palomo A. 1987. Las amibas enemigos invisibles. Fondo de Cultura Económica, SEP. México, D.F.
- Martínez-Palomo A. y Espinosa-Cantellano M., 2003. *Entamoeba histolytica*: Biología Celular y Molecular. Cap. 24. pp. 741-760.
- Markell. E. K., D. T. John, and W. A. Krotoski., 1999. Lumen-dwelling protozoa, 8th ed. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.
- Mata-Cárdenas, B. D. y Saíd-Fernández, S., 1986. Wall synthesis in axenic cultures of *E. histolytica* grown in PEHPS medium. Archives of Medical Research 25:25-30.
- Mata-Cárdenas, B.D., Morales Vallarta M.R., Vargas Villarreal J. y Saíd-Fernández, S., 1996. PACSR: A serum replacement for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* in a serum-free media. Archives of Medical Research 28:106-107.
- McLaughlin, J.. and S. Aley. 1985. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. Journal of Protozoology 32:221-240.
- McConnachie E. W., 1962. A medium for the axenic cultivation of *E. invadens*. Nature 194:603-604.
- McConnachie E. W., 1969. The morphology, formation and development of cyst of *Entamoeba*. Parasitology 59:41-53.
- Meleney H.E., Snyder T.L., 1940. The excystation of *Entamoeba histolytica* in bacteriologically sterile media. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 21:63-73.
- Merz R.A., Horsch M., Nyhlen L.E. and Rost D.M., 1999. Biochemistry of chitin synthase. In chitin and chitinases. Ed. By Jolles P. And Muzzarelli RAA, Switzerland pp.9-37.
- Monwell, M.D., 1968. Introduction to protozoology. Second revised edition., Dover Publications Inc., New York. P:85.

- Morales-Vallarta M, Mata BD, Ramirez-Bon E, Segura JJ. 1982. Nuclear division and presence of microtubules in the differentiation of *Entamoeba invadens*. Archives of Medical Research **3**:211-216.
- Morales-Vallarta M., Carranza-Rosales M., Ruiz-Ordoñez J., Verduzco-Martinez J., 1989. Cell wall morphogenesis during differentiation of *Entamoeba invadens* (Protozoa: Sarcodina). Transactions of the American Microscopical Society **108**:204-207.
- Morales-Vallarta M. R, 1991. Inducción de cuerpos cromatoides en trofozoitos que crecen en fase log y diferenciación de *Entamoeba invadens* por alta tensión de CO₂ Aspectos en la formación de la pared del quiste. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL., Monterrey, N.L.
- Morales-Vallarta M. y Villarreal-Treviño L., 1997. *Entamoeba invadens* differentiation and *Entamoeba histolytica* cyst-like formation induced by CO₂. Archives of Medical Research **28**:150-151.
- Moran P., Ramos F., Ramiro M., Curiel O., González E., Valadez A., Gómez A., García G., Melendro E.I., Ximénez C. 2005. *Entamoeba histolytica* and/or *Entamoeba dispar*: Infection frequency in HIV⁺/AIDS patients in México city. Experimental Parasitology **110**:331-334.
- Muñoz M.L., Lamoyi E. and León G., 1990. Antigens in electron-dense granules from *Entamoeba histolytica* as possible markers for pathogenicity. Journal of Clinical Microbiology **28**: 2418–2424.
- Nayeem MA, Habibullah CM, Saleem Y, Quadri GS, Ishaq M., 1993. *In vitro* encystation and excystation of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Indian Journal Experimental Biology **6**:562-563.
- Neff R.J. y Benton W.F., 1964. Localization of cellulose in the cysts of *Acanthamoeba* sp. Journal of Protozoology **9**:11-13.
- Nelson E.C., 1947. Alcoholic extract medium for the diagnosis and cultivation of *Entamoeba histolytica*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **27**:545-552.
- OMS, 1997. Amoebiasis-An expert consultation. Weekly Epidemiological Record No.14. Ginebra, Abril.
- Osler, W. 1890. On the amoeba coli in dysentery and in dysenteric liver abscess. Bulletin of The John Hopkins Hospital **1**:53-57.

- Pall M.L., 1981. Adenosine 3'-5'-monophosphate in fungi. *Microbiological Reviews* **45**:462-480.
- Pérez-Arellano, J.L., Muro-Álvarez A., Hernández-Caballero M. y Martín-Sánchez A.M. 2002. Amebosis. *Medicine* **8**:3731-3741.
- Petri W.A., Jackson T.F., Gathiram V. 1990. Pathogenic and non pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infection and Immunity* **58**:1802-0806.
- Proctor E.M. and Gregory M.A. 1973. Ultrastructure of cysts of *E. histolytica*. *International Journal of Parasitology* **3**:455-456.
- Pumarola, A.; Rodríguez Torres, A.; García Rodríguez, J.A; Piedrola Angulo G. 1987. *Microbiología y Parasitología Médica*. 2 Edición. Barcelona: Salvar Editores. S. A., p.908.
- Quincke, H., and E. Ross. 1893. Ueber Amöben-Enteritis. *Berl. Klin. Wochenscher.* **30**:1089-1094.
- Rengpein S., Bailey G. B., 1975. Differentiation of *Entamoeba*: a new medium and optimal conditions for axenic encystation of *Entamoeba invadens*. *Journal of Parasitology* **61**:24-30.
- Reed S.L. y Flores MB., 1992. Molecular and cellular characterization of the 29 kilodalton peripheral membrane protein of *Entamoeba histolytica*: differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates. *Infection and Immunity* **60**:542-549.
- Romero-Caballero R., 1994. Introducción de amibiasis, Segunda reunión de expertos, Primera Edición, SEARLE de México, pp:47-55.
- Rivera P.R. y Correa-Lemus I., 1986. Enquistamiento axénico de *E. histolytica*. *Archivos de Investigación Médica (Mex.)* **17**:19-23.
- Sargentum P.G., Williams J.E., Grene J.D. 1978. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**:519-521.
- Schaudinn, F. R., 1903. On the development of some Rhizopoda (Preliminary Report) En: Kean B. H., Mott K.E., Russell A.J., eds. *Tropical Medicine and Parasitology Classic Investigations*, London United Kingdom: Cornell University Press; 1978. **1**:110-118.

- Schaumburg, H. H., Spencer P.S., Thomas P.K., 1983. Toxic neuropathy: Pharmaceutical agents. In disorders in peripheral nervs. Contemporary neurology series. Phyladelphia, pp.119-130.
- Saíd-Fernández, S., Vargas Villarreal, J., Castro-Garza., Mata-Cárdenas, B.D., Navarro-Marmolejo, L., Lozano Garza, G y Martínez-Rodríguez, H., 1988. PEHPS medium: An alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **82**:249-253.
- Saíd-Fernández, S., Mata-Cárdenas, B.D., González-Garza, M.T., Navarro-Marmolejo, L., Rodríguez-Pérez E., 1993. *Entamoeba histolytica* cyst whit a defective wall formed under axenic condition. Parasitology Research **79**:200-2003.
- Saíd-Fernández, S., Mata-Cárdenas, B.D., Castro-Garza, J., Martínez-Rodríguez, H., Navarro-Marmolejo, L., Lozano Garza, G., 1992. Axenic massive cultivation of *Entamoeba histolytica* trophozoites in spinner flasks and in a microfermentor. Archives of Medical Research **23**:57-58.
- Savioli, L. Stausfield. S., Bundy D.A.P., Mtchel, L.A., Bhatia R., Engels D., Montresor A., Neira M., Shein A. 2002. Schistosomiasis and soil transmitted helmintics infections: forgoins control efforts. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **96**:577-579.
- Siddiqui W.A. y Rudzinska M.A., 1965. The fine structure of axenically grown trophozoites of *Entamoeba invadens* with special reference to the nucleus and helical ribonucleoprotein bodies. Journal of Protozoology **12**:448-459.
- Silberman, J.D., Clarck, C.G., Diamond, L.S., Sogin, M. L., 1999. Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small subunit ribosomal RNA genes sequence analysis. Molecular Biology and Evolution **16**:1740-1751.
- Snyder, T.L. y Meleney, H.E., 1941. Anaerobiosis and cholesterol as growth requirements of *Endamoeba histolytica*. Journal of Parasitology **29**:278-284.
- Spurr A. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. Journal of Ultrastructure Research **26**:31-43.
- Steel,G. D., Torrie, J.H., Dickey, D.A., 2000. Procedures Statistics Biometrical Aproach. Series in probability and statics. 3era ed. McGraw-Hill.
- Stoll N.R., 1957. Axenic culture of *E. invadens* in the absence of tissue. Journal of Protozoology **4**:6.

- Stone, W., 1935. A method of producing encystment in cultures of *Entamoeba histolytica*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **15**:681-684.
- Strickler J.E., Patton C.L., 1975. Adenosine 3'.5'-monophosphate in reproducing and differentiated *Trypanosomas*. Science **190**:1110-1112.
- Tellam R.L. Vuocolo T., Jonson S., Jarney J. and Pearson R.D., 2000. Insect chitin synthase: c:DNA sequence, gene organization and expression. European Journal of Biochemistry **267**:6025-6042.
- Thepsurungsikul, V., Seng L., and Bailey G. B., 1971. Differentiation of *Entamoeba*: Encystation of *Entamoeba invadens* in monoxenic and axenic cultures. Journal of Parasitology **57**:1288-1292.
- Torian B.E., Reeds S.L., Creely C.M., Coward J.E., Vial K., Stamm W.E., 1990. The 96 kilodalton antigen as an integral membrane protein in pathogenic *Entamoeba histolytica*: potential differences in pathogenic and non pathogenic isolates. Infection and Immunity **58**:753-760.
- Valdéz-Aguirre A., Villarreal-Treviño L, Vargas-Villarreal J., Mata-Cárdenas B.D., Morales-Vallarta M., 2000. Effect of agents that modified cAMP levels on growth and differentiation of *Entamoeba invadens*. Archives of Medical Research **31**:S198-S199.
- Van Dellen K.J., Bulik D.A.S., Specht C.A., Robbins P.W., Samuelson J.C., 2006. Heterologous expression of an *Entamoeba histolytica* chitin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukariotic Cell **5**:203-206.
- Vaidya, A.B., and D.K. Ray. 1982. Amoebiasis: the tropical source. Science Today India, p.21-26.
- Verna, K.K., Raizada M.K., Krishna-Murti C.R., 1974. Effect of bioamines on the cellular differentiation of *Hartmanella culbertsoni*. Biochemistry Pharmacology **23**:57-59.
- Villarreal-Treviño, L. 1990. Nuevo método de enquistamiento axénico de *Entamoeba invadens* e inducción de cuerpos cromatoides en fase activa de crecimiento. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL., Monterrey, N.L.
- Walker E.L. and Sellards A.W., 1913. Experimental entamoebic dysentery. Tropical Medicine and Parasitology **8**:253-330.
- www.centerdiseasescontrol.com
- Zuckrman, L. y Meleney, H., 1945. A fluid medium for the encystations of *Entamoeba histolytica* under reduced atmospheric pressure. Journal of Parasitology **31**:155-157.

TABLE B. (Continda).

	0.0	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008	0.009
0.90	6.28177	6.28745	6.29322	6.29902	6.30488	6.31077	6.31672	6.32271	6.32875	6.33482
0.91	6.34097	6.34716	6.35339	6.35969	6.36603	6.37243	6.37889	6.38541	6.39199	6.39862
0.92	6.40532	6.41208	6.41891	6.42581	6.43276	6.43974	6.44674	6.45378	6.46081	6.46787
0.93	6.47060	6.47795	6.48535	6.49280	6.50030	6.50784	6.51541	6.52301	6.53064	6.53831
0.94	6.54521	6.55295	6.56073	6.56856	6.57643	6.58434	6.59228	6.60025	6.60825	6.61628
0.95	6.62421	6.63228	6.64039	6.64854	6.65672	6.66493	6.67317	6.68144	6.68974	6.69806
0.96	6.70710	6.71548	6.72389	6.73233	6.74080	6.74930	6.75782	6.76636	6.77492	6.78350
0.97	6.79211	6.80072	6.80936	6.81802	6.82670	6.83540	6.84412	6.85286	6.86162	6.87040
0.98	6.88121	6.89002	6.89885	6.90770	6.91656	6.92543	6.93432	6.94322	6.95213	6.96105
0.980	7.05415	7.05774	7.06134	7.06494	7.06854	7.07214	7.07574	7.07934	7.08294	7.08654
0.981	7.09229	7.09588	7.10047	7.10406	7.10765	7.11124	7.11483	7.11842	7.12201	7.12560
0.982	7.12927	7.13286	7.13645	7.14004	7.14363	7.14722	7.15081	7.15440	7.15799	7.16158
0.983	7.16511	7.16870	7.17229	7.17588	7.17947	7.18306	7.18665	7.19024	7.19383	7.19742
0.984	7.19773	7.20132	7.20491	7.20850	7.21209	7.21568	7.21927	7.22286	7.22645	7.23004
0.985	7.23405	7.23764	7.24123	7.24482	7.24841	7.25200	7.25559	7.25918	7.26277	7.26636
0.986	7.27035	7.27394	7.27753	7.28112	7.28471	7.28830	7.29189	7.29548	7.29907	7.30266
0.987	7.30675	7.31034	7.31393	7.31752	7.32111	7.32470	7.32829	7.33188	7.33547	7.33906
0.988	7.34345	7.34704	7.35063	7.35422	7.35781	7.36140	7.36499	7.36858	7.37217	7.37576
0.989	7.37935	7.38294	7.38653	7.39012	7.39371	7.39730	7.40089	7.40448	7.40807	7.41166
0.990	7.41525	7.41884	7.42243	7.42602	7.42961	7.43320	7.43679	7.44038	7.44397	7.44756
0.991	7.45155	7.45514	7.45873	7.46232	7.46591	7.46950	7.47309	7.47668	7.48027	7.48386
0.992	7.48745	7.49104	7.49463	7.49822	7.50181	7.50540	7.50899	7.51258	7.51617	7.51976
0.993	7.52375	7.52734	7.53093	7.53452	7.53811	7.54170	7.54529	7.54888	7.55247	7.55606
0.994	7.56025	7.56384	7.56743	7.57102	7.57461	7.57820	7.58179	7.58538	7.58897	7.59256
0.995	7.59655	7.60014	7.60373	7.60732	7.61091	7.61450	7.61809	7.62168	7.62527	7.62886
0.996	7.63285	7.63644	7.64003	7.64362	7.64721	7.65080	7.65439	7.65798	7.66157	7.66516
0.997	7.66915	7.67274	7.67633	7.67992	7.68351	7.68710	7.69069	7.69428	7.69787	7.70146
0.998	7.70545	7.70904	7.71263	7.71622	7.71981	7.72340	7.72699	7.73058	7.73417	7.73776
0.999	7.74175	7.74534	7.74893	7.75252	7.75611	7.75970	7.76329	7.76688	7.77047	7.77406

Anexo - B

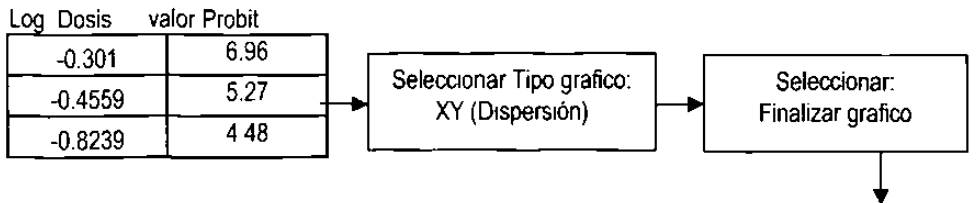
ECUACIONES

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

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

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

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

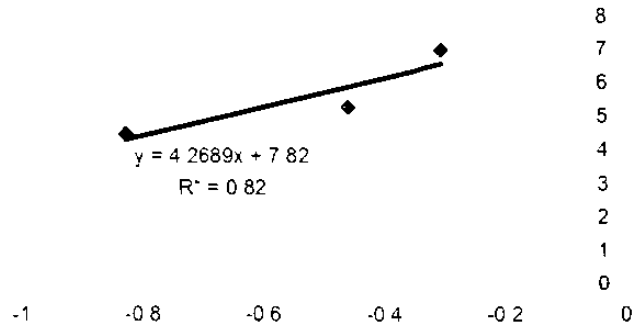


Una vez graficado, colocar el cursor en uno de los puntos y oprimir el lado derecho del ratón.

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

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

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



7 - Despejar de la ecuacion $y = 4.2689X + 7.82$ el valor de X, en el entendido de que y = 5, y sustituirlo en la ecuacion

8 - $5 = 4.2689 X + 7.82$

9.- Despejar X

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

11.- (-0.6605)

12 - Antilog (-0.6605)

13 - 0.218

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

Anexo - C

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook 1

Normality Test: Failed ($P < 0.050$)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 1 in Notebook 1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Control	3	0	96.000	95.250	97.500
Calcofluor M2r	3	0	37.000	28.750	49.600
Metronidazol	3	0	35.000	32.000	38.000
NaF	3	0	58.000	45.925	70.000
Cafena	3	0	64.000	59.500	65.950
Teofilina	3	0	64.100	60.950	67.025
EM <i>C.texana</i>	3	0	54.200	51.650	56.300

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

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

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

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test)

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0.05
Control vs Metronidazol	59.000	4.817	Yes
Control vs Calcofluor M2r	56.000	4.572	Yes
Control vs EM <i>C.texana</i>	43.000	3.511	Yes
Control vs NaF	30.000	2.449	Do Not Test
Control vs Cafena	23.000	1.878	Do Not Test
Control vs Teofilina	18.000	1.470	Do Not Test
Teofilina vs Metronidazol	41.000	3.348	No

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

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

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

GLOSARIO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Eucariotas (del griego *eu* – bueno, verdadero, *karyon* – núcleo, nuez): organismos caracterizados por poseer células con un nucleo verdadero rodeado por membrana. El registro arqueologico muestra su presencia en rocas de aproximadamente 1 200 a 1500 millones de años de antigüedad.

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

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

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

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

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

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

por medio de una serie de enzimas para cubrir las necesidades energeticas de nuestro organismo Las glucogenosis son enfermedades en donde existen deficiencias congénitas de la mayoría de las enzimas relacionadas con el metabolismo del glucogeno, en donde los organos mas afectados son el higado y el musculo esqueletico

Glucosa: Molecula ($C_6H_{12}O_6$) es una aldohexosa (aldehido pentahidroxilado) y un monosacarido La glucosa es el compuesto organico mas abundante de la naturaleza Es la fuente principal de energía de las celulas, mediante la degradacion catabolica, y es el componente principal de polimeros de importancia estructural como la celulosa y de polimeros de almacenamiento energetico como el almidon, es encontrada en las frutas y en la miel.

Glutaraldehído: Fue descubierto por David Domingo Sabatini, científico y medico argentino, quien encontro que sustancia se encarga de preservar las celulas, posibilitando su analisis en el microscopio un mayor lapso de tiempo

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

Organelos (del griego *organon* – herramienta). Estructuras subcelulares que realizan determinadas funciones (generalmente estan rodeadas por membranas y se las encuentra en las celulas eucariotas) p ej.. mitocondrias, cloroplastos, nucleo

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

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

Polímero(del griego *polys* – muchos, *meros* parte) Molecula compuesta por muchas subunidades idénticas o similares

Pseudopodos del griego *pseudēs* falso, *podos* pie

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

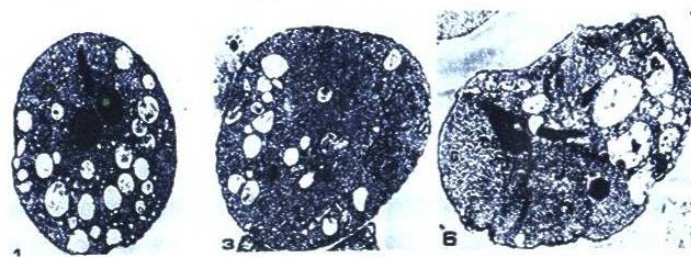


Figura 45. Morfología diversa de quistes de *E. histolytica*. Imágenes reportada por Proctor y Gregory, que muestra que los quistes de *E. histolytica* obtenidos *in vivo* no siempre son esféricos, tal como se les describe en la literatura

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

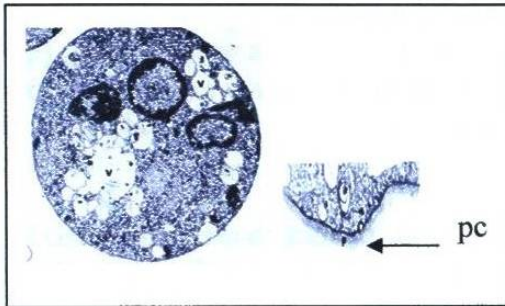


Figura 46. Quiste y pared celular de *E. histolytica*. Imagen reportada por Chávez, 1978.

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

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

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

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

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

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

Existen una serie de trabajos que sustentan la idea de que los cuerpos cromatoides o hélices de ribonucleoproteínas no son solamente un evento sin significado biológico, sino más bien un mecanismo estratégico de acumulación de ribosomas previo a, o asociado a un inminente enquistamiento, para su posterior utilización en una rápida proliferación celular en el subsiguiente proceso de desenquistamiento, aunque este proceso pueda también ser artificialmente inducido por inhibición de la síntesis de proteínas. Esto último es explicable por la aparente capacidad innata de agregación de los ribosomas no asociados a polisomas.

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

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

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

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

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

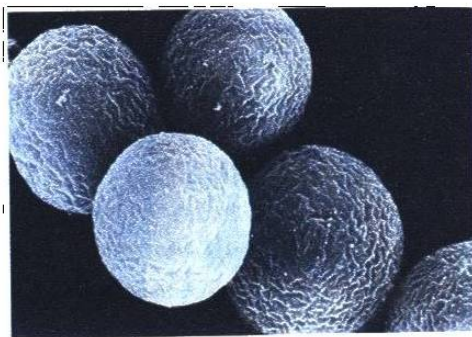


Figura 47. Quistes de *E. histolytica*. Quistes obtenidos de pacientes con amibiasis, imagen reportada por Martínez, 1987.

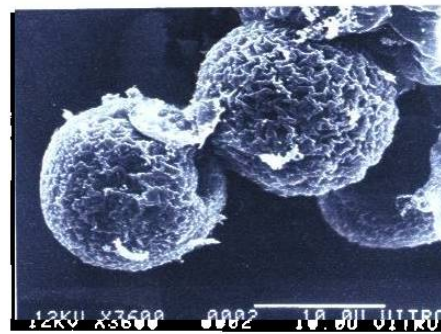


Figura 48. Quistes de *E. invadens*. Quistes obtenidos *in vitro* y reportados por Morales, 1989.

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

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

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

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

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

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

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

9. CONCLUSIONES

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

10. PERSPECTIVAS

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

11. LITERATURA CITADA

- Acevedo Garibay, M.A., 1993. Niveles de RNA en trofozoítos de *Entamoeba invadens* cepa IP-1 crecidos axenicamente con tensión normal y alta tensión de CO₂ en medio TYI-S-33 sin vitaminas. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL, Monterrey, N.L.
- Algranati, D.I., Serra M. P., Carrillo C. y González. N., 2006. Modulation of oat arginine decarboxylase gene expression and genome organization in transgenic *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Federation of Biochemical Societies Journal* **273**:628-637.
- Arroyo-Begovich, A., Carabéz-Trejo A., Ruíz-Herrera, J., 1980. Identification of the structural components in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. *Journal of Parasitology* **66**:735-741.
- Arroyo-Begovich, A., Carabéz-Trejo A., 1982. Location of chitin in the wall of *Entamoeba invadens* with colloidal gold tracers. *Journal of Parasitology* **68**:253-258.
- Avron B, Stolarsky T., Chaayen A, Mirelman D., 1986. Encystation of *E. invadens* IP-1 is induced by lowering the osmotic pressure and depletion of nutrients from the medium. *Journal of Protozoology* **33**:522-525.
- Avron, B., R. M. Deutsch, and D. Mirelman. 1982. Chitin synthesis inhibitors prevent cyst formation by trophozoites. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **108**:815-821.
- Balamuth, W., 1946. Improved egg yolk medium for cultivation of *Entamoeba histolytica* and other intestinal protozoa. *American Journal of Clinical Pathology* **16**:380-384.
- Barker, D.C. y Deutsch, K., 1958. The chromatoid body of *Entamoeba invadens*. *Experimental Cell Research* **15**:604-639.
- Barrón-González, M.P., Villarreal-Treviño, L., Verduzco-Martínez, J.A., Mata-Cárdenas B.D., y Morales-Vallarta M.R., 2005. *Entamoeba invadens*: *In vitro* axenic encystation with a serum substitute. *Experimental Parasitology* **110**:318-321.

- Batchricki-García, S. 1989. The biochemical cytology of chitin and chitosan synthesis in fungi. In *Chitin and Chitosan*. Ed. By Skjak-Brack G., Anthousen T. And Sadford P. London; Elsevier Applied Science, pp.23-36.
- Boeck, W.C. and Drbohlav, J., 1925. The cultivation of *Endamoeba histolytica*. *American Journal of Hygiene* **5**:371-407.
- Boucher, S.E. y Guillin F.D., 1990. Excystation of *in vitro*-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infection and Immunity* **58**:3516-3522.
- Bray, R.S. 1996. Amoebiasis, The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases. The Wellcome Trust, London, United Kingdom. In F.E.C.Cox (ed), pp. 170-177.
- Burk R.R., 1968. Reduced adenyl ciclase activity in a polyoma virus transformed cell line. *Nature* **219**:1272-1275.
- Byers, T.J. 1986. Molecular biology of DNA in *Acanthamoeba*, *amoeba*, *Entamoeba* and *Naegleria*. *International Journal of Cytology* **99**:311-341.
- Caballero-Salcedo, A., M. Viveros-Rogel, B. Salvatierra, R. Tapia-Conyer, J. Sepúlveda-Amor, G. Gutiérrez, and L. Ortiz-Ortiz. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **50**:412-419.
- Calzado-Flores C., Verde-Star J., Morales-Vallarta M., Segura-Luna J.J., 2007. Inhibición del proceso de enquistamiento de *E. invadens* por *Castela texana*. *Revista Ciencia UANL* **10**:44-48.
- Campos-Góngora E, Ebert F, Willhoeft U, Said-Fernández S, Tannich E. 2004. Characterization of chitin synthases from *Entamoeba*. *Protist* **155**:323-330.
- Carliss J.O., Gojides M, Hall R.D., Kudo R.R., Levine N.D., Loeblich A.R., Jr Weiser J. and Wenrich D.H. 1969. A revised classification the phyllus protozoa. *Journal of Protozoology* **12**:11-17.
- Cervantes-Mamoa A. y Martínez-Palomo, A., 1980. Estudio del ciclo vital de *Entamoeba invadens* mediante cinematografía espaciada. *Archivos de Investestigación Médica (México)* **11**:31-40.
- Chang S. L., 1946. Studies in *Entamoeba histolytica* IV. The relation of oxidation reduction potentials to the growth, encystations and excistations of *Entamoeba histolytica* in culture. *Journal of Parasitology* **37**:101-112.

- Chávez-Munguía B., Martínez Palomo A., De la Torre M., 1978. Estructura ultramicroscópica de la pared de quistes de *Entamoeba invadens*, *E. histolytica* y *E. coli*. *Archivos de Investigación Médica* **9**:113-116.
- Chávez-Munguía B., Cristóbal-Ramos AR., González-Robles A., Tsutsumi V., and Martínez-Palomo A., 2003. Ultrastructural study of *Entamoeba invadens* encystation and excystation. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* **35**:235-243.
- Chávez-Munguía B., Hernández-Ramírez V., Angel A., Rios A., Talamas-Rohana P., González-Robles A., González-Lazaro M., Martínez-Palomo A., 2004. *Entamoeba histolytica*: ultrastructure of trophozoites recovered from experimental liver lesions. *Experimental Parasitology* **107**:39-46.
- Chinn B., Jacobs L., Reardon L. and Rees C., 1942. The influence of the bacterial flora on the cultivation of *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **22**:137-146.
- Clark, C.G., Espinosa Cantellano, M. and Bhattacharya, A. 2000 *Entamoeba histolytica*: an overview of the biology of the organism. in: Amebiasis (Ravdin J.I., ed.) Imperial College Press, London, pp. 1-45.
- Clark, C.G., and L.S. Diamond. 2002. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clinical Microbiology Reviews* **15**:329-341.
- Cleveland, L.R. and Sanders, E.P., 1930. The production of bacteria-free amoebic abscesses in the liver of cats and observations on the amoebae in various media with and without bacteria. *Science* **77**:149-151.
- Councilman, W. T., and H. A. Lafleur., 1891. Amebic dysentery. *Johns Hopkins Hospital Reports* **2**:395-548.
- Crosby, A. W., 1986. *Ecological imperialism : the biological expansion of Europe, 900-1900*. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom.
- Das S.R., Rastogi, A.K., Sagar P., y Singh, M.P., 1980. Axenic encystation of *Entamoeba invadens*. *Indian Journal of Experimental Biology* **18**:333-336.
- Das S.R. y Guillin F.D., 1991. Chitin synthase in encysting of *Entamoeba invadens*. *Biochemical Journal* **280**:641-647
- Diamond L.S., 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science* **134**:336-337.

- Diamond L.S., 1968. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amoeba. *Journal of Parasitology* **54**:1047-1056.
- Diamond L.S., Harlow D. y Cunnick C.C., 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**:431-432.
- Diamond L.S. y Cunnick C.C., 1991. A serum-free, partly defined medium, PDM-805, for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* schaudinn and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**:431-432.
- Diamond, L.S. y Clark, C.G., 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *Journal of Eukariotic Microbiology* **40**:340-344.
- Dobell, C. y Laidlaw, P.P., 1926. On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other entozoic amoebae. *Parasitology* **18**:238-318.
- Dobell C., 1928. Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. I. General Introduction. II. Description of the whole life-history of *Entamoeba histolytica* in culture. *Parasitology* **20**:357-412.
- Dobell C., 1932. Antony van Leeuwenhoek and his "little animals". John Bale Sons and Danielsson, London, United Kingdom, pp.224-225.
- Fahey, R.C., Newton G.L., Arrick B., Overdank-Bogart, T. Y Aley S.B., 1984. *Entamoeba histolytica*: a eukariote without glutathione metabolism, *Science* **224**:70-72.
- Feria-Velasco A. and Tapia-Arizmendi G., 1977. Qualitative X-ray spectrometric study of *E. histolytica* trophozoite nuclei. *Archives of Medical Research* **8**:199-208.
- Frye, W.W. y Melenay, H.E., 1939. Liver extract as a substitute for serum in the culture medium for *Entamoeba histolytica*. *Science* **89**:564-565.
- Garibay de Hoyos, C.A., 1991. Niveles de RNA en trofozoítos de *Entamoeba invadens* IP-1 crecidos axenicamente en medio TP-S-1 con tensión normal y alta tensión de CO₂. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Monterrey, N.L.
- Garcia. L.S., and D.A. Bruckner. 1997. *Diagnostic medical parasitology*, 3rd ed. ASM Press.

- Gerisch, G., 1987. Cycline AMP and other signals controlling cell development and differentiation in *Dictyostelium*. *Annual Review of Biochemistry* **56**:853-879.
- González A.R., Haque R., Rehman T., 1992. A monoclonal antibody for distinction of invasive and noninvasive clinical isolates of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology* **30**:2807-2813.
- González J., Guangxing B., Frevert U., Corey, E. J. y Eichinger D., 1999. Proteasome-dependent cyst formation and stage-specific ubiquitin mRNA accumulation in *Entamoeba invadens*. *European Journal of Biochemistry* **264**:897-904.
- Gutiérrez G. y Muñoz O., 1994. Epidemiología de la amibiasis. Ed. Kretschmer R. Amibiasis, Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas.
- Horsch M., Mayer C, and Rast D.M., 1996. Stereochemical requirements of chitin synthase for ligand binding at the allosteric site for N-acetylglucosamine *European Journal of Biochemistry* **237**:476-482.
- Horst M.N., 2005. The biosynthesis of crustacean chitin by a microsomal enzyme from brine shrimp. *Journal of Biological Chemistry* **10**:1412-1419.
- Imperato P.J. 1981. A historical overview of amebiasis. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* **57**:175-187.
- Ivey, M. 1980. Phylum Protozoa, *In* A. C. Sonnenwirth and L. Jarett (ed.), *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*. The C. V. Mosby Co., St. Louis, Mo, pp. 2081-2093.
- Jackson T, 2000. Epidemiology. En: Ravdin J.I., editor. *Amebosis*. Londres: Imperial College Press, pp.47-63.
- Kapoor O. P., 2006. Amoebic liver abscess. *Bombay Hospital Journal* **48**:4-6.
- Katz M., Despommier DD. and Gwadz RW. 1989. *Parasitic diseases*. Springer-Verlag, New York, N.Y., pp.129-135.
- Kartulis, S. 1886. Zur etiologie der dysenterie in Aegyptien. *Virchows Archives A: Pathological Anatomy and Histopathology* **105**:521-531.
- Kean, B.H., 1988. A history of amebiasis., *In* J. I. Ravdin (ed.), *Amebiasis: human infection bu Entamoeba histolytica*. John Wiley&Sons. Inc., New York, N.Y., pp.1-10.

- Kessel, J., Allison, D., Kaime, M., Quiros, M. y Gloeckner, A., 1944. The cysticidal effects of chlorine and ozone on cysts of *Entamoeba histolytica*, together with a comparative study of several encystment media. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **24**:177-183.
- Kusamram, T., Sobhon, P., Bailey, G.B., 1975. The mechanism of formation of inhibitor induced ribosome helices in *Entamoeba invadens*. *The Journal of Cell Biology* **65**:529-539.
- Lambl, V., 1859. Microscopische untersuchungen der darmexcrete. Beitrag zur pathologisches des darmes und zur diagnostik am krankenbette. *Viert. Prakt. Heilkd. (Prague)* **61**:1-57.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lazos Ochoa M., 1994. Patología y patógena de la amibiasis, Segunda Reunión de Expertos en amibiasis. SERLE, Primera Edición 41-52.
- Levine N.D., Carliss J.O., Cox F.E.G., Deroux G., Grain J., Honinger B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lin D., Lom J., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljanski G., Sprague V., Vavra J. and Walalace F.G., 1980. A new revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology* **27**:37-58.
- Lösch F.A., 1875. Massive development of amoebae in the large intestine. *Arch. F. Path. Anat.*, LXV 196.
- López-Romero, E. y Villagómez-Castro, J.C., 1993. Encystation in *Entamoeba invadens*. *Parasitology Today* **9**:225-227.
- Loftus B., Anderson I., Davies R., Alsmark UCM., Samuelson J., Amedeo P., Roncaglia P., Beriman M., Hirt R.P., Mann B.J., Nozaki T., Suh. B., Pop M., Duchene M., Ackers J., Tannich E., Leippe M., Hofer M., Brucchaus I., Willhoeft U., Bhattacharya A., Chillingworth T., Churcher C., Hance Z., Harris B., Harris D., Jagel K., Moule S., Mungall K., Ormond D., Squares R., Whitehead S., Quail M.A., Rabbinowitsh E., Norbertczak H., Price C., Wang Z., Guillén N., Grilchrist C., Stroup S.E., Bhattacharya S., Lohia A., Foster P.G., Sicheritz-Ponten T., Weber C., Singh U., Mukherjee C., El-Sayed N.M., Petri W.A., Clark C.G., Embley M.T., Barrell B., Fraser C.M., Hall N. 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**:865-868.
- Makioka, A., Kumagai, M., Kobayashi, S. & Takeuchi, T., 2004. Different effects of cytochalasins on the growth and differentiation of *Entamoeba invadens*. *Parasitology Research* **93**:68-71.

- Martínez-Palomo A.. 1982. The biology of *Entamoeba histolytica*. Primera Edición. Research studies Press-John Wiley & Sons LTD. pp 161.
- Martínez-Palomo A., 1986. The biology of *Entamoeba histolytica*. Ed. Elsevier, Amsterdam, 2:11-43.
- Martínez-Palomo A. 1987. Las amibas enemigos invisibles. Fondo de Cultura Económica, SEP. México, D.F.
- Martínez-Palomo A. y Espinosa-Cantellano M., 2003. *Entamoeba histolytica*: Biología Celular y Molecular. Cap. 24. pp. 741-760.
- Markell. E. K., D. T. John, and W. A. Krotoski., 1999. Lumen-dwelling protozoa, 8th ed. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.
- Mata-Cárdenas, B. D. y Saíd-Fernández, S., 1986. Wall synthesis in axenic cultures of *E. histolytica* grown in PEHPS medium. Archives of Medical Research 25:25-30.
- Mata-Cárdenas, B.D., Morales Vallarta M.R., Vargas Villarreal J. y Saíd-Fernández, S., 1996. PACSR: A serum replacement for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* in a serum-free media. Archives of Medical Research 28:106-107.
- McLaughlin, J.. and S. Aley. 1985. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. Journal of Protozoology 32:221-240.
- McConnachie E. W., 1962. A medium for the axenic cultivation of *E. invadens*. Nature 194:603-604.
- McConnachie E. W., 1969. The morphology, formation and development of cyst of *Entamoeba*. Parasitology 59:41-53.
- Meleney H.E., Snyder T.L., 1940. The excystation of *Endamoeba histolytica* in bacteriologically sterile media. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 21:63-73.
- Merz R.A., Horsch M., Nyhlen L.E. and Rost D.M., 1999. Biochemistry of chitin synthase. In chitin and chitinases. Ed. By Jolles P. And Muzzarelli RAA, Switzerland pp.9-37.
- Monwell, M.D., 1968. Introduction to protozoology. Second revised edition., Dover Publications Inc., New York. P:85.

- Morales-Vallarta M, Mata BD, Ramirez-Bon E, Segura JJ. 1982. Nuclear division and presence of microtubules in the differentiation of *Entamoeba invadens*. Archives of Medical Research **3**:211-216.
- Morales-Vallarta M., Carranza-Rosales M., Ruiz-Ordoñez J., Verduzco-Martinez J., 1989. Cell wall morphogenesis during differentiation of *Entamoeba invadens* (Protozoa: Sarcodina). Transactions of the American Microscopical Society **108**:204-207.
- Morales-Vallarta M. R, 1991. Inducción de cuerpos cromatoides en trofozoitos que crecen en fase log y diferenciación de *Entamoeba invadens* por alta tensión de CO₂ Aspectos en la formación de la pared del quiste. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL., Monterrey, N.L.
- Morales-Vallarta M. y Villarreal-Treviño L., 1997. *Entamoeba invadens* differentiation and *Entamoeba histolytica* cyst-like formation induced by CO₂. Archives of Medical Research **28**:150-151.
- Moran P., Ramos F., Ramiro M., Curiel O., González E., Valadez A., Gómez A., García G., Melendro E.I., Ximénez C. 2005. *Entamoeba histolytica* and/or *Entamoeba dispar*: Infection frequency in HIV⁺/AIDS patients in México city. Experimental Parasitology **110**:331-334.
- Muñoz M.L., Lamoyi E. and León G., 1990. Antigens in electron-dense granules from *Entamoeba histolytica* as possible markers for pathogenicity. Journal of Clinical Microbiology **28**: 2418–2424.
- Nayeem MA, Habibullah CM, Saleem Y, Quadri GS, Ishaq M., 1993. *In vitro* encystation and excystation of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Indian Journal Experimental Biology **6**:562-563.
- Neff R.J. y Benton W.F., 1964. Localization of cellulose in the cysts of *Acanthamoeba* sp. Journal of Protozoology **9**:11-13.
- Nelson E.C., 1947. Alcoholic extract medium for the diagnosis and cultivation of *Entamoeba histolytica*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **27**:545-552.
- OMS, 1997. Amoebiasis-An expert consultation. Weekly Epidemiological Record No.14. Ginebra, Abril.
- Osler, W. 1890. On the amoeba coli in dysentery and in dysenteric liver abscess. Bulletin of The John Hopkins Hospital **1**:53-57.

- Pall M.L., 1981. Adenosine 3'-5'-monophosphate in fungi. *Microbiological Reviews* **45**:462-480.
- Pérez-Arellano, J.L., Muro-Álvarez A., Hernández-Caballero M. y Martín-Sánchez A.M. 2002. Amebosis. *Medicine* **8**:3731-3741.
- Petri W.A., Jackson T.F., Gathiram V. 1990. Pathogenic and non pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infection and Immunity* **58**:1802-0806.
- Proctor E.M. and Gregory M.A. 1973. Ultrastructure of cysts of *E. histolytica*. *International Journal of Parasitology* **3**:455-456.
- Pumarola, A.; Rodríguez Torres, A.; García Rodríguez, J.A; Piedrola Angulo G. 1987. *Microbiología y Parasitología Médica*. 2 Edición. Barcelona: Salvar Editores. S. A., p.908.
- Quincke, H., and E. Ross. 1893. Ueber Amöben-Enteritis. *Berl. Klin. Wochenscher.* **30**:1089-1094.
- Rengpein S., Bailey G. B., 1975. Differentiation of *Entamoeba*: a new medium and optimal conditions for axenic encystation of *Entamoeba invadens*. *Journal of Parasitology* **61**:24-30.
- Reed S.L. y Flores MB., 1992. Molecular and cellular characterization of the 29 kilodalton peripheral membrane protein of *Entamoeba histolytica*: differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates. *Infection and Immunity* **60**:542-549.
- Romero-Caballero R., 1994. Introducción de amibiasis, Segunda reunión de expertos, Primera Edición, SEARLE de México, pp:47-55.
- Rivera P.R. y Correa-Lemus I., 1986. Enquistamiento axénico de *E. histolytica*. *Archivos de Investigación Médica (Mex.)* **17**:19-23.
- Sargentum P.G., Williams J.E., Grene J.D. 1978. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**:519-521.
- Schaudinn, F. R., 1903. On the development of some Rhizopoda (Preliminary Report) En: Kean B. H., Mott K.E., Russell A.J., eds. *Tropical Medicine and Parasitology Classic Investigations*, London United Kingdom: Cornell University Press; 1978. **1**:110-118.

- Schaumburg, H. H., Spencer P.S., Thomas P.K., 1983. Toxic neuropathy: Pharmaceutical agents. In disorders in peripheral nervs. Contemporary neurology series. Phyladelphia, pp.119-130.
- Saíd-Fernández, S., Vargas Villarreal, J., Castro-Garza., Mata-Cárdenas, B.D., Navarro-Marmolejo, L., Lozano Garza, G y Martínez-Rodríguez, H., 1988. PEHPS medium: An alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **82**:249-253.
- Saíd-Fernández, S., Mata-Cárdenas, B.D., González-Garza, M.T., Navarro-Marmolejo, L., Rodríguez-Pérez E., 1993. *Entamoeba histolytica* cyst whit a defective wall formed under axenic condition. Parasitology Research **79**:200-2003.
- Saíd-Fernández, S., Mata-Cárdenas, B.D., Castro-Garza, J., Martínez-Rodríguez, H., Navarro-Marmolejo, L., Lozano Garza, G., 1992. Axenic massive cultivation of *Entamoeba histolytica* trophozoites in spinner flasks and in a microfermentor. Archives of Medical Research **23**:57-58.
- Savioli, L. Stausfield, S., Bundy D.A.P., Mtchel, L.A., Bhatia R., Engels D., Montresor A., Neira M., Shein A. 2002. Schistosomiasis and soil transmitted helmintics infections: forgoins control efforts. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **96**:577-579.
- Siddiqui W.A. y Rudzinska M.A., 1965. The fine structure of axenically grown trophozoites of *Entamoeba invadens* with special reference to the nucleus and helical ribonucleoprotein bodies. Journal of Protozoology **12**:448-459.
- Silberman, J.D., Clarck, C.G., Diamond, L.S., Sogin, M. L., 1999. Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small subunit ribosomal RNA genes sequence analysis. Molecular Biology and Evolution **16**:1740-1751.
- Snyder, T.L. y Meleney, H.E., 1941. Anaerobiosis and cholesterol as growth requirements of *Endamoeba histolytica*. Journal of Parasitology **29**:278-284.
- Spurr A. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. Journal of Ultrastructure Research **26**:31-43.
- Steel,G. D., Torrie, J.H., Dickey, D.A., 2000. Procedures Statistics Biometrical Aproach. Series in probability and statics. 3era ed. McGraw-Hill.
- Stoll N.R., 1957. Axenic culture of *E. invadens* in the absence of tissue. Journal of Protozoology **4**:6.

- Stone, W., 1935. A method of producing encystment in cultures of *Entamoeba histolytica*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **15**:681-684.
- Strickler J.E., Patton C.L., 1975. Adenosine 3'.5'-monophosphate in reproducing and differentiated *Trypanosomas*. Science **190**:1110-1112.
- Tellam R.L. Vuocolo T., Jonson S., Jarney J. and Pearson R.D., 2000. Insect chitin synthase: c:DNA sequence, gene organization and expression. European Journal of Biochemistry **267**:6025-6042.
- Thepsurungsikul, V., Seng L., and Bailey G. B., 1971. Differentiation of *Entamoeba*: Encystation of *Entamoeba invadens* in monoxenic and axenic cultures. Journal of Parasitology **57**:1288-1292.
- Torian B.E., Reeds S.L., Creely C.M., Coward J.E., Vial K., Stamm W.E., 1990. The 96 kilodalton antigen as an integral membrane protein in pathogenic *Entamoeba histolytica*: potential differences in pathogenic and non pathogenic isolates. Infection and Immunity **58**:753-760.
- Valdéz-Aguirre A., Villarreal-Treviño L, Vargas-Villarreal J., Mata-Cárdenas B.D., Morales-Vallarta M., 2000. Effect of agents that modified cAMP levels on growth and differentiation of *Entamoeba invadens*. Archives of Medical Research **31**:S198-S199.
- Van Dellen K.J., Bulik D.A.S., Specht C.A., Robbins P.W., Samuelson J.C., 2006. Heterologous expression of an *Entamoeba histolytica* chitin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukariotic Cell **5**:203-206.
- Vaidya, A.B., and D.K. Ray. 1982. Amoebiasis: the tropical source. Science Today India, p.21-26.
- Verna, K.K., Raizada M.K., Krishna-Murti C.R., 1974. Effect of bioamines on the cellular differentiation of *Hartmanella culbertsoni*. Biochemistry Pharmacology **23**:57-59.
- Villarreal-Treviño, L. 1990. Nuevo método de enquistamiento axénico de *Entamoeba invadens* e inducción de cuerpos cromatoides en fase activa de crecimiento. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL., Monterrey, N.L.
- Walker E.L. and Sellards A.W., 1913. Experimental entamoebic dysentery. Tropical Medicine and Parasitology **8**:253-330.
- www.centerdiseasescontrol.com
- Zuckrman, L. y Meleney, H., 1945. A fluid medium for the encystations of *Entamoeba histolytica* under reduced atmospheric pressure. Journal of Parasitology **31**:155-157.

TABLE B. (Continda).

	0.0	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008	0.009
0.90	6.28177	6.28745	6.29322	6.29902	6.30488	6.31071	6.31672	6.32271	6.32875	6.33482
0.91	6.34097	6.34716	6.35339	6.35969	6.36603	6.37243	6.37889	6.38541	6.39199	6.39862
0.92	6.40532	6.41208	6.41891	6.42581	6.43276	6.43974	6.44679	6.45388	6.46091	6.46797
0.93	6.47060	6.47795	6.48535	6.49280	6.50029	6.50783	6.51541	6.52302	6.53067	6.53835
0.94	6.54521	6.55295	6.56073	6.56856	6.57643	6.58434	6.59229	6.60027	6.60829	6.61634
0.95	6.62431	6.63245	6.64063	6.64885	6.65711	6.66541	6.67374	6.68211	6.69052	6.69896
0.96	6.70748	6.71601	6.72458	6.73319	6.74184	6.75052	6.75923	6.76797	6.77674	6.78554
0.97	6.79438	6.80331	6.81227	6.82126	6.83028	6.83932	6.84839	6.85748	6.86659	6.87572
0.98	6.88497	6.89418	6.90341	6.91266	6.92193	6.93122	6.94053	6.94986	6.95921	6.96857
0.99	6.97804	6.98753	6.99704	7.00656	7.01610	7.02566	7.03523	7.04482	7.05442	7.06403
0.980	7.05415	7.05774	7.06133	7.06492	7.06851	7.07210	7.07569	7.07928	7.08287	7.08646
0.981	7.09005	7.09364	7.09723	7.10082	7.10441	7.10800	7.11159	7.11518	7.11877	7.12236
0.982	7.12595	7.12954	7.13313	7.13672	7.14031	7.14390	7.14749	7.15108	7.15467	7.15826
0.983	7.16185	7.16544	7.16903	7.17262	7.17621	7.17980	7.18339	7.18698	7.19057	7.19416
0.984	7.19775	7.20134	7.20493	7.20852	7.21211	7.21570	7.21929	7.22288	7.22647	7.23006
0.985	7.23365	7.23724	7.24083	7.24442	7.24801	7.25160	7.25519	7.25878	7.26237	7.26596
0.986	7.26955	7.27314	7.27673	7.28032	7.28391	7.28750	7.29109	7.29468	7.29827	7.30186
0.987	7.30545	7.30904	7.31263	7.31622	7.31981	7.32340	7.32699	7.33058	7.33417	7.33776
0.988	7.34175	7.34534	7.34893	7.35252	7.35611	7.35970	7.36329	7.36688	7.37047	7.37406
0.989	7.37825	7.38184	7.38543	7.38902	7.39261	7.39620	7.39979	7.40338	7.40697	7.41056
0.990	7.41455	7.41814	7.42173	7.42532	7.42891	7.43250	7.43609	7.43968	7.44327	7.44686
0.991	7.45085	7.45444	7.45803	7.46162	7.46521	7.46880	7.47239	7.47598	7.47957	7.48316
0.992	7.48715	7.49074	7.49433	7.49792	7.50151	7.50510	7.50869	7.51228	7.51587	7.51946
0.993	7.52345	7.52704	7.53063	7.53422	7.53781	7.54140	7.54499	7.54858	7.55217	7.55576
0.994	7.55935	7.56294	7.56653	7.57012	7.57371	7.57730	7.58089	7.58448	7.58807	7.59166
0.995	7.59565	7.59924	7.60283	7.60642	7.61001	7.61360	7.61719	7.62078	7.62437	7.62796
0.996	7.63155	7.63514	7.63873	7.64232	7.64591	7.64950	7.65309	7.65668	7.66027	7.66386
0.997	7.66785	7.67144	7.67503	7.67862	7.68221	7.68580	7.68939	7.69298	7.69657	7.70016
0.998	7.70415	7.70774	7.71133	7.71492	7.71851	7.72210	7.72569	7.72928	7.73287	7.73646
0.999	7.74005	7.74364	7.74723	7.75082	7.75441	7.75800	7.76159	7.76518	7.76877	7.77236

Anexo - B

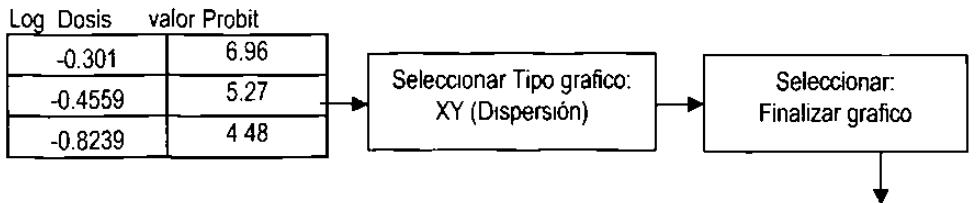
ECUACIONES

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

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

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

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

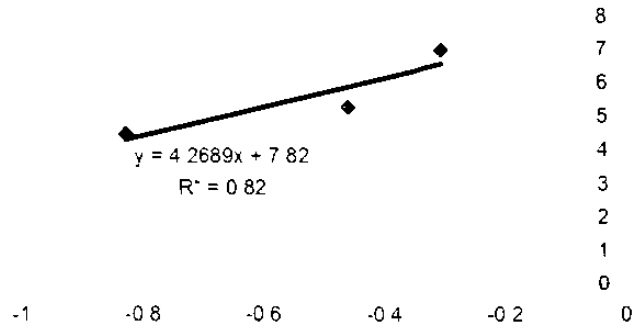


Una vez graficado, colocar el cursor en uno de los puntos y oprimir el lado derecho del ratón.

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

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

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



7 - Despejar de la ecuacion $y = 4.2689X + 7.82$ el valor de X, en el entendido de que y = 5, y sustituirlo en la ecuacion

8 - $5 = 4.2689 X + 7.82$

9.- Despejar X

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

11.- (-0.6605)

12 - Antilog (-0.6605)

13 - 0.218

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

Anexo - C

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook 1

Normality Test: Failed ($P < 0.050$)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 1 in Notebook 1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Control	3	0	96.000	95.250	97.500
Calcofluor M2r	3	0	37.000	28.750	49.600
Metronidazol	3	0	35.000	32.000	38.000
NaF	3	0	58.000	45.925	70.000
Cafena	3	0	64.000	59.500	65.950
Teofilina	3	0	64.100	60.950	67.025
EM <i>C.texana</i>	3	0	54.200	51.650	56.300

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

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

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

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test)

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0.05
Control vs Metronidazol	59.000	4.817	Yes
Control vs Calcofluor M2r	56.000	4.572	Yes
Control vs EM <i>C.texana</i>	43.000	3.511	Yes
Control vs NaF	30.000	2.449	Do Not Test
Control vs Cafena	23.000	1.878	Do Not Test
Control vs Teofilina	18.000	1.470	Do Not Test
Teofilina vs Metronidazol	41.000	3.348	No

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

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

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

GLOSARIO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Eucariotas (del griego *eu* – bueno, verdadero, *karyon* – núcleo, nuez): organismos caracterizados por poseer células con un núcleo verdadero rodeado por membrana. El registro arqueológico muestra su presencia en rocas de aproximadamente 1 200 a 1500 millones de años de antigüedad.

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

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

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

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

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

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

por medio de una serie de enzimas para cubrir las necesidades energeticas de nuestro organismo Las glucogenosis son enfermedades en donde existen deficiencias congénitas de la mayoría de las enzimas relacionadas con el metabolismo del glucogeno, en donde los organos mas afectados son el higado y el musculo esqueletico

Glucosa: Molecula ($C_6H_{12}O_6$) es una aldohexosa (aldehido pentahidroxilado) y un monosacarido La glucosa es el compuesto organico mas abundante de la naturaleza Es la fuente principal de energía de las celulas, mediante la degradacion catabolica, y es el componente principal de polimeros de importancia estructural como la celulosa y de polimeros de almacenamiento energetico como el almidon, es encontrada en las frutas y en la miel.

Glutaraldehído: Fue descubierto por David Domingo Sabatini, científico y medico argentino, quien encontro que sustancia se encarga de preservar las celulas, posibilitando su analisis en el microscopio un mayor lapso de tiempo

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

Organelos (del griego *organon* – herramienta). Estructuras subcelulares que realizan determinadas funciones (generalmente estan rodeadas por membranas y se las encuentra en las celulas eucariotas) p ej.. mitocondrias, cloroplastos, nucleo

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

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

Polimero(del griego *polys* – muchos, *meros* parte) Molecula compuesta por muchas subunidades identicas o similares

Pseudopodos del griego *pseudēs* falso, *podos* pie

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

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

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

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

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

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

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

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

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

