

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS



INFLUENCIA DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNETICOS  
DE 60 HZ DE FRECUENCIA SOBRE EL  
CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION  
DE *Entamoeba invadens*

T E S I S

QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO  
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN MICROBIOLOGIA

P R E S E N T A

Q.B.P. ABRAHAM OCTAVIO RODRIGUEZ DE LA FUENTE

MONTERREY, NUEVO LEON    DICIEMBRE DE 1999

TM

RC121

A5

R6

1999

c.1



1080092557

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INFLUENCIA DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNETICOS  
DE 60 HZ DE FRECUENCIA SOBRE EL  
CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION  
DE *Entamoeba invadens*

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO  
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA:

Q.B.P. ABRAHAM OCTAVIO RODRIGUEZ DE LA FUENTE

MONTERREY, NUEVO LEON    DICIEMBRE DE 1999

TM

RC 121

.AS

RC

1999



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**INFLUENCIA DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNETICOS DE 60 HZ DE  
FRECUENCIA SOBRE EL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION DE  
*Entamoeba invadens***

**TESIS**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON  
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

**PRESENTA**

**Q.B.P. ABRAHAM OCTAVIO RODRIGUEZ DE LA FUENTE**

MONTERREY, N.L.

DICIEMBRE DE 1999

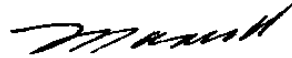
**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INFLUENCIA DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE 60 HZ DE FRECUENCIA  
SOBRE EL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN DE *Entamoeba invadens***

**TESIS  
QUE EN OPCIÓN AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGÍA**

**PRESENTA**

**Q.B.P. ABRAHAM OCTAVIO RODRIGUEZ DE LA FUENTE**



**DIRECTOR INTERNO**

**Dr. MARIO RODOLFO MORALES VALLARTA**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INFLUENCIA DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE 60 HZ DE FRECUENCIA  
SOBRE EL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN DE *Entamoeba invadens***

**TESIS  
QUE EN OPCIÓN AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGÍA**

**PRESENTA**

**Q.B.P. ABRAHAM OCTAVIO RODRIGUEZ DE LA FUENTE**



**DIRECTOR EXTERNO**

**Dr. BENITO DAVID MATA CARDENAS**



INFLUENCIA DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNETICOS DE 60 HZ DE FRECUENCIA  
SOBRE EL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION DE *Entamoeba invadens*

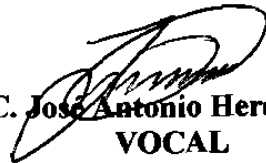
**Aprobación por comité de Tesis**



**Dr. Benito David Mata Cárdenas  
PRESIDENTE**



**Dr. Mario Morales Vallarta  
SECRETARIO**



**M. C. José Antonio Heredia Rojas  
VOCAL**



**Dra. Licet Villarreal Treviño  
VOCAL**



**Dr. Javier Vargas Villarreal  
VOCAL**

## **DEDICATORIA**

**A MI MADRE POR TODO EL AMOR Y APOYO INCONDICIONAL QUE ME  
HA BRINDADO PARA REALIZARME COMO PERSONA. GRACIAS  
MUCHAS GRACIAS A TI.**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Javier Vargas por sus atinados consejos durante la elaboración de esta Tesis.

A todo el personal de Biomedicas que me apoyo con un ambiente agradable en mi avance como estudiante de Postgrado.

Al Dr. Mario Morales Vallarta y a la Dra. Licet Villarreal Treviño por sus consejos para la realización de esta obra.

A Andrés Mendiola, Diana Caballero, Jessica, Gerardo, Sandra y a todos los demas integrantes del departamento de Ciencias Exactas y de Apoyo que me han dejado valiosas experiencias en mi vida.

Al M.C. Juan Manuel Adame por todo el apoyo brindado durante mi realización como profesional.

A mis compañeros de generación Aldo Richard y Eduardo Avalos por ser amigos de siempre.

A la Dra. Julia Verde Star y a la Dra. María Luisa Rodríguez Tovar por todo el apoyo brindado para la elaboración de esta Tesis

Un agradecimiento muy especial al Dr. Benito Mata por todo el apoyo recibido y que a pesar de ser un erudito académicamente mantiene la humildad que muchos doctores deberian de mantener.

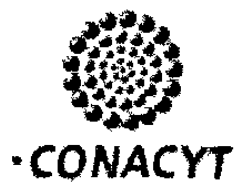
A Lucy, Betty y Karen y por brindarme su amistad.

Al M.C. José Antonio Heredia Rojas por el apoyo brindado como maestro, amigo y hermano incondicional durante todos mis estudios.

Y quiero dar un agradecimiento a todas aquellas personas que participaron en la realización de este documento.

## **AGRADECIMIENTO ESPECIAL**

**QUIERO AGRADECER ESPECIALMENTE EL APOYO BRINDADO POR EL CONACYT PARA CURSAR LA MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA Y PARA LA ELABORACION DE ESTA TESIS.**



## CITAS

“ Es indudable que si todos los hombres de bien hicieran a un lado sus egoísmos y se mezclasen en asuntos públicos, los pueblos estarían gobernados sabiamente y serían los hombres de mas mérito y virtud los que ocuparían los puestos mas elevados; y es natural que hombres así harían el bien y acelerarían la evolución de la humanidad”.

**Francisco I. Madero.**

“ Mirad que yo os envío como ovejas en medio de lobos. Ser pues, astutos como las serpientes, e inofensivos como las palomas “ .

**San Marcos 8:34**

“ Cada cumplimiento de cada etapa no se debe ver como el fin, sino como el inicio a otra nueva etapa ”.

**Abraham Rodríguez de la Fuente**

“Todo lo moralmente justo deriva de una de esas cuatro fuentes: la percepción plena o la deducción inteligente de lo que es cierto, la preservación de una sociedad organizada donde cada hombre reciba lo que merece y todas las obligaciones sean fielmente cumplidas, la grandeza y la fuerza de un espíritu noble e invencible, o el orden y la moderación en todo lo dicho y hecho, es decir, la templanza y el dominio de uno mismo”.

**Cicerón (55-44 a.de C.)**

## INDICE

<b>DEDICATORIA</b>	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>II</b>
<b>CITAS</b>	<b>IV</b>
<b>INDICE</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
Campos electromagnéticos (CEM)	3
Solenoides o bobina	5
Amibas	5
Metronidazol	8
Efectos biológicos de los CEM	9
Efecto de los CEM en microorganismos	11
<b>IMPORTANCIA</b>	<b>13</b>
<b>ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACION</b>	<b>14</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>MATERIALES</b>	<b>16</b>
1. Origen de los reactivos	16
2. Material biológico	16
3. Medio de cultivo	16
4. Preparación de suero bovino	17
5. Medio de cultivo TYI-S-33 sin glucosa para el enquistamiento	17
6. Solenoides	18
7. Preparación de metronidazol	18

<b>METODO</b>	
1.- Cinética de crecimiento de <i>Entamoeba invadens</i>	19
1.A Mantenimiento del cultivo de <i>E. invadens</i>	19
1.B Cinética de crecimiento de <i>E. invadens</i> en medio BI-S-33	19
2.- Enquistamiento de <i>E. invadens</i>	19
3.- Sistema de exposicion a CEM	20
4.- Exposición a CEM de 60 Hz durante la cinética de crecimiento de <i>E. invadens</i>	21
5.- Determinación de la DL <sub>50</sub> de metronidazol en <i>E. invadens</i>	21
6.- Determinación de la acción combinada de los CEM y el metronidazol sobre el crecimiento de <i>E. invadens</i>	22
7.- Evaluación de los CEM de 2.0 mT y el porcentaje de enquistamiento de <i>E. invadens</i>	22
8.- Procesamiento estadístico	23
<b>RESULTADOS</b>	24
1.- Cinética de crecimiento de <i>E. invadens</i>	24
2.- Efecto de los CEM sobre el crecimiento de <i>E. invadens</i>	24
3.- Determinación de la DL <sub>50</sub> de metronidazol en el crecimiento de <i>E. invadens</i>	25
4.- Efecto sinérgico de los CEM y el metronidazol sobre el crecimiento de <i>E. invadens</i>	26
5.- Efecto de los CEM sobre el por ciento de enquistamiento	26
<b>TABLA 1</b>	25
<b>FIGURAS</b>	28
<b>DISCUSION</b>	38
<b>PERSPECTIVAS</b>	42
<b>CONCLUSIONES</b>	43
<b>LITERATURA</b>	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

a. de C  
CEM  
°C  
cm  
DNA  
DL<sup>50</sup>  
E  
g  
µg  
H  
Hz  
ml  
µl  
Min  
pH  
P  
RNA  
R.P.M.  
T  
µT  
mT  
%  
Kv/m  
V

Antes de Cristo  
Campo electromagnético  
Grados centígrados  
Centímetro  
Acido desoxirribonucleico  
Dosis letal para matar al 50 % de los organismos  
*Entamoeba*  
Gramo  
*Microgramo*  
Horas  
Hertz  
Mililitro  
Microlitro  
Minutos  
Potencial de iones hidronio  
Probabilidad  
Acido Ribonucleico  
Revoluciones por minuto  
Tesla  
Microtesla  
Militesla  
Porciento  
Kilovolts por metro  
Volts



## RESUMEN

En los últimos años se ha producido un gran interés, sobre los efectos biológicos de los campos electromagnéticos (CEM). Se ha investigado intensamente el efecto de los CEM con distintas intensidades y diferente distribución espacial y temporal sobre el crecimiento de los microorganismos. Las respuestas han sido muy diversas dependiendo no solo del tipo de microorganismo estudiado, sino también de las características del campo empleado. En este trabajo se determinó el efecto de los CEM sobre el crecimiento y diferenciación en *Entamoeba invadens*, además se evaluó el efecto sinérgico de los CEM y el metronidazol. Se seleccionó este parásito ya que frecuentemente los resultados obtenidos con este microorganismo son comparados con *E. histolytica*, que es el agente causal de la amibiasis humana, y además porque con *E. invadens* se puede inducir la producción de quistes en el laboratorio, lo cual no es posible con *E. histolytica*.

Con la intención de establecer los cultivos de referencia de *E. invadens* se determinó la cinética de crecimiento de este protozoario. Este se hizo crecer en el medio BI-S-33 descrito por Diamond en 1978. Una vez establecido en este medio se realizó una cinética de crecimiento; donde se encontró que *E. invadens* presentó un tiempo de duplicación de 58.82 horas, con un rendimiento máximo de 240,000 amibas/ml incubadas a 25 °C por 12 días.

Cuando se analizaron los efectos de los CEM de 1.0, 1.5 y 2.0 mT (miliTesla) a 60 Hz (Hertz) en el crecimiento de *E. invadens* se encontró que este parásito disminuyó su densidad poblacional en un 41.1 % con los CEM de 1.5 y 2.0 mT a los tres y seis días de incubación. Por otra parte a los 9 y 12 días de incubación se observó también una disminución en los grupos tratados, sin embargo esta disminución fue menor a los días previos, ya que en este caso se encontró un 23.9 y 20 % de disminución con respecto al testigo. Es de llamar la atención que con la dosis de 2.0 mT en todos los días presentó la mayor disminución de crecimiento de *E. invadens* ( $P < 0.05$ ).

Con objeto de probar el efecto combinado de los CEM y una droga anti-amibiana como es el metronidazol primeramente se determinó la concentración óptima de metronidazol que causaba el 50 % de muerte en *E. invadens*, encontrándose que con este agente anti-amibiano se requiere una dosis de 2.76 µg/ml para obtener esta

condición. Posteriormente se expusieron las amibas a esta dosis de 2.76  $\mu\text{g/ml}$  combinada con un CEM de 2.0 mT y se comparó con amibas expuestas al campo magnético únicamente y un grupo testigo negativo no expuesto a factores físicos o químicos. Se encontró una disminución aproximada del 60% en el crecimiento de este microorganismo en todos los tratamientos con respecto al testigo no tratado. Sin embargo no se encontró diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de los trofozoítos entre cada tratamiento ya mencionado.

Por otra parte también se evaluó el efecto de los CEM sobre el porcentaje de producción de quistes de *E. invadens*. Para ello se utilizaron 3 tratamientos: a) cuando se expusieron los trofozoítos de *E. invadens* a un CEM de 2.0 mT a 60 Hz solo en la fase de crecimiento en medio BI-S-33 se encontró una pequeña disminución de los grupos tratados de 6.80 % comparado con el grupo testigo, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa, b) en ausencia de glucosa en el medio TYI-S-33 a 2.0 mT a 60 Hz, se obtuvo una disminución de la producción de quistes de un 28 % con respecto a los grupos testigo siendo esta disminución significativa y c) cuando se expusó a CEM de 2.0 mT tanto en la fase con glucosa (BI-S-33) como en la fase carente de glucosa (TYI-S-33) se encontró una disminución del 26.24 % la cual fue estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

Con estos resultados se concluye que los CEM de 60 Hz, tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y la diferenciación de *E. invadens*.

## ANTECEDENTES

### CAMPOS ELECTROMAGNETICOS (CEM)

Desde tiempos muy remotos el hombre ha tenido noticia de los fenómenos *magnéticos*. Así desde los años 640-546 a. de C. Tales de Mileto hablaba de las atracciones magnéticas. Mas recientemente hace 2,000 años los chinos desarrollaron la brújula magnética para la navegación y sus viajes en los desiertos de Mongolia. La brújula se fundamenta en adoptar una orientación, la cual es ejercida por un campo magnético circundante (Wood, 1991). Pero no es hasta los últimos años cuando a los CEM se les ha estudiado intensamente.

El campo magnético es la región en el espacio en la cual un objeto magnetizado puede a su vez magnetizar a otros cuerpos de naturaleza ferromagnética o paramagnética. Recientemente se descubrió que la configuración del campo magnético puede obtenerse con el auxilio de una brújula o con limaduras de hierro. Por otro lado si se rompe un imán en un intento de separar los polos, se encuentran otros nuevos formados en los extremos rotos; si uno de esos pedazos se rompe, otra vez aparecen de nuevo dos polos de clase opuesta. Tantas veces como se repita este proceso se tiene el mismo resultado y por lo tanto no es posible obtener un polo magnético aislado (Stewart, 1979).

En 1820 el Físico Danés Hans Oersted observó que una corriente eléctrica puede cambiar la orientación de la aguja de una brújula en forma semejante a como lo hace un imán. Este descubrimiento puso de manifiesto que en un conductor con corriente alterna existe también un campo magnético y que el movimiento de cargas eléctricas está íntimamente relacionada con el origen de los campos magnéticos (Galar-Castelan, 1988).

Por otra parte, se dice que existe un campo eléctrico en un punto, si actúa una fuerza de origen eléctrica sobre un cuerpo estacionario cargado situado en

dicho punto. Cualquier otra carga eléctrica colocada en un punto de ese campo eléctrico, experimenta una fuerza producida por su interacción con la primera carga. La intensidad del campo eléctrico en un punto es igual a la fuerza que el campo ejerce sobre una unidad de carga eléctrica colocada en dicho punto (Lin, 1994).

Cuando los campos magnéticos y eléctricos varían con el tiempo en una determinada región, se dice que ambos campos están estrechamente relacionados. Es decir, todo campo eléctrico que varía con el tiempo va siempre acompañado de un campo magnético, también variable y a la inversa, por lo cual si se produce un campo magnético, este va acompañado de otro campo eléctrico asimismo variable. Esta interrelación entre los campos eléctricos y magnéticos hace que se hable más bien de un CEM como una sola entidad física (Parker, 1993).

Los CEM pueden clasificarse en: a) homogéneos: en los cuales la intensidad es uniforme en el área determinada, b) heterogéneos: en los que el campo magnético es variable con respecto al área, c) estáticos: en los cuales la intensidad es constante con respecto al tiempo y d) oscilantes: que presentan variación de la intensidad a una frecuencia determinada. (Pothakamury, 1993).

Las oscilaciones electromagnéticas en la región de bajas frecuencias y longitudes de onda muy largas, como aquellas de los circuitos domésticos de 60 Hz, irradian muy poca energía, ya que se sabe que la energía de una onda electromagnética es directamente proporcional a su frecuencia e inversamente proporcional a su longitud de onda. A medida que la frecuencia aumenta, se llega a longitudes de onda muy cortas y las radiaciones de esta clase llegan a depositar una cantidad de energía tan considerable que a tales emisiones se les denomina radiaciones ionizantes, como por ejemplo; los rayos X y Gamma. Por ello las radiaciones generadas por los CEM de frecuencia de 60 Hz son del tipo no ionizante, es decir, los efectos que se producen son por mecanismos diferentes a aquellos que

involucran el desplazamiento de electrones en átomos y moléculas blanco (Strother, 1980, Rojo, 1981).

La frecuencia que se usó en esta investigación es similar a la producida por la corriente eléctrica alterna de los cables de tendido eléctrico, ésta varía como una onda senoidal con frecuencia de 60 Hz. Los CEM generados por estas corrientes, tienen esa misma frecuencia y por tanto se encuentran en la región del espectro electromagnético denominado de frecuencia extremadamente baja, región comprendida entre los 3 y  $3 \times 10^3$  Hz (Muñoz, 1994).

### **SOLENOIDE O BOBINA**

Un solenoide o bobina es un conjunto de espiras de alambre conductor (por lo general de cobre) que se disponen una a continuación de la otra. Si se hace un corte longitudinal del solenoide, se puede ver la sección transversal del alambre que forma cada espira, tanto en la parte superior como inferior. Si se coloca un núcleo de un material ferromagnético en el interior del solenoide se tiene un electroimán. Magnéticamente el alambre se comporta casi como si fuera un alambre recto y las líneas de campo magnético debidas a una espira, son casi círculos concéntricos (Moreno-Trujillo, 1997).

### **AMIBAS**

Las especies de la familia *Entamoebidae* son parásitos o comensales del sistema digestivo de artrópodos y vertebrados. Los géneros y especies se diferencian por sus estructuras nucleares. Cuatro géneros de esta familia son parásitos o comensales conocidos de seres humanos y de animales domésticos, siendo estos: *Entamoeba*, *Endolimax*, *Iodamoeba* y *Dientamoeba*. (Roberts and Schmidt., 1984).

La familia *Endamoebidae* está formada por organismos llamados amibas, éstas presentan dos estadios en su ciclo vital: el trofozoíto y el quiste. El trofozoíto es la forma motil del protozoario, éste es microaerofílico, carece de mitocondrias y de aparato de Golgi, vive y se multiplica por algún tiempo en las criptas del intestino grueso, utilizando las secreciones mucosas y bacterias como alimento. Mide entre 9-20 micrómetros, vive en el tracto digestivo de varios animales vertebrados que le sirven de huésped y la multiplicación es por división binaria. El enquistamiento inicia cuando los trofozoítos se condensan primero en una masa esférica, formando así el prequiste, que éste es un estadio intermediario entre los trofozoítos y los quistes. Después de un tiempo el prequiste sintetiza una cubierta de quitina para formar la pared celular y hay una reorganización de la estructura nuclear para dar paso al estadio de quiste. El quiste es el estadio infectivo de la amibiasis, es común y la diferencia genérica se fundamenta en las características del núcleo. El desenquistamiento se produce cuando los quistes pasan por los jugos gástricos y este debilita la pared celular del quiste y permiten que los trofozoítos metaquísticos-trofozoítos de menor tamaño y con un solo núcleo-salgan al exterior, resultando que por cada quiste se desarrollen 8 trofozoítos metaquísticos y finalmente los trofozoítos metaquísticos son arrastrados hacia el ciego en el intestino grueso, ahí se alimentan y crecen, presentándose la colonización y llegando a convertirse en trofozoítos maduros y se completa así el ciclo de desarrollo (Beaver P.C., 1986).

Los miembros de *Entamoebidae* se caracterizan por su núcleo y un pequeño endosoma localizado centralmente. Existe un número variable de gránulos cromáticos periféricos adheridos a la membrana nuclear, además posee cromatina en el endosoma y en la región periférica. (Beaver P.C., 1986)

Así mismo Roberts y Schmidt (1984) mencionan que las especies de *Entamoeba* tienen un núcleo vesicular con un pequeño endoplasma cerca del centro. En la periferia del núcleo hay dispuestos gránulos de cromatina y en algunas especies también alrededor del endosoma. El citoplasma contiene

diversas vacuolas alimenticias que frecuentemente presentan partículas de alimento en proceso de digestión, generalmente bacterias o gránulos de almidón. Al nivel de ultraestructura se observan lisosomas y algo de retículo endoplásmico así como abundantes ribosomas.

En los vertebrados, así como en los invertebrados hay especies de *Entamoeba* que son parásitos para ellos. En los seres humanos son comunes cuatro especies del género *Entamoeba*: *E. histolytica*, *E. hartmanni*, *E. coli* y *E. gingivalis* (Levine N.D. 1973).

Las amibas del genero *Entamoeba* tienen importancia especial para su estudio por incluir especies parásitas y patógenas para el hombre y algunos animales. De estas especies, las mas estudiadas y conocidas son *E. histolytica* y *E. invadens* (Rodhain., 1934)

La amibiasis representa un gran problema de salud pública en México y otros países. Esta enfermedad cuyo causal en el hombre es *E. histolytica*, es típica de los países con clima tropical. Sin embargo la disentería amibiana es bastante común y se le encuentra también en regiones templadas (Martinez-Palomo., 1987).

El detallado estudio de la morfología y ciclo vital de *E. invadens* realizado por Reiman y Ratcliffe tanto *in vitro* como *in vivo*, les condujo a concluir que *E. invadens* y *E. histolytica* son extraordinariamente semejantes, ya que morfológicamente son indistinguibles porque ambas Entamoebas son patógenas. Ambas producen un daño severo a células y tejidos y pueden producir la muerte de sus hospederos. Pero una diferencia que es fundamental entre ambas especies es que *E. invadens* puede ser enquistada y desenquistada en laboratorio, cosa que aun no es posible con *E. histolytica* (Rengpiem y Bailey., 1984). Por las razones antes mencionadas un sinnúmero de investigadores han utilizado a

*E. invadens* como un modelo biológico experimental para la investigación de la amibiasis, particularmente en aspectos de diferenciación (Feria y Treviño., 1972).

## **METRONIDAZOL**

El metronidazol es un compuesto derivado de un azomycina con actividad apreciable contra *Trichomonas vaginalis* (Cousar y Julou., 1959). Este compuesto corresponde al mismo grupo de los tinidazoles y ornidazoles y fue descubierto en la década de los años 50's cuando investigadores franceses intentaban crear un producto sintético derivado de un *Streptomyces spp.*

El metronidazol fue introducido inicialmente a los Estados Unidos en 1960 para el tratamiento de la tricomoniasis. A partir de ese momento se descubrió que este compuesto puede también ser útil para el tratamiento de otras enfermedades como la amibiasis, giardiasis, abscesos cerebrales, y enfermedad de Crohn (Ursing y cols., 1975; Korner y Jensen, 1976).

Mas tarde con las contribuciones de diferentes investigadores se logró determinar el mecanismo de acción del metronidazol encontrándose que este compuesto primero penetra en la célula blanco, después se presenta una reducción de los grupos nitros, seguido de un efecto citotóxico de los productos reducidos y finalmente se presenta una liberación de los productos que son inactivos. El metronidazol ataca principalmente en los intermediarios del RNA, DNA o proteínas del organismo (Muller M, 1983).

La acción del metronidazol y derivados del 5-nitroimidazol, se caracterizan por provocar muerte selectiva de anaerobios procariotes y eucariotes. Por otra parte se ha demostrado en algunos estudios que el metronidazol es tanto mutagénico como carcinogénico (Legator y cols., 1975; Rustia y Shubik 1975). Sin embargo no hay trabajos realizados en humanos expuestos durante largos periodos (Beard y cols., 1979., Wynder y cols., 1954)



## EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS CEM

Las ondas de radio y algunos tipos de luz ultravioleta son algunas radiaciones no ionizantes a las que el hombre está frecuentemente expuesto. Los efectos biológicos de las ondas de radio están siendo determinados en la actualidad; mientras que el daño que produce la luz ultravioleta se conoce con mayor claridad, y es que daña principalmente al DNA y este daño se ha relacionado con la formación de dímeros de timina, que es la lesión más frecuentemente inducida por esta radiación. Por lo general, estos daños son eliminados por las células a través de mecanismos de reparación por excisión. Si las células expuestas no son eficientes en este tipo de reparación, el daño al DNA permanecerá y la célula sufrirá alteraciones considerables como en el caso del *Xeroderma pigmentosum* y del cáncer en la piel (Brusik, 1987).

Por otro lado, radiaciones no ionizantes de extremadamente baja frecuencia, como es el caso de los campos magnéticos de 60 Hz han mostrado tener efecto sobre los sistemas biológicos de eucariotes y procariotes estudiados hasta ahora y se sabe que éstos pueden afectar la velocidad de las reacciones enzimáticas y una gran cantidad de procesos bioquímicos (Galar-Castelan, 1988; Goodman y cols, 1993; Lin, 1994).

Asimismo, se ha informado que los CEM de extremada baja frecuencia tienen efectos sobre procesos bioquímicos importantes en el humano, como en la síntesis de DNA, RNA y proteínas, cambios en la producción de hormonas, modificación de la respuesta inmune celular y cambios en el grado de crecimiento y diferenciación celular (Tenforde, 1991).

También se han obtenido evidencias experimentales que sugieren que los CEM afectan el crecimiento y la síntesis de DNA en varios tipos de células de origen procariotes y eucariotes (Cantini y cols. , 1987; Goodman y cols., 1983;

Liboff y cols., 1984; McLeod y cols., 1987; Rodan y cols., 1978; Takahashi y cols., 1987; Yen Patton y cols., 1988).

Se ha evaluado también el efecto de los CEM y campos eléctricos en embriones de ratón. En este estudio, se expusieron ratones C3H/He machos a un campo eléctrico de 20 kV/m de 50 Hz de frecuencia por dos semanas. Después, a cada ratón macho lo aparearon con 2 hembras diferentes cada semana durante un período de 8 semanas, para que las hembras fueran preñadas por los ratones que habían sido expuestos al campo eléctrico. Los resultados obtenidos no demostraron efecto significativo de los CEM sobre la sobrevivencia de los embriones, por lo cual ellos concluyen que los CEM de extremada baja frecuencia no afectan al proceso de desarrollo del embrión (Kowalczyk y cols; 1990).

También en otro estudio Nordstrom y cols. (1983) encontraron un incremento en la frecuencia de malformaciones congénitas en niños de Suecia cuyos padres trabajaban en subestaciones eléctricas, lo cual podría indicar efecto genotóxico por los CEM.

Por otra parte se sabe que los CEM de baja frecuencia son utilizados en la actualidad como herramienta para producir una variedad de efectos benéficos en algunos sistemas biológicos. Ejemplo; los campos magnéticos pulsantes son usados para la reparación de fracturas óseas ya que se observó que el tejido óseo es sensible a campos magnéticos y eléctricos de baja frecuencia. Actualmente también se está utilizando los CEM en personas con osteoporosis dando resultados muy alentadores (Andrew y cols., 1989).

## EFFECTO DE LOS CEM EN MICROORGANISMOS

Se han realizado recientemente estudios en los que encuentran que los microorganismos son sensibles a los CEM, por ejemplo, Ramón y cols (1987) expusieron a CEM de 800-1,000 Hz con intensidades entre 0.8 y 2.5 mT a *Bacillus subtilis* mutante FJ7, para evaluar el efecto en el crecimiento, encontrando un aumento en el número de células comparado con el grupo control de referencia, además de modificarse la morfología de dicho bacilo, por lo cual, concluyeron que el campo magnético puede alterar el crecimiento del microorganismo. Por otro lado Tabrah y cols (1994) expusieron a *Salmonella typhimurium* a un CEM sinusoidal de 0.2 mT en conjunto con el mutágeno azida de sodio por 48 horas donde encontraron un incremento en la tasa de mutación del orden del 14% en comparación con el grupo testigo.

Más recientemente se ha investigado el efecto de los CEM sobre la inactivación del crecimiento sobre el género *Saccharomyces* que están presentes en yoghurt y jugo de naranja. Al exponer el yoghurt a una intensidad de 40 T (Tesla), se encontró una disminución apreciable en el número de microorganismos en dichos productos. (Pothakamury y cols. 1993).

En otros estudios se ha observado que el CEM de ultra alta frecuencia puede destruir varios microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Nostoc muscorum* y *Euglena gracilis* (Antonov y cols. 1997).

En un trabajo reciente Alipov y cols. (1994) aplicaron CEM de 30  $\mu$ T con frecuencia de 7-12 Hz en *Escherichia coli* cepa K12AB1157 y demostraron que se afecta la conformación del genoma, división celular, síntesis de DNA y proteínas.

Por otro lado, existen estudios acerca de los efectos de los campos electromagnéticos sobre protozoarios. Ripamonti y cols. (1981) expusieron a *Spirotomum ambiguum* a un campo magnético homogéneo estático de 12,500 mT,

para evaluar el efecto sobre la sobrevivencia del protozooario previamente expuesto al agente tóxico 2,2 dipiridil disulfuro. Ellos encontraron que los protozoarios tratados con el campo magnético se disminuía significativamente su sobrevivencia, además de que se alargaba el ciclo celular. Ellos concluyen que el campo magnético con las características utilizadas, altera la regulación de los iones calcio a través de la membrana de este protozooario.

Dihel y cols. (1985) expusieron a *Paramecium* con un CEM pulsante de 72 Hz de frecuencia. Ellos observaron que dicho campo incrementa la división celular de *Paramecium* en un 8.5%. Ellos sugiere que los campos electromagnéticos afectan el transporte de iones calcio a través de la membrana celular.

En un estudio realizado por Rosen y Rosen (1990) se determinó la influencia de un campo magnético estático moderadamente intenso sobre los patrones del movimiento libre de *Paramecium sp.* Cuando la exposición a los campos magnéticos fue de 126 mT estos protozoarios ciliados exhibieron una reducción significativa en cuanto a su velocidad, así como también una desorganización del patrón de movimiento. Ellos sugirieron que estos hallazgos pueden ser explicados sobre las bases de la alteración de las funciones de los canales iónicos que se encuentran en la membrana celular.

Más recientemente Hemmersbach y cols. (1997) estudiaron el efecto de los campos electromagnéticos de 0.5-2.0 mT de 50 Hz sobre *Paramecium biaurelia*, *Loxodes striatus* y *Tetrahymena thermophila*. Encontraron que se afectaba la velocidad de nado y una disminución en la dirección lineal en las células nativas. Sin embargo cuando se manejaba la mutante de *Paramecium tetraurelia* (se caracteriza por ser defectuosa en los canales de calcio), no se observaba cambio en movimiento del mismo. Estos resultados indican un efecto directo de los campos electromagnéticos de muy baja frecuencia sobre los mecanismos de transporte de iones en la membrana celular que controlan la actividad motil del ciliado.

## IMPORTANCIA

Conforme la tecnología ha avanzado, todo tipo de sistemas biológicos se ven cada vez más expuestos a radiación generada por aparatos eléctricos de uso doméstico y de oficina, por lo cual resulta de gran interés, saber cuales son los efectos que ocasionan los CEM sobre la fisiología de los organismos. Existen numerosos informes que mencionan los efectos benéficos de los campos (reparación ósea e inactivación microbiana), sin embargo existen sospechas que los CEM pueden ocasionar trastornos y enfermedades en el humano como podrían ser cáncer de mama, cáncer de cerebro y leucemia infantil entre otros. Por otro lado no solo el hombre sino también los microorganismos que son expuestos a este factor pueden sufrir alteraciones fisiológicas.

El protozooario patógeno *E. histolytica* es el agente que provoca amibiasis y tiene mucha importancia en salud pública, ya que este parásito es el causante de amibiasis intestinal; además de que puede ocasionar abscesos hepáticos, que pueden llegar a la muerte del hospedero. Además la amibiasis es una de las primeras causas de morbimortalidad en México. Por otro lado, hasta la fecha no se tienen reportes científicos sobre cuáles serían los efectos de los CEM sobre el crecimiento y la diferenciación del genero *Entamoeba* ya que en la actualidad no existe información sobre este modelo biológico.

Por ello en esta investigación se determinó el efecto de los CEM sobre *E. invadens* ya que es un protozooario en el que se pueden cuantificar los cambios en su crecimiento y diferenciación *in vitro*, cosa que no se puede hacer con *E. histolytica* ya que ésta no presenta una diferenciación a nivel del laboratorio.

## ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACION

En los últimos años se ha estudiado de manera muy intensa el efecto de los CEM sobre funciones vitales en el crecimiento y diferenciación de células eucarióticas.

Hasta la fecha existe una gran cantidad de reportes científicos que mencionan los efectos de los CEM sobre la inhibición e inactivación en el crecimiento de algunas bacterias y hongos (Pothakamury y cols., 1993; Tabrah y cols., 1994). Sin embargo, hasta el momento hay poca información sobre efectos de los CEM en protozoarios en general, por lo cual resulta de gran interés poder determinar los efectos de los CEM en sistemas biológicos de este tipo. Por ello en el presente trabajo, se evaluó el efecto de diferentes intensidades magnéticas sobre el crecimiento y diferenciación de *E. invadens*. Además se determinó si existe un efecto sinérgico entre los CEM y el metronidazol sobre el crecimiento de *E. invadens*.

## HIPOTESIS

Los CEM de 60 Hz a las intensidades de 1.0, 1.5 y 2.0 mT son capaces de afectar el crecimiento y diferenciación de *E. invadens in vitro*.

## OBJETIVOS

1.- Determinar la cinética de crecimiento de *E. invadens* en condiciones de laboratorio en el medio BI-S-33 (hasta por 12 días).

2.- Obtener algunos parámetros del crecimiento de *E. invadens* como: a) la densidad total y b) el tiempo de duplicación.

3.- Evaluar el efecto de los CEM a 1.0 mT, 1.5 mT y 2.0 mT de 60 Hz de frecuencia sobre el crecimiento de *E. invadens*.

4.- Determinar la concentración óptima de metronidazol para obtener el 50 % de muerte de *E. invadens* en los cultivos bajo nuestras condiciones de laboratorio.

5.- Demostrar el efecto combinado de los CEM de 2 mT de 60 Hz de frecuencia y la concentración de metronidazol que produce un 50 % de muerte amibiana durante el crecimiento de *E. invadens*.

6.- Establecer el efecto de los CEM de 2 mT de 60 Hz de frecuencia sobre la diferenciación (producción de quistes) de *E. invadens* bajo tres condiciones: a) en el crecimiento de *E. invadens* en el medio BI-S-33, b) en ausencia de glucosa en el medio TYI-S-33 y c) en ambas condiciones.

## MATERIALES

### 1. Origen de los reactivos.

Todos los compuestos químicos utilizados en este trabajo fueron grado reactivo y sus orígenes fueron: a) Reactivos Monterrey: cloruro de sodio, fosfato de potasio monobásico, hidróxido de sodio, fosfato de potasio dibásico y ácido ascórbico b) Bioxon: extracto de levadura y peptona de caseína d) Sigma: dextrosa, L-cisteína, metronidazol y citrato férrico de amonio e) J.R.H. Biosciences: vitaminas 107 de Diamond f) BBL: Biosate.

### 2. Material biológico.

Cepa IP-1 de *E. invadens*.

Proviene del cepario del Dr. Benito David Mata Cárdenas, de la División de Biología Celular y Molecular del Laboratorio de Fisiología Bioquímica y Celular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste IMSS. Para las pruebas *in vitro* se utilizaron cultivos axénicos de *E. invadens*, cultivados en medio BI-S-33.

### 3. Medio de cultivo BI-S- 33 (Diamond y col., 1978)

Biosate 30 g, glucosa 10 g, NaCl 2.70 g,  $K_2HPO_4$  1.0 g,  $KH_2PO_4$  0.6 g, cisteína 1.0 g, ácido ascórbico 0.20 g y citrato férrico de amonio 0.0236 g.

1) Los componentes se mezclaron y disolvieron en 700 ml de agua bidestilada estéril. 2) Se ajustó el pH a 6.8 con NaOH 3) y se aforó a 850 ml 4) Se colocaron 10 ml de medio en tubos de tapón de rosca de 16X125 mm 5) y se esterilizó el medio en autoclave por 15 min a 121 °C, con los tapones flojos, los cuales se apretaron después, estando los tubos todavía calientes. 6) se almacenó el medio a 4° C en la oscuridad. 7) El medio completo se obtuvo añadiendo



asépticamente 9% de suero bovino a los tubos con medio BI-S-33, 24-48 horas antes de sembrar los trofozoítos.

#### 4. Preparación de suero bovino (Said-Fernández y col., 1988)

Se colectó la sangre bovina en el rastro de la ciudad. La sangre se dejó coagular por 24 h a 4°C y el suero se separó de la sangre por sedimentación a 2000 R.P.M./ 15 min. Después se prefiltró con papel Whatman #1 y se filtró por una serie de filtros HAWP Millipore (Beford, MA, USA) de 5 a 0.22 µm. Finalmente se esterilizó por filtración utilizando sistemas filtración al vacío de un litro con filtros de 0.22 µm (Coming, Inc. Coming NY, USA). El suero estéril fue descomplementado por calentamiento a 56 °C por 30 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le añadió 25 ml de mezcla de vitaminas (JRH Biosciences, Lenexa, KS) por cada litro de suero. El suero se repartió en alícuotas de 100 ml, en botellas ámbar, estériles, de vidrio con tapón de rosca y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

#### 5. Medio de cultivo TYI-S-33 sin glucosa para el enquistamiento (Diamond 1978)

Extracto de levadura 10 g, peptona de caseína 20 g, NaCl 2.70 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6 g, cisteína 1.0 g, ácido ascórbico 0.20 g, citrato férrico de amonio 0.0236 g.

### Preparación de TYI-S-33 para el enquistamiento sin glucosa

1) Todos los componentes se mezclaron y disolvieron perfectamente con 800 ml agua bidestilada 2) El medio se ajustó a pH 7.0 con NaOH 10 N y 3) Se aforó finalmente con 1,000 ml de agua bidestilada 4) Se colocó 10 ml de medio en tubos y posteriormente esterilizó en autoclave por 15 min a 121 °C con los tapones flojos, los cuales fueron apretados estando los tubos todavía calientes. 5) El medio se almacenó a temperatura ambiente en la oscuridad.

### 6.- Solenoides:

Se utilizó un solenoide conformado por 557 vueltas de alambre de cobre laqueado No 14 que va enrollado en una matriz cilíndrica de pvc de 27 cm de diámetro el cual es alimentado por un autotransformador variable Controvac-AC modelo A8CP el cual era regulado a su vez por un transformador reductor que permitía manejar el amperaje requerido para que se generara la intensidad magnética deseada (1.0, 1.5 y 2.0 mT)

### 7.- Preparación de Metronidazol

Solución madre 100 µg/ml: Se mezclaron 70 mg/ ml con 10 ml de medio BI-S-33. La solución 1 de 10µg/ml se preparó con 0.5 ml de la solución madre mas 4.5 ml de medio BI-S-33. Solución 2 de 1 µg/ml se preparó con 0.5 ml de la solución 1 mas 4.5 ml de medio BI-S-33. La solución 3 de 0.1 µg/ml se preparó con 0.5 ml de solución 2 mas 4.5 de medio BI-S-33.

## METODO

### 1.- CINETICA DE CRECIMIENTO DE *E. invadens*:

#### 1.A MANTENIMIENTO DEL CULTIVO DE *E. invadens*

Se incubaron las cepas de *E. invadens* a 25 °C por 7 días. Antes de cada resiembra se observaron los cultivos en un microscopio invertido para comprobar el buen aspecto morfológico y la movilidad de las amibas. Después se sumergieron suavemente los tubos en agua-hielo por 10 min, para luego de este tiempo se agitaron suavemente y se determinó la concentración amibiana con un hemacitómetro y se inocularon con 10,000 trofozoítos por ml cada tubo con 5 ml de medio nuevo que contenían medio BI-S-33 y 1.0 ml de suero bovino estéril más 0.1 ml de solución penicilina-estreptomicina (1,000 X) de acuerdo a las técnicas previamente establecidas (López-Revilla y Rodríguez-Baez, 1981).

#### 1.B CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *E. invadens* EN MEDIO BI-S-33.

Se inocularon 10,000 amibas/ml a 24 tubos con 10 ml de medio de cultivo adicionado con 1 ml de suero bovino y se incubaron a 25°C por 12 días. Cada punto corresponde a 2 repeticiones (4 tubos por repetición) y cada dos días determinamos el número de amibas/ml de medio con un hemacitómetro.

### 2.- ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*

Se utilizó el método descrito por Morales-Vallarta y cols (1997) el cual consistió de las siguientes etapas: a) crecimiento en medio BI-S-33 con glucosa: se inocularon 15,000 amibas/ml de *E. invadens* en tubos que contenían 10 ml de BI-S-33, 1.0 ml de suero bovino y 0.1 ml de solución penicilina-estreptomicina y se

gasearon cada uno de los tubos inoculados con CO<sub>2</sub> utilizando una pipeta Pasteur con un flujo de gas de 0.2 l/min por 2 minutos y después se incubaron por 7 días a 25 °C, en cada repetición se utilizaron 3 tubos. b) inducción de enquistamiento en presencia de CO<sub>2</sub> y ayuno de glucosa: en esta fase los tubos crecidos fueron enfriados a 4°C durante 20 minutos y después se centrifugaron a 1,200 r.p.m. por 5 minutos. Se eliminó el medio de cultivo mediante una bomba de vacío y se lavaron las células con medio TYI-S-33 sin glucosa, después se resuspendió el botón celular y concentró el paquete celular de tres tubos, cada tubo contenía 10 ml de TYI-S-33 sin glucosa, 1 ml de suero y 0.1 ml de antibiótico y posteriormente se gasearon los tubos como se mencionó anteriormente. Los tubos se incubaron a 25 °C por 10 días c) determinación del porciento de enquistamiento: después de 10 días de incubación a 25 °C los tubos se enfriaron por 20 minutos y se determinó el número de trofozoítos como amibas totales utilizando un hemacitómetro, después se obtuvo el paquete celular por centrifugación, y este se resuspendió en 10 ml de Tritón X 100 y se mantuvieron las células en suspensión por 10 minutos. Posteriormente se contó el número de quistes y se calculó el porcentaje de enquistamiento mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ de enquistamiento} = [(\text{Número de quistes/ml}) / (\text{Número de amibas totales})] \times 100$$

### **3.- SISTEMA DE EXPOSICION A CEM**

Durante el cultivo de las amibas, éstas fueron colocadas en el interior de un solenoide o bobina generadora del CEM, el cual estaba formado por un devanado de 340 vueltas de alambre de cobre calibre No.16 enrollado alrededor de un tubo de PVC, el cual tiene una altura de 25 cm, un radio de 5.27 cm y una resistencia de salida de 1.9 ohms. El solenoide está conectado a un transformador-reductor, con una alimentación de entrada de 127 V  $\pm$  10% con una salida de 12 V, éste a su vez estaba unido a un transformador variable que tiene un máximo de 140 V y 7.5 Amp de salida con una alimentación de 120 V y una frecuencia de 60 Hz. Este sistema de exposición se colocó en el interior de una incubadora que tuvo una temperatura constante de 36.5°C  $\pm$  0.1°C. En el presente estudio se utilizaron tres

intensidades magnéticas (1.0, 1.5 y 2.0  $\mu$ T) de onda de 60 Hz de frecuencia, esto fue constatado monitoreando el sistema con un osciloscopio. En el mismo sistema de incubación de los cultivos y en forma simultanea, se colocaron el testigo negativo y el control positivo en una área en la cual no recibieron la influencia del CEM. En la figura 10 se ilustra el sistema de exposición.

La medición del CEM se realizó mediante una bobina de prueba que al ser sometida a la influencia del campo detecta el voltaje (FEM inducida) que es proporcional a la intensidad del flujo magnético medido en mT. La bobina de prueba fue a su vez calibrada usando un gausímetro con una referencia de 10.1 Gauss (1.01 mT) es igual a 1.7 mV de corriente alterna detectados por la bobina de prueba. El voltaje (FEM inducida) fue de 1.08, 2.52 y 3.36 mV para 1.0, 1.5 y 2.0 mT respectivamente. Además se constató si el CEM producido era homogéneo además de la posible presencia de campos parásitos en el ambiente.

#### **4.- EXPOSICION A CEM DE 60 HZ DURANTE LA CINETICA DE CRECIMIENTO DE *E. invadens*.**

Se inoculó una serie de tubos con 10,000 amibas/ml y a estos tubos fueron expuestos a un CEM de 1.0, 1.5 y 2.0 mT de 60 Hz de frecuencia de onda sinusoidal en el interior de un solenoide con 12 repeticiones por tratamiento. El tiempo de exposición fue de 3,6,9 y 12 días. Después de este tiempo se determinó el número de amibas/ml utilizando un hemacitómetro y comparó el efecto de los CEM sobre el crecimiento a las dosis mencionadas con respecto a un grupo de amibas no expuesto a los CEM.

#### **5.- DETERMINACION DE LA DL<sub>50</sub> DE METRONIDAZOL EN *E. invadens***

Se determinó la concentración de metronidazol para inhibir el 50 % de la población de amibas de la cepa de *E. invadens*. Los trofozoítos fueron expuestos a diferentes concentraciones de 2, 4, 8, 10 y 20  $\mu$ g/ml de metronidazol diluido en

medio basal BI-S-33. Se agitaron los tubos con 10 ml y se inocularon con 10,000 amibas/ml por 4 repeticiones por tratamiento. Después los tubos se incubaron a 25 °C por siete días. Pasado este tiempo, se determinó el número de amibas por mililitro mediante un hemacitómetro y los resultados los procesamos por el método de análisis de Probit, donde pudimos obtener con exactitud la  $DL_{50}$  para este fármaco.

#### **6.- DETERMINACION DE LA ACCION COMBINADA DE LOS CEM Y EL METRONIDAZOL SOBRE EL CRECIMIENTO DE *E. invadens*.**

Para desarrollar este planteamiento inocularon tubos conteniendo 5 ml de medio BI-S-33, 1 ml de suero y 0.1 ml de antibiótico con 10,000 amibas/ml. En este caso se manejaron 4 grupos en total con 9 repeticiones cada uno los cuales fueron: 1) grupo testigo negativo, no expuesto a ningún factor de prueba 2) grupo testigo positivo, que consistió en utilizar la concentración de metronidazol a la cual se obtuvo la  $DL_{50}$  que fue de 2.76  $\mu\text{g/ml}$  3) grupo a los cuales se agregó una concentración de 2.76  $\mu\text{g/ml}$  de metronidazol para obtener la  $DL_{50}$  y se expusieron a un CEM de 2.0 mT en un solenoide y 4) grupo que consistió en solamente la exposición a 2.0 mT en el solenoide. Posteriormente los tubos de los cuatro grupos se incubaron a 25 °C por 7 días y finalmente se determinó el número de amibas por ml utilizando un hemacitómetro.

#### **7.- EVALUACION DE LOS CEM DE 2.0 mT y EL PORCENTAJE DE ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*.**

Para evaluar el efecto de los CEM de 2.0 mT de 60 Hz sobre el porcentaje de enquistamiento se realizó lo siguiente:

Para los grupos tratados como para los grupos control se utilizaron 6 repeticiones y se realizó el procedimiento que aparece en la sección de

enquistamiento para obtener los quistes de *E. invadens*, los tratamientos en presencia de un CEM de 2 mT que se utilizaron fueron los siguientes:

1.- Exposición de los CEM de 2.0 mT a 60 Hz en el crecimiento de *E. invadens* en el medio BI-S-33 por 7 días en presencia de CO<sub>2</sub> y no se expuso en el medio TYI-S-33 en ausencia de glucosa donde se incubo por 10 días.

2.- En la fase de enquistamiento en medio TYI-S-33 sin glucosa, se expusieron a 2.0 mT y 60 Hz y no durante el crecimiento en BI-S-33 los cuales se incubaron por 10 días.

3.- Exposición de CEM de 2.0 mT de 60 Hz de frecuencia en ambas fases. crecimiento en BI-S-33 y enquistamiento en ausencia de glucosa en TYI-S-33

Cada uno de estos experimentos se realizaron con 6 repeticiones por separado y se comparó con un grupo testigo no expuesto a los CEM.

## **8.- PROCESAMIENTO ESTADISTICO**

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se utilizaron pruebas paramétricas y no paramétricas. Posterior a la determinación de las estadísticas descriptivas correspondientes, las variables fueron sometidas a la prueba de Kolmogorov-Smirnov con objeto de conocer la distribución.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante la utilización del paquete estadístico SPSS para Windows 9X(Ferran, 1996).

## RESULTADOS

### 1.- CINETICA DE CRECIMIENTO DE *E. invadens*

*E. invadens* fue establecida en cultivos axénicos, utilizando el medio BI-S-33 descrito por Diamond en 1978. La Fig 1 representa una curva típica de crecimiento de esta cepa, donde por regresión lineal obtuvimos un tiempo de duplicación que fue de 58.82 horas con una velocidad de  $0.017 \text{ h}^{-1}$  y el rendimiento máximo alcanzado por las amibas fue de 240,000 amibas/ml incubadas a 25 °C por 12 días.

### 2.- EFECTO DE LOS CEM SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Entamoeba invadens*.

Se determinó el efecto de los CEM sobre el crecimiento de *E. invadens* y se contó el número de amibas presentes en los tubos después de exponerlos a los CEM de 1.0, 1.5, y 2.0 mT 60 Hz. Los resultados de este experimento se cuantificaron a diferentes tiempos de incubación y se compararon con un testigo negativo donde observamos lo siguiente: a) a los 3 días de incubación, se observó una disminución en los grupos probados a 1 mT, pero se encontró aumentada la disminución hasta un 41.1 % en los grupos de 1.5 mT y 2 mT, esta diferencia resultó estadísticamente significativa entre los grupos expuestos a estos CEM ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2) b) a los 6 días de incubación (Fig. 3) Se observaron los mismos resultados encontrados a los tres días de incubación y c) a los días 9 y 12 se detectó también una disminución en los grupos tratados, sin embargo esta disminución fue menor a los días previos siendo un 23.9 % y 20 % menores con respecto a los testigos no expuestos (Fig. 4 y 5). Los resultados se sometieron a la



prueba de comparación de medias de Tukey para ver la diferencia entre los diferentes grupos tratados con CEM y los grupos testigos durante los periodos de tiempo antes mencionados, y se encontró que el grupo de 2 mT en todos los días del tratamiento fue la condición donde se presentó la mayor disminución estadísticamente significativa de crecimiento de los trofozoítos de *E. invadens*.

### 3.- DETERMINACION DE LA DL<sub>50</sub> DE METRONIDAZOL EN EL CRECIMIENTO *E. invadens*

Se determinó la concentración de metronidazol para inhibir el 50 % de la población de amibas de la cepa de *E. invadens*. Se inocularon 10,000 amibas/ml y se expusieron a diferentes concentraciones de 2, 4, 8, 10 y 20 µg/ml de metronidazol diluido en medio basal BI-S-33. Después de 7 días de incubación se encontró por el método de Probit que la DL<sub>50</sub> de este fármaco fue de 2.76 µg/ml (Tabla 1).

TABLA 1.- TABLA DE RESULTADOS PARA DETERMINAR LA DL<sub>50</sub> DE METRONIDAZOL SOBRE *E. invadens*.

Concentración De metronidazol (µg/ml)	Log de concentración	Numero de células vivas	Numero de células muertas	Relación células vivas/ muertas	Probit
0	0	126250	-----	-----	0
2	.301	87900	38750	.306	4.4931
4	.602	35000	96250	.722	5.5884
8	.903	13750	112500	.890	6.2866
10	1	5000	121250	.960	6.7510
20	1.301	625	125625	.990	7.3267

#### **4.- EFECTO SINERGICO DE LOS CEM Y EL METRONIDAZOL SOBRE EL CRECIMIENTO DE *E. invadens*.**

De acuerdo a los resultados anteriores se decidió determinar si existía un efecto sinérgico entre los CEM y la presencia de una droga antiparasitaria como lo es el metronidazol. Para ello se utilizó el mejor resultado del experimento anterior que fue de 2.0 mT de CEM y 2.76 µg/ml del metronidazol y sus controles respectivos que fueron con puro metronidazol a 2.67 µg/ml, con solo 2.0 mT y sin tratamiento. Se encontró que después de haber expuesto e incubado por 7 días a estos grupos, todos los tratamientos presentaron una disminución de alrededor de un 60 % con respecto al testigo (Fig. 6). Estos resultados fueron procesados estadísticamente por la prueba de ANOVA y Tukey y se encontró diferencia significativa entre los grupos de CEM únicamente y tratamiento combinado con el grupo control ( $P < 0.05$ ). Sin embargo cuando se compararon los resultados de los grupos con tratamiento no se observó diferencia estadísticamente significativa entre ellas (Fig. 6). Lo que si es de llamar la atención fue que el tratamiento solamente con CEM a 2 mT y 60 Hz siguió manteniendo una marcada disminución en el crecimiento de *E. invadens*.

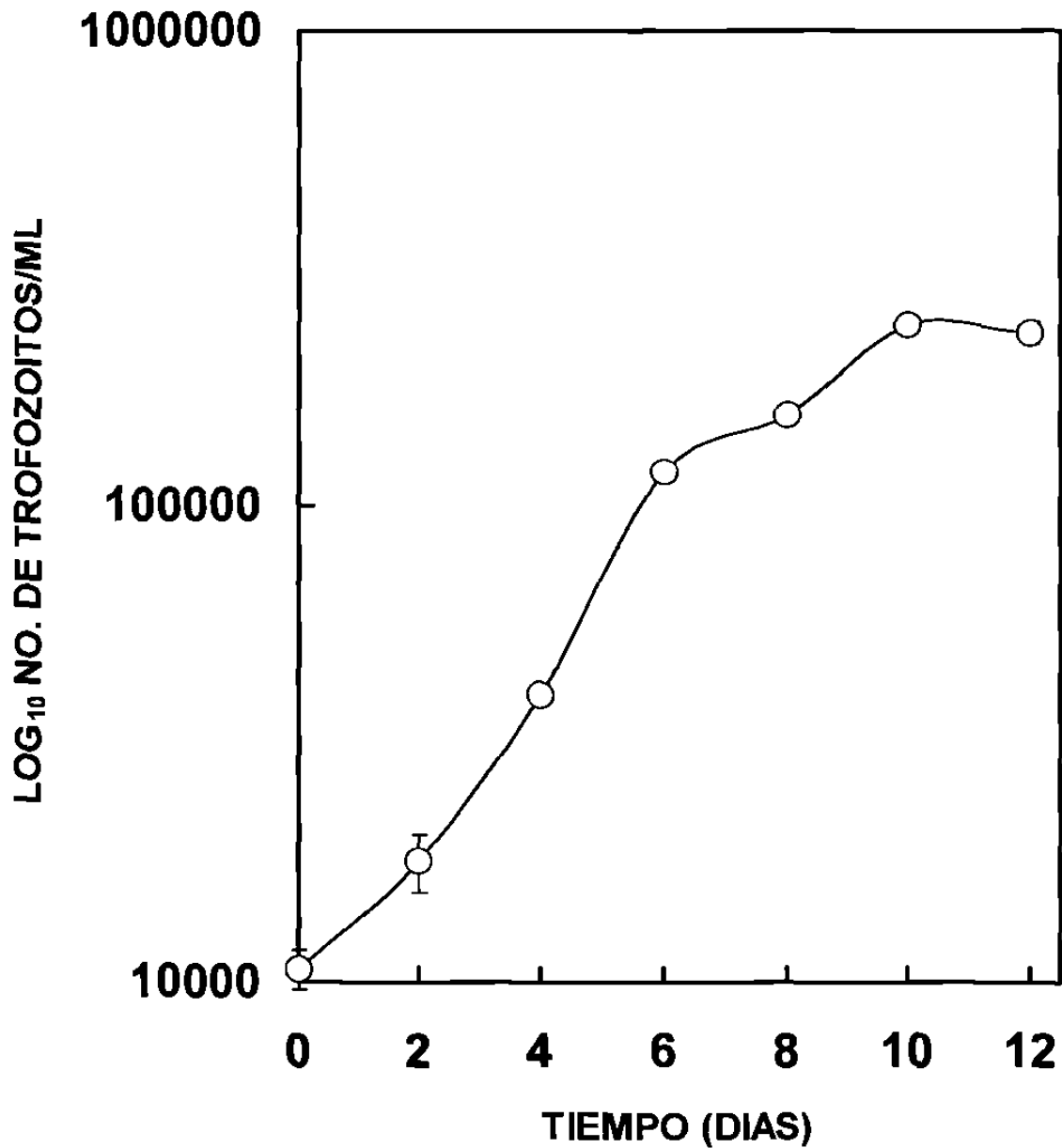
#### **5.- EFECTO DE LOS CEM SOBRE EL PORCIENTO DE ENQUISTAMIENTO**

El proceso de enquistamiento de *E. invadens* se llevó en 2 fases: a) su crecimiento en presencia de glucosa BI-S-33 por 7 días y b) el enquistamiento en ausencia de glucosa en medio TYI-S-33 donde los trofozoítos de la primera fase son expuestos a esta segunda fase por 10 días. Cuando se expusieron los trofozoítos de *E. invadens* a un CEM de 2.0 mT a 60 Hz solo en la fase de crecimiento en medio BI-S-33 y CO<sub>2</sub> para luego hacerlos enquistar en la segunda fase, se detectó una pequeña disminución en el porcentaje de enquistamiento del grupo tratado de 6.80% ( $19.71 \pm 5.52$ ) comparado con el grupo testigo no expuesto

al CEM ( $21.15 \pm 5.58$ ) sin embargo no se encontró diferencia estadísticamente significativa (Figura 7).

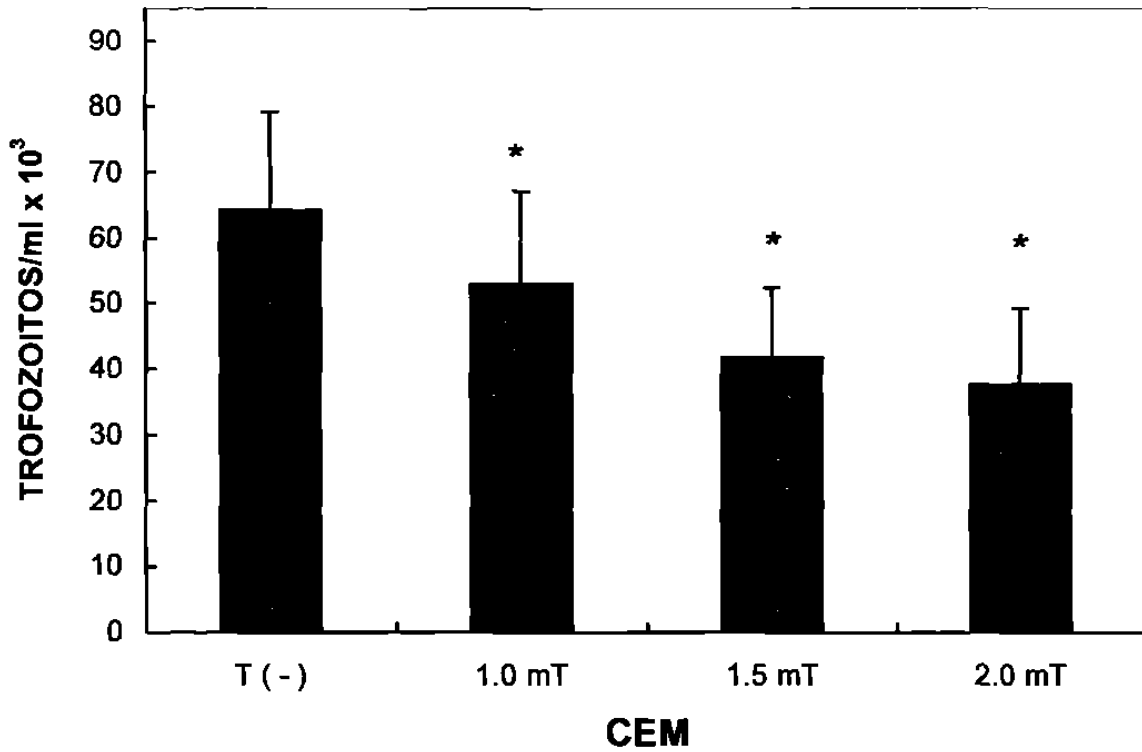
Durante la exposición a CEM de 2.0 mT a 60 Hz de frecuencia solo en la segunda fase de ausencia de glucosa en medio TYI-S33 y con  $\text{CO}_2$ , se observó que el grupo expuesto a la radiación presentó una disminución del 28 % ( $22.48 \pm 4.53$ ) comparado con el grupo control ( $36.58 \pm 9.31$ ). Se analizaron los datos con la prueba estadística de U Mann-Whitney y se encontró que existe una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) (Figura 8).

Cuando se utilizó en ambos tratamientos la presencia de los CEM en 2 mT y 60 Hz los grupos expuestos presentaron una disminución del 26.24 % ( $12.14 \pm 1.20$ ) comparado con los trofozoítos sin tratamiento ( $16.46 \pm 2.85$ ). Estos datos fueron procesados estadísticamente por la prueba no paramétrica de U Mann-Whitney y se encontró diferencia estadística significativa entre el grupo tratado con CEM y el grupo no expuesto a dicho factor ( $P < 0.05$ ) (Figura 9).



**FIGURA 1. - CURVA DE CRECIMIENTO DE *Entamoeba invadens* EN MEDIO BI-S-33.**

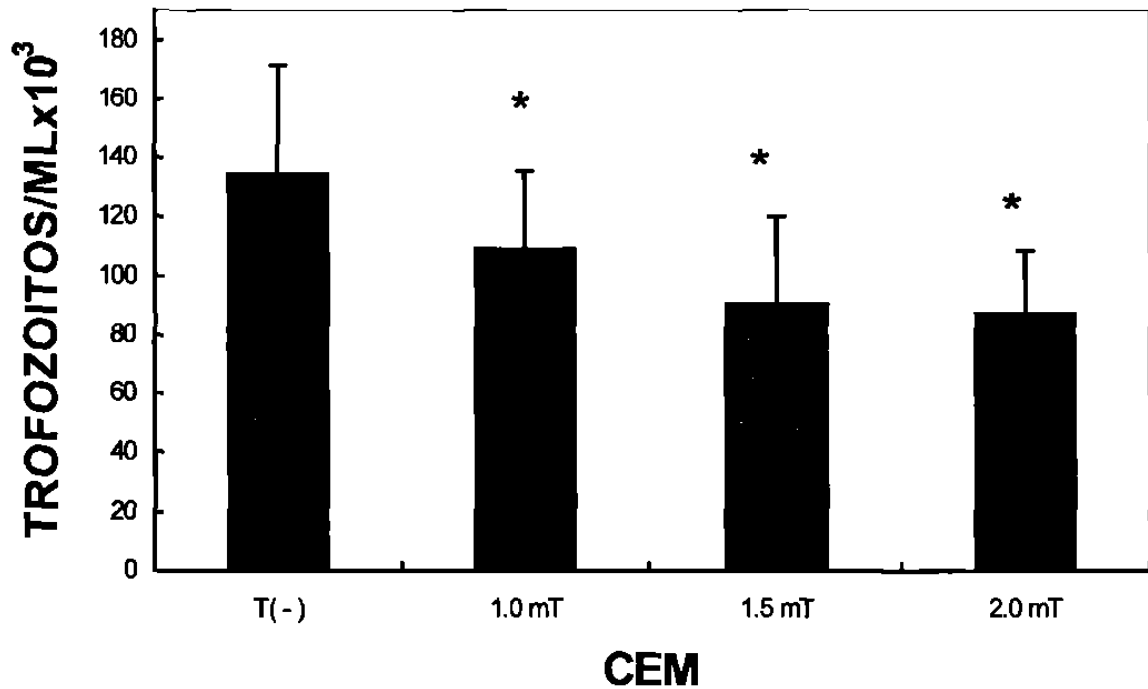
Se inoculó por triplicado 10,000 amibas por mililitro en tubos con 10 mililitros de medio BI-S-33. Después de diferentes tiempos de incubación a 25 °C se determinó la densidad celular de los cultivos con un hematocitometro. Cada punto corresponde a tres determinaciones independientes. El coeficiente de correlación de la recta , ( $r^2$ )= 0.939,  $P < 0.001$ .



**FIGURA 2 .- EFECTO DE LOS CEM OSCILANTES DE 60 HZ SOBRE EL CRECIMIENTO DE Entamoeba invadens A LOS TRES DIAS DE EXPOSICION.**

En tubos con 10 mililitros de medio BI-S-33 y 10,000 trofozoitos por mililitro se expusieron a diferentes CEM de 1.0, 1.5 y 2.0 mT de 60 Hz de frecuencia por 3 días de incubación a 25 °C. Al termino de este tiempo se determinó el numero de trofozoitos con un hematócítómetro. Cada punto representa el promedio y desviación estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones.

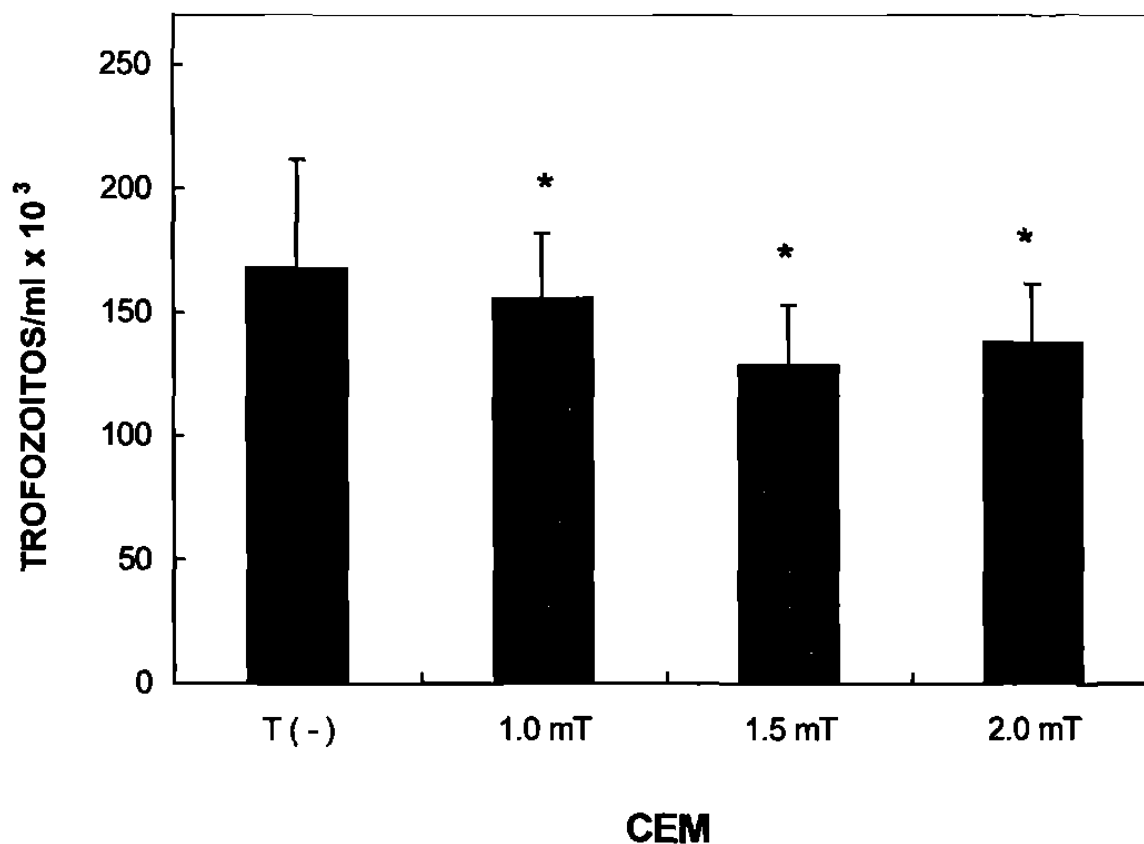
\* P<0.05



**Figura 3. -EFECTO DE LOS CEM OSCILANTES DE 60 HZ SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Entamoeba invadens* A LOS SEIS DIAS DE EXPOSICION.**

Se determinó el número de trofozoitos por mililitro a los 6 días de incubación a 25 °C en medio BI-S-33 a CEM de 1.0, 1.5 y 2.0 mT a 60 Hz . Los símbolos corresponden al promedio y desviación estándar de 12 determinaciones en 4 experimentos independientes.

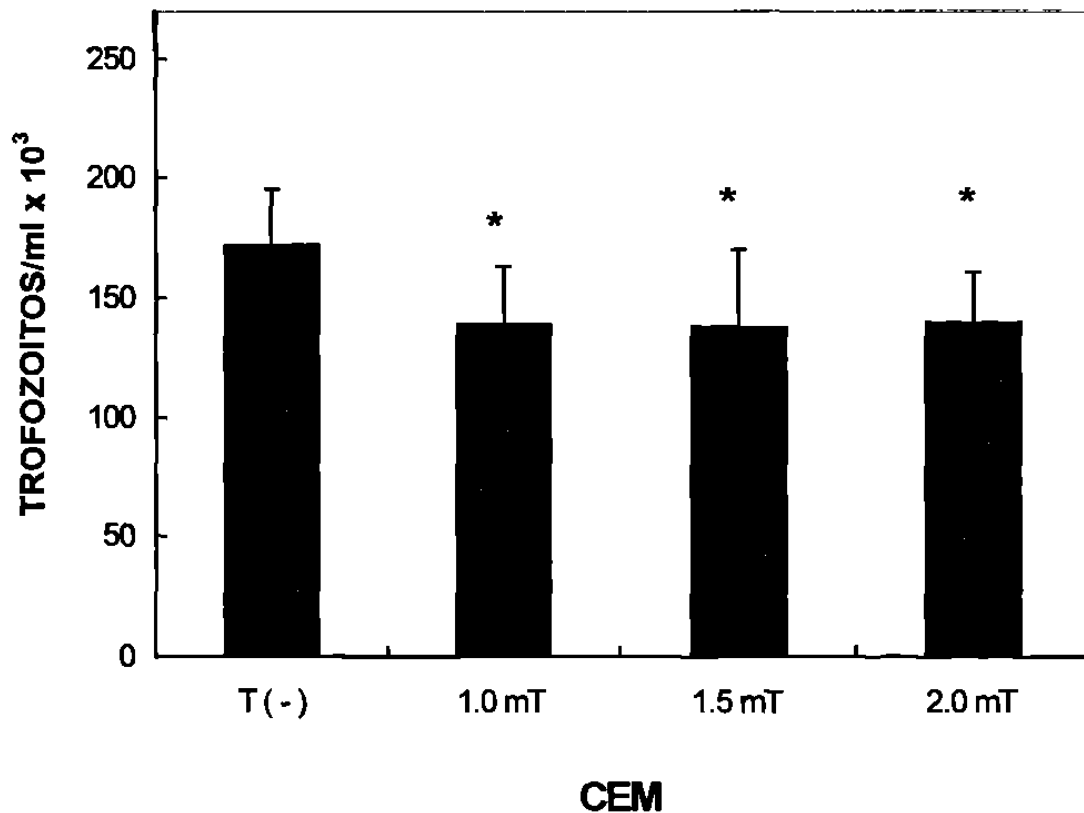
\* P<0.05



**FIGURA 4.- EFECTO DE LOS CEM OSCILANTES DE 60 HZ SOBRE EL CRECIMIENTO DE Entamoeba invadens A LOS NUEVE DIAS DE EXPOSICION.**

Después de 9 días de incubación a 25 °C se determinó el número de trofozoitos por mililitro expuestos a CEM de 1.0, 1.5 y 2.0 mT a 60 Hz de frecuencia. Los símbolos corresponden al promedio y desviación estándar de 12 determinaciones en 3 experimentos independientes.

\* P<0.05



**FIGURA 5 .- EFECTO DE LOS CEM OSCILANTES DE 60 HZ SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Entamoeba invadens* A LOS DOCE DIAS DE EXPOSICION.**

Después de 12 días de incubación a 25 °C se determinó el número de trofozoitos por mililitro expuestos a CEM de 1.0, 1.5 y 2.0 mT a 60 Hz de frecuencia. Los símbolos corresponden al promedio y desviación estándar de 12 determinaciones en 3 experimentos independientes.  
\*P<0.05



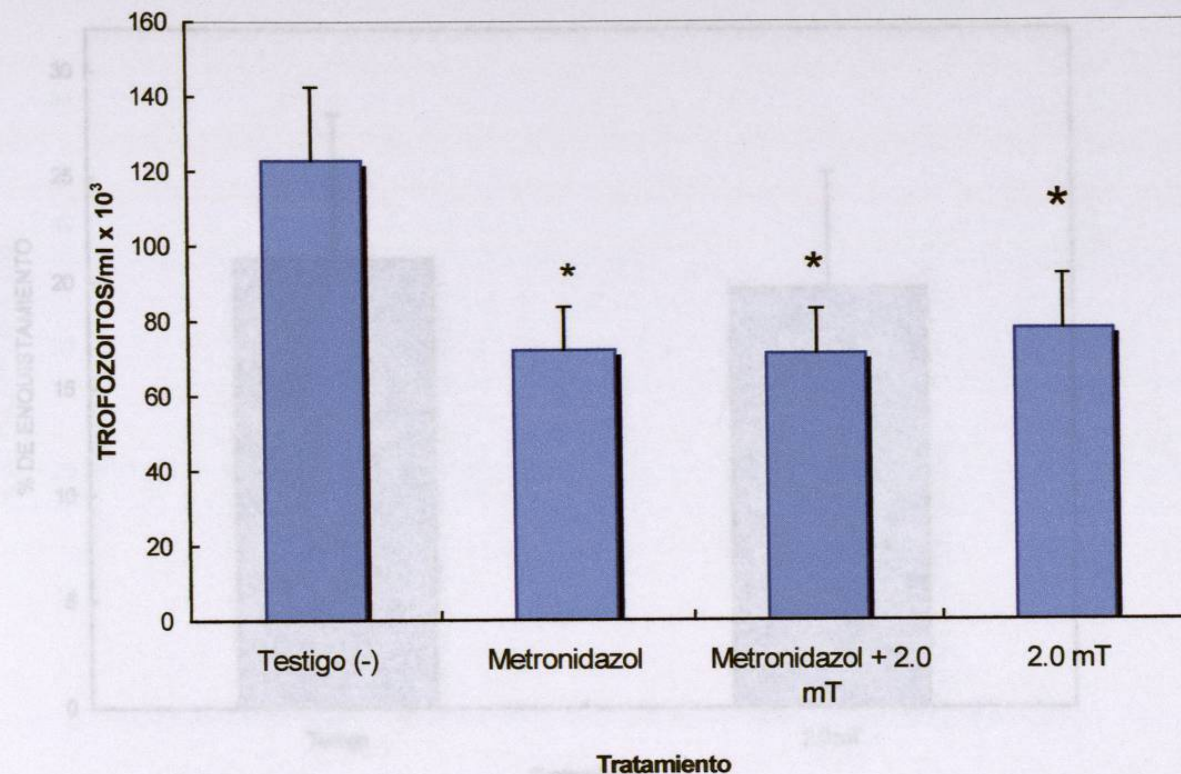
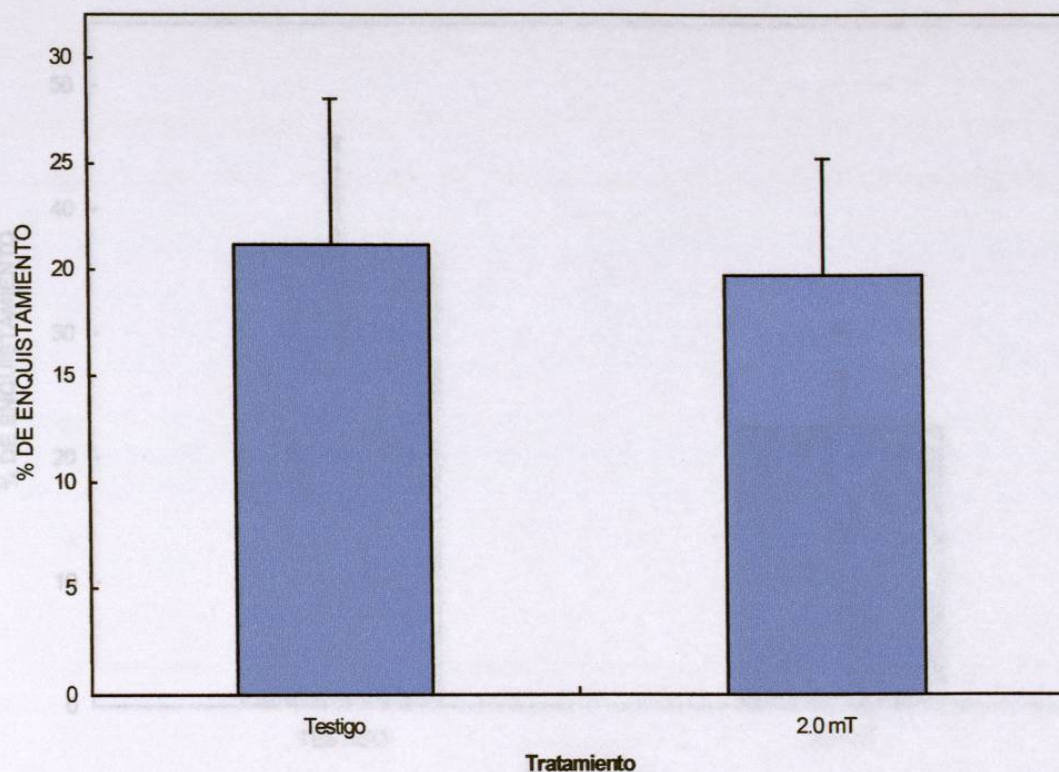


FIGURA 6. - EFECTO DE UN CEM DE 2.0 mT DE 60 HZ Y METRONIDAZOL SOBRE *E. invadens*

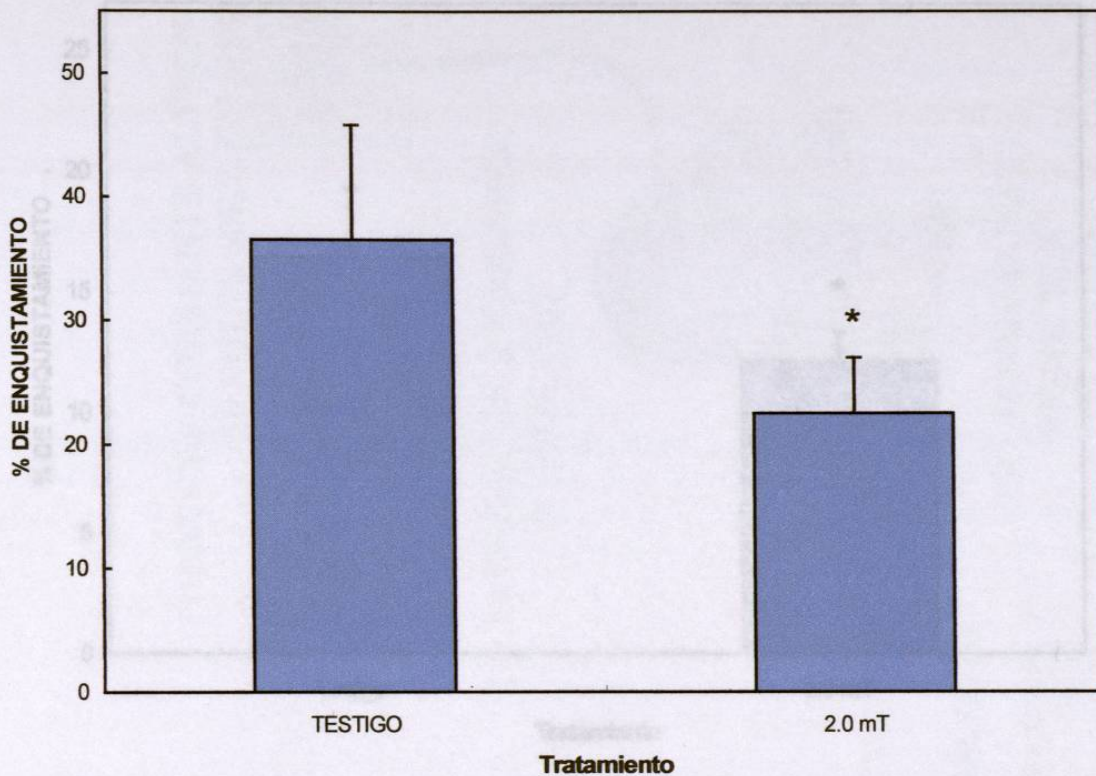
Se inoculó con 10,000 trofozoitos por mililitro en medio BI-S-33 y se incubó por 7 días a 25 °C con los siguientes tratamientos: Tubos sin tratamiento (Testigo negativo); Tubos con 2.76 µg de metronidazol; tubos con 2.76 µg de metronidazol y 2.0 mT a 60 Hz y tubos con 2.0 mT de 60 Hz. Después de cada grupo se determinó el número de trofozoitos con un hematocitometro. Las barras corresponden al promedio y desviación estándar de 9 determinaciones en 3 experimentos independientes.

\*P<0.05



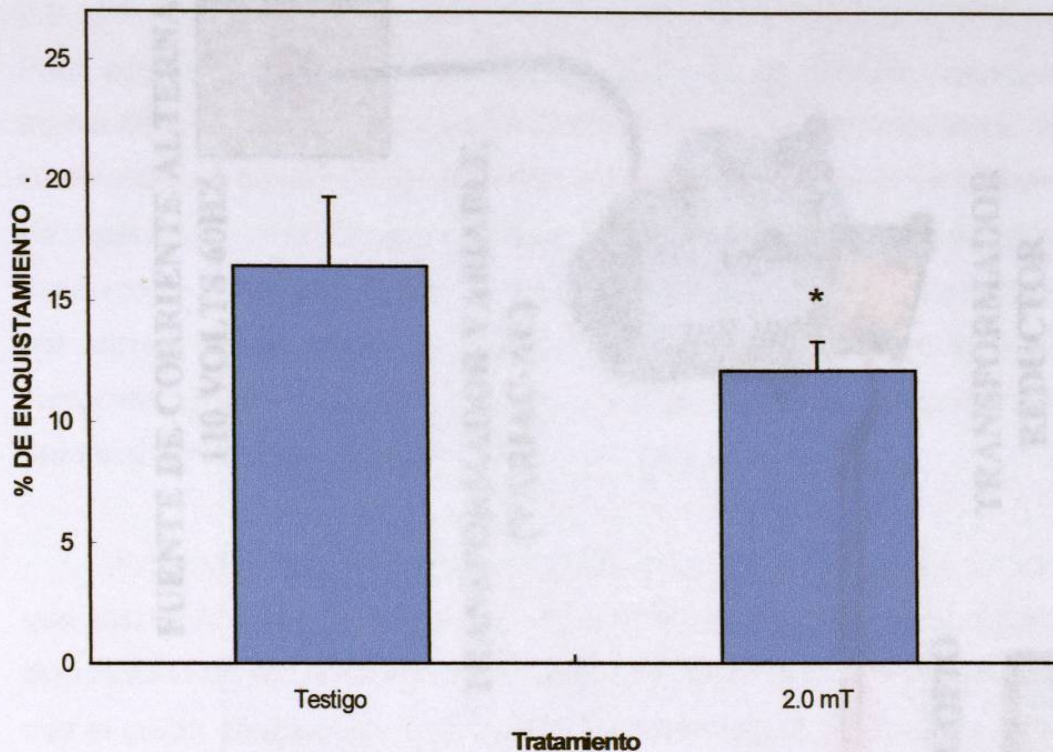
**FIGURA 7. – EFECTO DE LOS CEM DE 2.0 mT y 60 HZ DE FRECUENCIA DURANTE LA FASE DE MEDIO CON GLUCOSA BI-S-33 Y EL ENQUISTAMIENTO DE *Entamoeba invadens*.**

Se determinó el efecto de los CEM de 2.0 mT y 60 Hz de frecuencia en la producción de quistes en *E. invadens*. Se inocularon 15,000 trofozoitos por mililitro y 10 mililitros de medio con glucosa BI-S-33 en atmósfera de CO<sub>2</sub> por 7 días. Al término de los cuales se centrifugaron a 1200 r.p.m. por 10 minutos y se pasaron a medio de enquistamiento sin glucosa en 10 mililitros de medio TYI-S-33 y CO<sub>2</sub>, después se incubaron a 25°C por 10 días. Al término de este tiempo se cosecharon los tubos, los cuales se enfriaron en agua-hielo por 15 minutos y se contó el número de trofozoitos con un hematocitometro. Después se volvió a centrifugar los tubos a 1,200 r.p.m. por 10 minutos al sedimento se trató con 1 mililitro de Tritón X100 al 1%, dejamos incubar por 10 minutos y se contó el número de quistes presentes con la ayuda de un hematocitometro. Las barras corresponden al promedio y desviación estándar de 6 determinaciones.



**FIGURA 8. – EFECTO DE EL CEM DE 2.0 mT Y 60 HZ FRECUENCIA SOLO EN LA FASE DE AUSENCIA DE GLUCOSA MEDIO TYI-S-33 EN EL ENQUISTAMIENTO DE E. invadens.**

Se procedió en forma similar a lo descrito en la figura 7. Con excepción que los CEM de 2.0 mT y 60 Hz de frecuencia se expuso solo en la fase de ausencia de glucosa en el medio TYI-S-33. Las barras corresponden al promedio y desviación estándar de 6 determinaciones. \*P<0.05



**FIGURA 9. - EFECTO DE EL CEM DE 2.0 mT Y 60 HZ DE FRECUENCIA DURANTE 2 FASES EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE GLUCOSA EN EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*.**

Se procedió en forma similar a lo descrito en la figura 7 con excepción que los CEM de 2.0 mT y 60 Hz de frecuencia los expusimos durante las 2 fases de enquistamiento. En la fase de glucosa medio BI-S-33 y en la de ausencia de glucosa en el medio TYI-S-33. Las barras corresponden al promedio y desviación estandar de 6 determinaciones.

\* $P < 0.05$

DISCUSION

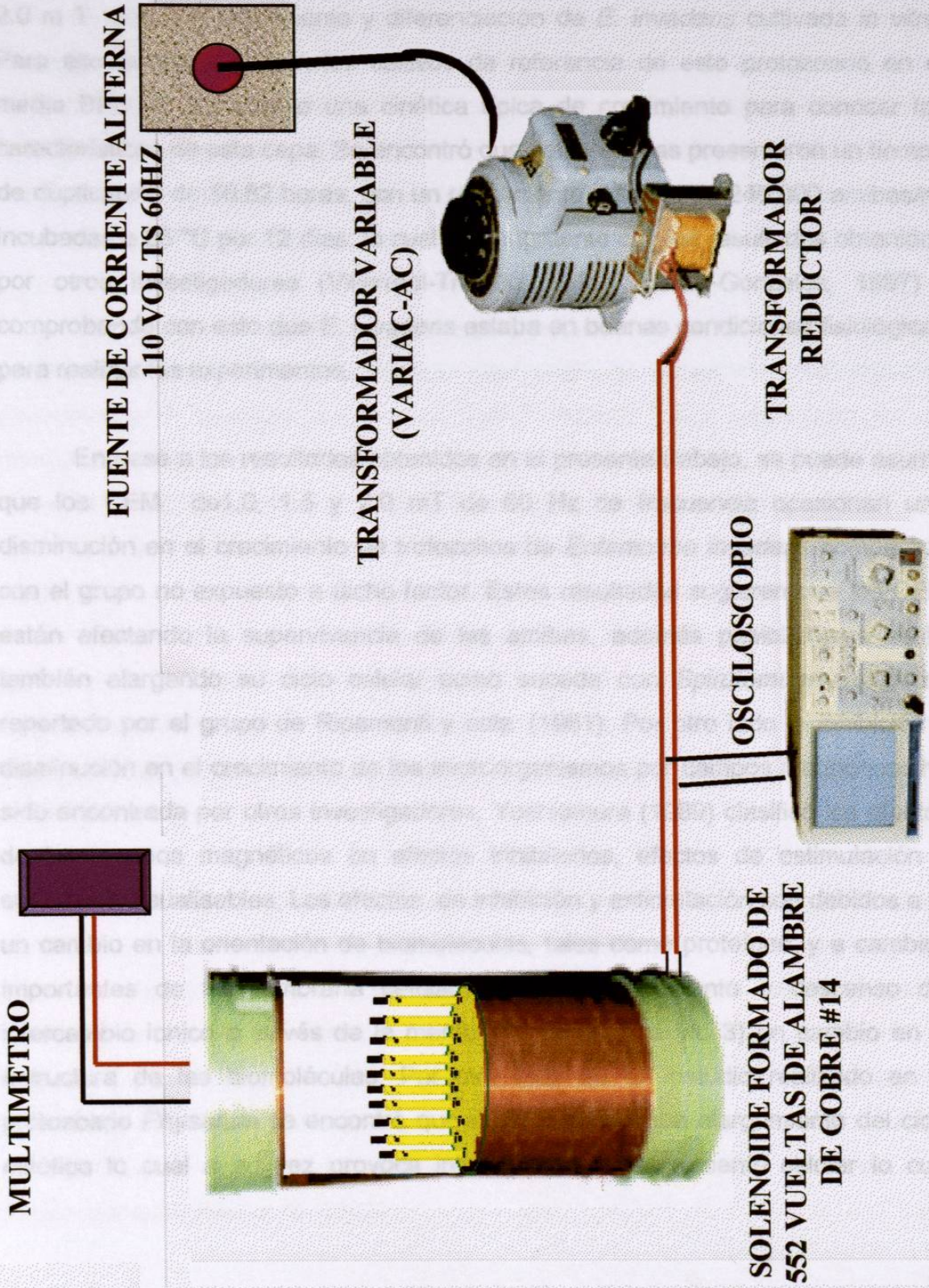


Figura 10.- Diagrama general del sistema de exposición utilizado para determinar la influencia de CEM oscilantes de 60 Hz sobre E. invadens.

## DISCUSION

En este estudio se determinó el efecto de los CEM oscilantes de 1.0, 1.5 y 2.0 m T sobre el crecimiento y diferenciación de *E. invadens* cultivada *in vitro*. Para ello se establecieron los cultivos de referencia de este protozoario en el medio BI-S-33. Se obtuvo una cinética típica de crecimiento para conocer las características de esta cepa. Se encontró que estas amibas presentaron un tiempo de duplicación de 58.82 horas, con un rendimiento máximo de 240,000 amibas/ml incubadas a 25 °C por 12 días; lo cual es congruente con los resultados obtenidos por otros investigadores (Villarreal-Treviño, 1990; Barron-Gonzalez, 1997) ; comprobando con esto que *E. invadens* estaba en buenas condiciones fisiológicas para realizar los experimentos.

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede asumir que los CEM de 1.0, 1.5 y 2.0 mT de 60 Hz de frecuencia ocasionan una disminución en el crecimiento de trofozoitos de *Entamoeba invadens* comparado con el grupo no expuesto a dicho factor. Estos resultados sugieren que los CEM están afectando la supervivencia de las amibas, además posiblemente estén también alargando su ciclo celular como sucede con *Spirotomum ambiguum* reportado por el grupo de Ripamonti y cols. (1981). Por otro lado la inhibición o disminución en el crecimiento de los microorganismos por campos magnéticos ha sido encontrada por otros investigadores; Yoshiomura (1989) clasificó los efectos de los campos magnéticos en efectos inhibitorios, efectos de estimulación y efectos no visualisables. Los efectos de inhibición y estimulación son debidos a 1) un cambio en la orientación de biomoléculas, tales como proteínas, y a cambios importantes de la membrana celular y 2) un incremento o descenso del intercambio iónico a través de la membrana plasmática y/o 3) un cambio en la estructura de las biomoléculas. Por otro lado en un estudio realizado en el protozoario *Physarum* se encontró que el CEM provocaba alargamiento del ciclo mitótico lo cual a su vez provoca inhibición en el crecimiento celular lo cual

concuerda con los resultados que se obtuvieron en este trabajo (Greenebaum y cols., 1982).

A pesar de la discrepancia por los resultados obtenidos por diferentes investigadores sobre los efectos de los CEM sobre los sistemas biológicos. Se han determinado los posibles efectos de los campos magnéticos estáticos u oscilantes encontrándose que los campos magnéticos que ocasionan efectos son principalmente los de tipo oscilantes (Alipov y cols., 1994). En el presente trabajo utilizamos un CEM de 60 Hz de frecuencia.

Una gran cantidad de investigaciones sugieren que el efecto de los CEM con las características similares a las aquí utilizadas provocan efecto sobre el metabolismo de la célula, como es al nivel de flujo de iones calcio a través de membrana, ya que se han realizado una gran cantidad de estudios que indican que esta radiación puede alterar los canales transportadores de calcio a través de la membrana, provocando modificación de proteínas de membrana y dando lugar a alteraciones en la síntesis de DNA, RNA y proteínas. Algunos de los efectos que se han observado a nivel celular son: supresión de la proliferación de linfocitos T, inhibición de la activación por compuestos mitogénicos, respuesta alterada por la enzima adenilato ciclasa, modificación de la distribución de receptores de membrana y alteración de componentes celulares de membrana (Adey., 1981; Tenforde.,1989).

Conociendo que los CEM tenían un efecto en el crecimiento de *E. invadens* se determinó el efecto potencial de los CEM combinados con el metronidazol sobre crecimiento de estas amibas. Se sabe que el metronidazol actúa penetrando en la célula blanco, para después producir una reducción de los grupos nitros, seguido de un efecto citotóxico de los productos reducidos y finalmente hay liberación de los productos que son inactivos. El metronidazol ataca principalmente en los intermediarios del RNA, DNA o proteínas del microorganismo (Muller M, 1983).

Se encontró que con una dosis de 2.76  $\mu\text{g/ml}$  se obtenía la concentración de metronidazol que causaba el 50 % de muerte en *E. invadens*. Con estos resultados, se implementó un tratamiento con esta concentración de metronidazol y 2.0 mT de CEM donde se encontró que hubo una disminución muy marcada en todos los grupos tratados, con respecto al testigo negativo, pero no se encontró una diferencia significativa entre el grupo expuesto al tratamiento combinado, el tratamiento solamente con CEM de 2.0 mT y el tratamiento solamente con metronidazol. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Ager y Radul (1992) sin embargo ellos combinaron el CEM con la luz ultravioleta. Ellos expusieron a *Saccharomyces cerevisiae* conjuntamente a CEM y a luz ultravioleta y no se encontró diferencia entre la mortalidad obtenida en el grupo expuesto solamente a luz ultravioleta y el grupo expuesto a ambos factores. En otro trabajo (Chahal y cols. 1993) investigaron el efecto combinado de los CEM y la mitomicina-C sobre la sobrevivencia de *Escherichia coli*. No encontrando efectos significativos del tratamiento combinado sobre el microorganismo.

Sin embargo en otros trabajos (Ripamonti y cols., 1981) se han utilizado altas intensidades de CEM (12500 mT) combinado con el 2,2 dipiridil disulfuro y se han demostrado efectos tóxicos significativos sobre el protozoario *Spirotomum ambiguum*.

Por otra parte se analizó la influencia de los CEM sobre el porcentaje de enquistamiento de *E. invadens*. Se encontró que los campos electromagnéticos afectan el porcentaje de enquistamiento cuando se expuso esta amiba a esta radiación en medio sin glucosa, así como cuando se expuso tanto en presencia como en ausencia de glucosa. Sin embargo no se encontró efecto significativo cuando la exposición a CEM fue solo cuando era cultivada en medio con glucosa. Esto nos indica que el CEM provoca efectos sobre el enquistamiento de este microorganismo solo cuando está siendo expuesto y presenta condiciones de ayuno de glucosa lo cual puede indicar que la condición de estrés nutricional hace



más susceptible a que se vea afectada la diferenciación celular de *Entamoeba invadens*. Galar-Castelan (1988) menciona que los campos magnéticos afectan al metabolismo celular además de que su efecto va depender del tipo de campo magnético, tiempo de exposición e intensidad producida. Sin embargo hay que tomar en cuenta las condiciones del organismo lo pueden volver más susceptible a ser afectado por el campo magnético.

Hasta ahora se han propuesto que los CEM pueden afectar algunos sistemas biológicos en los microorganismos expuestos a diferentes frecuencias. El conocimiento más profundo de estas interacciones permitirá determinar su contribución específica en dichos sistemas biológicos.

## PERSPECTIVAS

Es de gran importancia obtener información de los efectos de los CEM a diferentes frecuencias e intensidades, así como la determinación de los rangos en los cuales se provoquen mayores efectos sobre este protozooario en estudio. Además sería importante determinar de una manera mas profunda el efecto de campos electromagnéticos de diferentes frecuencias e intensidades sobre modelos biológicos que estén más relacionados a animales superiores.

## CONCLUSIONES

- Los CEM de 60 Hz de frecuencia de 1.0, 1.5 y 2.0 mT provocan una disminución en el crecimiento de *E. invadens*.
- El CEM de 2.0 mT presenta el mayor efecto sobre el crecimiento de *E. invadens* con un 41.32 % menor comparado con el grupo control.
- Los CEM combinados con una sustancia química como el metronidazol no tienen efecto sinérgico sobre el crecimiento de *E. invadens*.
- Los CEM son capaces de disminuir el porcentaje de enquistamiento de *E. invadens* cuando se exponen durante el periodo de ausencia de glucosa en medio TYI-S-33.

## REFERENCIAS

- Adey W. R. (1981) Tissue interactions with noionizing electromagnetic fields. *Physiol. Rev.* 61: 435.
- Ager D.D. and Radul J.A. Effect of 60 Hz magnetic fields on ultraviolet light-induced mutation and mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research* 283:279-286.
- Alipov , Ye. D., Berlev I. Ya. and Aizenberg O.A. (1994) Systemic reaction of *Escherichia coli* cells to weak electromagnetic fields of extremely low frequency. *Bioelectrochemistry* , 34: 5-12.
- Andrew C. and Basset L. (1985) Aspectos prácticos y fundamentos de usos terapéuticos de campos electromagnéticos pulsados. *Revista de Ingeniería Biomédica*, 5:451-529.
- Antonov O.E. Koryeva EV, Svishcheva T. Goncharova N.V. (1997) The destruction of microscopic organisms by their irradiation with a special form of UHF electromagnetic signals – *Izv Akad Nauk Ser. Biol. – Nov*; 6:728-734.
- Barron-Gonzalez M. (1997) Enquistamiento axenico *in vitro* de *Entamoeba invadens* en ausencia de suero. Tesis inedita. U.A.N.L. pag. 12-25.
- Beard C.M., Keneth L.N., O'fallon W.M., Kurland L.T., Dockerty M.B. (1979) Lack of evidence for cancer due to use of metronidazole. *The New England Journal of Medicine*. 301: 519-522.
- Beaver P.C. (1986) *Parasitología Clínica - Segunda edición – Editorial SALVAT – pp 114-131.*
- Brusik D. (1987) *Principles of genetic toxicology - New York - Plenum Press - pp 53-76 .*
- Cantini M., Cossarizza A., Bersani F., Cadossi R., Cecherelli G., Tenconi R., Gatt C., and Franceschi C. (1986) Enhancing effects of pulsed electromagnetic fields on lectin-induced human lymphocyte proliferation. *J. Bioelectric.*, 5:91-104 .
- Chahal R., Craig D.Q.M. and Pinney R.J. (1991) Investigation of potential genotoxic effects of low frequency electromagnetic fields on *Escherichia coli*. *J. Pharm. Pharmacol.* 45:30-33.

- Cosar C., Julou L., (1959) Activite de 1-methyl-2-nitro-5-imidazole vis-a-vis des infections experimentales a *trichomonas vaginalis*. Ann Inst. Pasteur., **96**:238-241.
- Diamond LS., Harlow D. and Cunnick CC. (1978) A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans R. Soc. Trop. Med., **72**: 431-432.
- Dihel L.E., Smith-Sonneborn J. and Middaugh C.R. (1985) Effects of an extremely low frequency electromagnetic field on the cell division rate and plasma membrane of *Paramecium tetraurelia*. Bioelectromagnetics., **6**: 61-71
- Feria V.A. y Treviño N. (1972) The ultrastructure of trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to spherical arrangements of somiophile cylindrical bodies. J. Protozool., **19**: 200-201.
- Ferran A.M. (1996) SPSS para Windows. Editorial Mc Graw-Hill; Primera edicion, pp 560.
- Galar Castelan I. (1988) Electricidad y magnetismo - Editorial LIMUSA - Primera edicion pp 222-230 .
- Goodman R., Bassett C.A.L. and Henderson A.S. (1983) Pulsing electromagnetic Fields induce cellular transcription. Science., **220**:1283-1285 .
- Goodman, R. Cizmadzhek Y. and Shirley-Henderson A. (1993) Electromagnetic fields and cells. J. Cell. Biochem., **51**: 436-441.
- Greenebaum B., Goodman E.M., Marron M.T. (1982) Magnetic field effects on mitotic cycle lenght in Physarum European Journal of Cell Biology **27**: 156-160.
- Hemmersbach R., Becker E. and Stockem W. (1997) Influence of extremely low frequency electromagnetic fields on the swimming behavior of ciliates. Bioelectromagnetics., **18**:491-498.
- Korner B., Jensen HK. (1976) Sensitivity of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole, tinidazole, and nifuratel in vitro. Br. J Vener. Dis., **52**:404-408.
- Kowalczyk C.I. and Saunders R.D. (1990) Dominant lethal studies in male mice after to exposure to a 50 Hz electric field. Bioelectromagnetics., **11**:129-137 .

- Legator MS., Connor TH., Stoeckel M. (1975) Detection of mutagenic activity of metronidazole and niridazole in body fluids of humans and mice. *Science.*, **188**:1118-1119.
- Levine N.D. (1973) Protozoan parasites of domestic animals and of man. Ed. 2. Burgess Publishing Co. 25-30.
- Liboff A.R., Williams T., Strong D.M., and Wistar R. (1984) Time-varying magnetic fields: effects on DNA synthesis. *Science.*, **223**: 818-820.
- Lin J.C. (1994) Advances in electromagnetic fields in living systems. Plenum Press., New York - pp 16,17,130,149 .
- López-Revilla, R. y Rodríguez-Baez J. (1981) Manual para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*. Editado por Conacyt. primera edición. México., pp17-30.
- Martínez –Palomo A. (1987) Las amibas enemigos invisibles- Primera edición.- Editorial La ciencia/47.México., pp 15-50.
- McLeod K., Lee R. and Erlich (1987) Frequency dependence of electric fields modulation of fibroblast protein synthesis. *Science.*, **236**:1465-1469.
- Morales-Vallarta , M. Villarreal-Treviño, L. Ramírez-Bon, E. , Navarro Marmolejo , L., Said-Fernández , S. , Mata Cárdenas, B. (1997) *Entamoeba invadens* differentiation and *Entamoeba histolytica* cyst-like formation induced by CO<sub>2</sub>. *Arc. Med., Res.***28** – S150-S151.
- Moreno-Trujillo O.A. (1997) Diseño de un equipo de Tesla modulado en baja frecuencia para el tratamiento experimental de la osteoporosis aplicable al laboratorio de fisiología de la escuela médico militar - Universidad del ejército y fuerza aérea escuela militar de ingenieros. Tesis inédita., pag. 33
- Muller M. (1983) Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. *Surgery.*, **93**:165-171.
- Muller M. (1986) Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. *Biochemical Pharmacology.*, **35**: 37-41.
- Muñoz R. (1994) Estudios jurídicos sobre la regulación y reglamentación que existe en materia de riesgos , derivados de problemas que se producen en los campos electromagnéticos y sobre el reconocimiento en la legislación del peligro potencial de daño que existe en instalaciones eléctricas de alto voltaje. comisión federal de electricidad., pp 1-10 .

- Nordstrom S., Birke E. and Gustavsson L. (1983) Reproductive hazards among workers at high voltage substations. *Bioelectromagnetics.*, **4**: 91-101 .
- Parker, S.P. (1993) *Encyclopedia of Physics*. Second edition. McGraw-Hill., pp 337-339 .
- Pothakamury U.R., Barletta B.J., Barbosa G.V. y Swanson B.G. (1993) Inactivación de microorganismos en alimentos usando campos magnéticos oscilantes - *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos.*, **33**: 479-489.
- Ramon C., Martin JT., Powell MR. (1987). Low-level, magnetic-field-induced growth modification of *Bacillus subtilis*. *Bioelectromagnetics.*, **8**: 275-82.
- Rengpien S. y Bailey G.B. (1987) Differentiation of *Entamoeba*: A new medium and optimal conditions for axenic encystation of *Entamoeba invadens*. *J. Parasitol.* **70**: 629.
- Ripamonti A., Ettiene EM., Frankel RB. (1981) Effect of homogeneous magnetic fields on responses to toxic stimulation in *Spirostomum ambiguum*. *Bioelectromagnetics.* **2**: 187-198.
- Roberts L.S. and Schmidt G.D. (1984) *Fundamentos de parasitología*. Primera edición. Editorial Continental. Pp 113-127.
- Rodan G.A., Bourret L.A. and Norton L.A. (1978) DNA synthesis in cartilage cells is stimulated by oscillating electric fields. *Science.*, **199**:690-692.
- Rodhain, J. (1934) *Entamoeba invadens* parasite of serpents. *C. R. Soc. Biol. Paris.*, **117**: 1195-1200.
- Royo A. (1981) *Física de campos y ondas*. Primera edición. Editorial Fondo Educativo Moderno Interamericano., pp 132 - 145 .
- Rosen M.S. and Rosen A.D. (1990) Magnetic Field influence on *Paramecium* motility. *Life Sci.*, **46**: 1509-1515.
- Rustia M. and Shubick P. (1972) Induction of lung tumors and malignant lymphomas in mice by metronidazole. *J. Natl. Cancer Inst.*, **48**:721-726.
- Said-Fernandez S., Vargas-Villarreal J., Castro-Garza J., Mata-Cardenas B.D., Navarro Marmolejo L., Lozano Garza G. y Martinez-Rodriguez H. (1988). PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**: 249-253.

- Stewart J.R. (1979) The electrostatic and electromagnetic effects of A.C. transmission Lines. IEEE., pp 4-10 .
- Strother G.K. (1980) Física aplicada a las ciencias de la salud. Mc Graw Hill., pp. 312 .
- Tabrah F.L., Mower H.F., Batkin S., and Greenwood P.B. (1994) Enhanced Mutagenic effect of a 60 Hz time-varying magnetic field on numbers of azide-induced TA1000 revertant colonies. Bioelectromagnetics., **15**:85-93.
- Takahashi K. Kaneko I., Date M. and Fukada E. (1987) Influence of pulsing electromagnetic field on the frequency of sister-chromatid exchanges in cultured mammalian cells. Experimentia., **43**:331-332.
- Tenforde T. S. (1989) Biological responses to static and time-varying magnetic fields. De., Electromagnetic interaction with biological systems . Plenum Press.
- Tenforde T.S. (1991) ELF field interactions at the animal , tissue, and cellular Levels. Electromagnetics in biology and medicine., **39**: 225-245.
- Ursing B., Kamme C. (1975) Metronidazole for Crohn disease. Lancet **1**:775-777.
- Viallarreal-Treviño L. (1990) Nuevo método de enquistamiento axenico de Entamoeba invadens e inducción de cuerpos cromatoides en fase activa de crecimiento. Tesis inédita. U.A.N.L. 15-23.
- Wood R. (1991) Magnetismo : de la brújula a los imanes superconductores - primera edición. McGraw-Hill. pp 1-33 .
- Wynder EL., Cornfield J., Schroff PD. (1954) A study of enviromental factors in carcinoma of cervix. Am J. Obstet. Gynecol. **168**:1016-1047.
- Yen-Patton G.P.A., Patton W.F., Beer D.H. and Jacobson B.S. (1988) Endothelial response to electromagnetic fields: stimulation of growth rate and angiogenesis *in vitro*. J. Cell. Physiol., **134**:37-46.
- Yoshimura, N. (1989) Application of magnetic action for sterilization of food. Shokuhin Kaishatsu **24**(3) 46-48.





DONATIVO

