

124  
2ej.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

ASPECTOS MORFODINAMICOS EN LA  
BIOLOGIA DE Entamoeba histolytica

Tesis Recepcional

BIOLOGÍA

JUAN MANUEL MELGAREJO GARCIA

- 1987 -



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

### Páginas

1	Agradecimientos y Dedicatorias.
12	Justificación del Tema.
14	Resumen.
16	Introducción.
21	Aspectos históricos de las amibas.
32	Consideraciones Taxonómicas.
34	<u>Entamoeba histolytica</u> y los Protozoarios.
40	Medios de Cultivo.
45	Material y Método.
47	Resultados.
66	Láminas.
80	Discusión.
90	Conclusiones.
93	Bibliografía.

## Justificación del Tema

E. histolytica (E.h.) tiene un enorme interés desde el punto de vista médico, pero, en forma inexplicable, ha sido relativamente poco estudiada por los biólogos desde planteamientos acordes a la Biología.

Fuera de los aspectos taxonómicos, de los cuales siempre ha sido un problema su clasificación desde su descubrimiento hasta nuestros días, poco se ha estudiado esta particular amiba de enorme trascendencia para el hombre. Sin embargo, el estudio de la enfermedad, la Amibiasis, exige cada vez más de un mejor y amplio conocimiento de E. h. desde puntos de vista de la Biología. Recientemente en nuestro país, durante la última década, un grupo médico encabezado por los Drs. Bernardo Sepúlveda, Louis S., Diamond y Luis Landa, (1976), (7), creó un Centro de Estudios sobre Amibiasis y, dentro del amplio enfoque multidisciplinario a que ha quedado sometida la enfermedad, - destacan planteamientos sobre la biología de este microorganismo.

En cambio, en la Facultad de Ciencias, el interés de los especialistas en Protozoología, se ha enfocado principalmente desde hace tiempo sobre la biología y taxonomía de las amibas de vida libre. Esta

discrepancia en el interés del estudio sobre E. h. entre médicos y biólogos, es difícil de concretar y de explicar. Quizá en la forma como apareció E. h. en el horizonte científico se encuentren algunas razones que nos ayuden a explicar el aparente desinterés de los biólogos por E. histolytica, que comprende no sólo a los biólogos mexicanos, sino también a los de otros países que, en todo caso, han dado evidencias de mayor interés en las amibas de vida libre.

Por estas razones justifico la realización de esta Tesis Recepcional, en la que se tratarán los Aspectos Morfodinámicos en la Biología de Entamoeba histolytica.

## Resumen

Entamoeba histolytica es un microorganismo que pasó inadvertido durante mucho tiempo a pesar de la importancia y gravedad de la enfermedad que produce y azota a la humanidad desde sus orígenes.

Este microorganismo fué menospreciado durante mucho tiempo, debido a lo poco que de él se conocía, trayendo como consecuencias que sus daños eran confundidos con los de otros protozoarios ya entonces observados, y aunque no existieron pruebas definitivas para considerarlos como agentes causales de dichos daños, se les culpaba de éstos.

Al paso del tiempo este sarcodario se convirtió en el azote de gran parte de la población humana cobrando miles de vidas, en su mayoría hombres entre los 20 y 45 años de edad, originando graves problemas socioeconómicos.

Aunado a esto, otro factor decisivo para su epidemiología fueron las condiciones higiénicas de la mayoría de la población humana, aumentando con esto la propagación de una enfermedad que se hizo cosmopolita, y por lo tanto, de interés general.

Ahora, en muchos países, principalmente en México y la India, se ha transformado en grave problema de Salud Pública, dando como resultados que profesionistas y técnicos diversos se enfoquen al me-

por conocimiento de la amiba y de la enfermedad causada por esta.

Actualmente los recursos técnicos que existen, han permitido su observación y cultivo axénico, avanzando a pasos agigantados el conocimiento, prevención y tratamiento de la amiba y por ende de la enfermedad que produce.

En nuestro Departamento de Cultivo de Tejidos ha sido posible estudiarla como célula y como organismo, desde el punto de vista biológico por las características que presenta, aprovechando además los adelantados sistemas ópticos de microscopía con que disponemos y que normalmente utilizamos en el cultivo de células y tejidos.

La aplicación de estos sistemas ópticos, nos han dado resultados impresionantes, únicos en el mundo, con imágenes tan bellas y emocionantes que difícilmente son superables en microscopía fotónica, con las que hemos podido observar todas las estructuras constitutivas de este microorganismo y que ofrecen pruebas irrefutables, de la enorme complejidad morfofisiológica que tiene Entamoeba histolytica.

## Introducción

Entamoeba histolytica es, según Levine (36), (1980), un protozoo del

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Sarcodina

Superclase: Rhizopoda

Clase: Lobosea

Subclase: Gymnamoebia

Orden: Amoebida

Suborden: Tubulina

Familia : Endamoebidae

Género : Entamoeba

Especie : histolytica

Este microorganismo es el agente causal de una enfermedad que afecta al hombre en forma y gravedad tales que constituye un problema de salud pública, nacional y mundial: la Amibiasis.



E. histolytica fué vista por primera vez, por un médico ruso, Fedor Alexandrovich Lösh (1840-1903), (38), en el año de 1874, - en la Ciudad de San Petersburgo, hoy Leningrado, en un joven campesino procedente de Puerto Arkangel, en Círculo Polar Artico. Este paciente, muy grave y con curso clínico muy rico en sintomatología enterocólica de disentería, despertó gran interés médico y, al practicársele estudios, entre otros, la observación al microscopio de las heces fecales, diarreicas, en fresco, Lösh, vió, por primera vez, los trofozoitos de la amiba; inclusive, observó y describió en ellos la presencia de glóbulos rojos en su citoplasma, destacando desde entonces, la naturaleza hematófaga del microorganismo. Estudios que ponen de manifiesto la enorme calidad científica de Lösh, le permitieron establecer la relación causa-efecto entre la amiba y la grave disentería - del campesino que, finalmente, le condujo a la muerte. Al practicar la necropsia, observó las graves lesiones anatómicas ulceronecróticas del intestino producidas por el microorganismo. Lösh procedió, inspirado, a inocular a un grupo de perros con el contenido intestinal y logró producir así un cuadro enterocólico en uno de los perros, al sacrificarlo reconoció las lesiones ulceronecróticas en el intestino del animal, en todo semejantes a las del paciente y, en el estudio microscópico, identificó los trofozoitos de Entamoeba histolytica. Los trabajos de Lösh referentes a este descubrimiento científico médico son -

extraordinarios y ejemplares en la metodología de investigación biomédica.

Como se advierte en este resumido suceso histórico E. h., apareció en medio de un enorme interés médico por una grave y fatal enfermedad. Lösh al ver los trofozoitos los comparó con las imágenes de otras dos amibas para ese tiempo ya conocidas, una de ellas Amoeba proteus, ciento veinte años ya observada y con E. gingivalis, veinte años antes vista, por ello no dudó en considerar al microorganismo, ahora por él descubierto, como una amiba que, por haberla encontrado en el intestino, en el colon de su paciente, la denominó - Amiba del colon . . . | Amiba coli |.

Por lo que se refiere al conocimiento de las amibas en el momento del descubrimiento de E. histolytica por Lösh, llama la atención que habían, inexplicablemente, pasado desapercibidas por el descubridor de los Protozoarios, Antony van Leewenhoek (1632-1723), (64,68).

Quien vió las amibas por primera vez fué Rösel van Rosenhof, pintor miniaturista de profesión, tallador de lentes y microscopista - por afición.

Van Rosenhof (68) descubrió en 1755, (Ciento un años después de haber descubierto van Leewenhoek el universo de los protozoarios) un microorganismo que cambiaba constantemente de forma, por lo que

le denominó "pequeño proteo", al que Linneo (68), designó después - como Chaos proteus.

En 1839, Eherenberg (68), creó el género Amoeba y, en 1849 el naturalista ruso Gros (68), describió la primera amiba parásita del hombre bajo el nombre de Amoeba gingivalis, llamada después Entamoeba gingivalis. Así, cuando Lösh vió su amiba E. histolytica, en el intestino de su disentérico paciente, pudo compararla con la E. proteus y con la E. gingivalis.

Hasta ese momento poco se sabía de la posible relación entre microorganismos como agentes causales de enfermedades y cuadros específicos de patología, en este caso intestinal.

Estos antecedentes dificultaron las ideas de Lösh (38), para proponer y sostener a E. histolytica como el agente causante de toda la complejidad y gravedad de la patología disentérica de su enfermo; de manera que cuando Lösh (38), hizo su genial revelación y publicó su hallazgo lo describió magistralmente en todos sus más finos detalles, pero al establecer la relación causa efecto, lo hizo con cierta tímidez, no categóricamente, quizá por exceso de prudencia, de rigor científico o temeroso de proponer un mecanismo de etiopatogenia, hasta ese momento nuevo.

En todo caso, no debe sorprendernos este titubeo sobre un conocimiento que hoy nos parece sobradamente existente y que, por el

contrario, quizás exageramos, invocándolo en exceso ante circunstancias de etiopatogenia no bien establecida.

En tiempos de Lösh no se conocían las enfermedades causadas por lo que hoy entendemos como parásitos, ya fueran animales o vegetales, sólo se sospechaba de ciertas tiñas y de la sarna como enfermedades causadas por organismos subvisibles y se hablaba de ciertas fiebres pútridas producidas por organismos parecidos a las levaduras.

Faltaban aún varios años para que apareciera en el horizonte la figura de Luis Pasteur (1822-1877), (68), fué hasta 1877 cuando Pasteur presentó su "Memoria sobre la Teoría de los Gérmenes y sus aplicaciones en la Medicina y en la Cirugía", en la cual expone sus ideas y su teoría sobre la etiología parasitaria de las enfermedades infecciosas.

En todo caso Lösh no se atrevió a hacer afirmaciones contundentes en relación causa-efecto entre la amiba por él encontrada en las lesiones intestinales y la enfermedad, ni en el desarrollo del trabajo ni en sus conclusiones; sin embargo, disponemos de suficiente información de que tenía numerosos estudios hechos con enorme rigor y método científicos que hoy día impresionaría al más exigente.

## ASPECTOS HISTORICOS

### DE LAS AMIBAS

- 1755 Rösel von Rosenhof (68), descubrió un microorganismo que cambiaba constantemente y lo denominó "pequeño proteo"
- 1758 Linneo (68), denominó a aquel "pequeño proteo" Volvox chaos.
- 1767 Linneo (68), corrigió el nombre dado para Volvox chaos, por el de Chaos protheus.
- 1776 Cooper (68), sugiere en su libro "Epidemic Diseases in México City 1718-1813", que hubo una gran epidemia de disentería relacionada con enfermedades del hígado.
- 1783 Eichorn (68), observó el heliozario Actinosphaerium.
- 1786 Müller (68), cambió el nombre de Chaos protheus por el de Proteus diffluens. Describió y nombró aproximadamente 380 especies de infusorios, pero en este grupo incluyó también a gusanos y otros metazoarios.
- 1818 Goldfuss (68), hizo la caracterización del Phylum Protozoa.
- 1826 d'Orbigny (68), publicó el estudio sistemático de los foraminíferos considerándolos como cefalópodos microscópicos.

- 1828 Annesley (68), trató con amplitud y minuciosidad lo relativo a la disentería en la India.
- 1830 Ehrenberg (68), describió al Orden Amoebida.
- 1835 Dujardin (68), en Francia, fué el primero en apreciar que todos los protozoarios tienen esencialmente la misma sustancia a la que llamó Sarcoda, estableció también el término Rhizopoda.
- 1838 Ehrenberg (68), en Alemania hizo nuevas aportaciones para el establecimiento de Phylum Protozoa y junto con Dujardin le dió el nombre de Diffugia y Arcella a las amibas testáceas, hasta entonces consideradas dentro del Género Amoeba, mismas que habían sido propuestas por Linneo como moluscos.  
En ese mismo año, Ehrenberg (68), propuso que los protozoarios están organizados con los mismos patrones de los metazoarios pero distintos sistemas de órganos. Por su parte Dujardin (68), consideró que los protozoarios son esencialmente diferentes de los organismos multicelulares.
- 1839 Furkinje (68), llamó protoplasma a la sustancia conocida hasta entonces como Sarcoda.  
En ese mismo año Ehrenberg (68), describió el Género Amoeba.
- 1841 Dujardin (68), en Francia apoyó con sus estudios el establecimiento del Phylum Protozoa. Hizo además especulaciones sobre el movimiento pseudopodial de la amiba.

- 1845 Von Siebold (68), definió a los protozoarios, haciendo que muchos estudiantes se interesaran en el estudio de estos microorganismos. Propuso además el nombre para varios grupos, revisó la descripción del Phylum Protozoa (actualmente considerada como Subreino por muchos autores). En ese mismo año, describió la Subclase Rhyzopoda (por muchos investigadores considerada como Superclase).
- 1846 Parkes (68), que trabajaba en la India, reconoció una cierta relación entre la disentería y la hepatitis.
- 1848 Von Siebold (68), estableció con base en los estudios de Ehrenberg y Dujardin (68), la caracterización del Phylum Protozoa. Morehead (68), publicó la primera observación de un absceso cerebral que coincidió con otro absceso hepático.
- 1849 Gros (63, 68), naturalista ruso, descubrió la primera amiba parásita del hombre (Amoeba gingivalis).
- 1858 J. Müller (68), propuso el nombre de "Radiolarios" para ciertos organismos observados en una muestra de agua de mar. En ese mismo año, Claparede y Lachmann (68), estudian nuevamente al Orden Amoebida describiéndolo taxonómicamente.
- 1861 Carpenter (68), describió a la Clase Lobosea.

- 1862 Haeckel (68), propuso el nombre de "heliozoarios" para ciertos organismos por él observados. En ese mismo año, describió a la Subclase Gymnamoebida; estudió a los Radiolarios, hizo además una diferenciación entre Protozoarios y Metazoarios.
- 1870 Lewis (68), en la India observó a Entamoeba coli.
- 1871 Schmarda (68), definió al Subphylum Sarcodina.
- 1874 Hertwing y Lasser (68), definieron a la Superclase Sarcodina.
- 1875 Lösh (38), en Rusia publicó, en el número 65 de los "Archivos de Anatomía y Fisiología Patológicas y Medicina Interna", los resultados de sus observaciones y experimentación que hizo con relación a un caso de disentería humana. Lösh (68), llegó a la conclusión de que las amibas por él halladas eran de una especie nueva a la que llamó Amoeba coli.
- 1878 Bütschli (68), encontró en el intestino de la cucaracha Periplaneta (Blatta) orientalis, amibas parásitas.
- 1879 Leydy (63, 68), publicó la primera monografía sobre los protozoarios en Norteamérica titulada "Freshwater Rhizopods of North America" ilustrando su trabajo con preciosos esquemas. En ese mismo año, dió origen al Género Endamoeba para la Especie blattae descrita ya por Bütschli.



- 1880 Bütschli inició su trabajo que se prolongaría por nueve años y que trata sobre los Sarcodarios. Hizo dentro de ese trabajo una buena caracterización del grupo y una gran aportación con respecto a la taxonomía de las especies hasta entonces conocidas, incluyendo descripciones extremadamente detalladas de los Sarcodina.

En ese mismo año, Kent (68), describe el Orden Amoebida.

- 1887 Robert Koch (68), examinó en Egipto e India muestras fecales - encontrando amibas. Además encontró esas mismas amibas en muchos cortes histológicos de úlceras cólicas y capilares hepáticos cercanos a abscesos hepáticos.

- En ese mismo año, Hlava (68), en Praga, inoculó con heces de pacientes disentéricos, a varias especies animales y confirmó el poder patógeno de tales parásitos. Hizo notar además la ocurrencia de esta enfermedad en un país no tropical.

- Kartulis (68), notificó en ese mismo año, la existencia de amibas en casos de pacientes con abscesos hepáticos y confirmó la naturaleza amebiana de esta afección.

- 1889 Masiutis (68), publicó casos de diferentes enfermedades en las que encontró amibas en las heces, sin presentar disentería, negando el papel etiológico de esos parásitos.

- 1890 Pénard (68), estudió a los Rizópodos de Suiza al igual que Leydy incluyó preciosas ilustraciones en su trabajo.

Kartulis (68), reafirmó en ese mismo año, sus ideas de las amibas como agente causal de la disentería e hizo notar que los parásitos causantes de esa afección existen no sólo en lugares tropicales sino en otros climas.

- 1891 De Councilman y Laufler (68), en Baltimore, hacen las mismas confirmaciones sobre los trabajos de Kartulis y Hlava. Presentaron una monografía sobre la amibiasis intestinal y hepática - relatando excelente y minuciosamente el cuadro clínico de esta afección.

Las amibas que ellos encontraron como agentes causales fueron también descritas con toda precisión y les dieron el nombre de Entamoeba dysenteriae. Crearon los terminos de "disentería amibiana" y "absceso amibiano del hígado" y sugirieron la existencia de otra especie de amiba en el colon humano que no tenía poder patógeno.

- 1893 Quincke y Roos (68), en Kiel confirmaron la existencia de más de una especie de amibas parásitas en el intestino humano. Descubrieron el ciclo evolutivo de la amiba con la transformación de sus trofozoides en quistes y demostraron que éstos eran la forma infectante de Entamoeba histolytica.

- 1894 Kruse y Pasquale (68), comprobaron la capacidad de las amibas para producir disentería sin ir acompañadas por otros gérmenes, demostrando por fin que las amibas tenían un poder patógeno por sí mismas y que no eran simples oportunistas como lo consideraban todavía muchos investigadores.
- 1895 Casagrandi y Barbagallo (61, 63, 68), establecieron el nombre del Género Entamoeba.
- 1900 Musser y Strong (68), en Manila confirmaron los trabajos de Quincke y Roos acerca de el poder infectante de los quistes de Entamoeba histolytica.
- 1902 Dolfein caracterizó al Subphylum Plasmodroma.
- 1903 Huber (68), detalló los caracteres diferenciales de los quistes de las dos especies parásitas en el intestino humano hasta entonces conocidas.
- Schaudinn (68), fijó con precisión los detalles de las estructuras de esas dos especies de amibas en el mismo año. Denominó a la Especie patógena Entamoeba histolytica y Entamoeba coli para la especie no patógena. Imaginó un ciclo vital para las amibas según el cual se reproducirían por una esquizogonia o gemación de los trofozoides.

- 1904 Mussgrave y Clegg (68), crearon confusiones al afirmar que todas las especies de amibas que viven en el intestino humano, son patógenas. Crearon el termino "amibiasis" para designar infecciones amibianas pudiendo o no acompañarse con síntomas o lesiones. Cultivaron además en un caldo de carne y agar, amibas libres pequeñas procedentes de materia fecal vieja.
- Kartulis (68), publicó, el caso de un absceso cerebral en donde encontró a las mismas amibas causantes de la disentería.
- 1905 Craig (68), revisó la descripción de Councilman y Lauffer sobre la Especie Amoeba dysenteriae.
- 1908 Hartman (68), describió a la especie Entamoeba histolytica bajo el nombre de Entamoeba tetrágena.
- 1909 Hickson (68), revisó la descripción de Schaudinn para Entamoeba histolytica.
- 1912 Von Prowazek (63, 68), descubrió a la Especie Iodamoeba bütschlii, y a Entamoeba hartmanni (ahora considerada como especie válida) y que antes fué considerada como la forma minuta de la Especie Entamoeba histolytica.
- Leonard Rogers (68), publicó un artículo muy práctico en relación al tratamiento de la amibiasis. Hizo en él una breve historia del empleo de la ipecacuana en el tratamiento de la enfermedad.

- Posteriormente precisó las bases de la administración de la emetina para obtener mejores beneficios y menores riesgos.
- 1913 Walker y Sellards (68), presentaron los resultados de una experimentación amplia sobre la inoculación vía bucal de quistes de varias cepas de Entamoeba histolytica y de Entamoeba coli demostrando que Entamoeba coli no producía enfermedad.
  - 1917 Craig (68), describió la primera epidemia registrada de amibiasis en los Estados Unidos de Norteamérica.
  - Wenyon y O'Connor describieron a Endolimax nana.
  - 1918 Cudler (68), cultivó con éxito a Entamoeba histolytica.
  - Jepps y Dobell (68), descubrieron a la Especie Dientamoeba fragilis.
  - 1919 Clifford Dobell (68), presentó el compendio más lúcido y exacto de su época, titulado "Las amibas que viven en el hombre".
  - 1920 Kofoid (68), describió a Entamoeba histolytica con el nombre de Endamoeba dysenteriae.
  - 1925 Boeck y Drbohlav (68), había logrado establecer un método de cultivo para Entamoeba histolytica, mejorando posteriormente sus experimentos otros muchos investigadores.
  - 1926 Calkins (68), describió a la Familia Endamoebidae.
  - 1928 La Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica en su Dictamen Número (63, 68, 99), dispuso que Entamoeba fuese sinónimo de Endamoeba.

- 1933 En la Ciudad de Chicago (68), accidentalmente se contaminó el agua potable de una tubería con quistes de Entamoeba histolytica dando origen a una de las epidemias más grandes registradas en la historia de la amibiasis.
- 1947 Shaffer y Frye (56), cultivaron amibas en presencia de Bacteroides.
- 1954 Se legalizó por la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica (63,68), que Entamoeba fuese un nombre genérico estableciendo a Entamoeba coli como especie tipo.
- 1959 De Carneri (68), concluyó que la distinción entre las especies conocidas como Entamoeba histolytica y Entamoeba minuta, es de una situación dudosa.
- 1961 Diamond (25, 26), diseñó un nuevo medio de cultivo que se elimina a la flora bacteriana y a partir de quistes se desarrolla E. histolytica y E. histolytica libre asociado con Tripanosoma cruzi y Crithidia spp.
- 1963 Honigberg y Balamuth (68), caracterizaron al Phylum Sarcocystophora.
- 1966 Bovee y Jahn (68), caracterizaron al Suborden Tubulina de la Clase Lobosea, contribuyendo notablemente a la clasificación taxonómica de este grupo.

- 1968 Diamond (25,26), hizo que la amiba se desarrollará axénicamente en un medio más simplificado y útil para el cultivo axénico de Entamoeba histolytica.
- 1976 Se formó en México el Centro de Estudios sobre Amibiasis (7), bajo la dirección de B. Sepúlveda, L.S. Diamond y L. Landa (6).

## Consideraciones Taxonómicas

Uno de los principales problemas en torno a la taxonomía de E. histolytica es su situación a nivel de género. Las especies que ahora se han agrupado como parte del género Entamoeba (Casagrandi y Barbagallo, 1895), (63,68), originalmente fueron consideradas dentro del género Endamoeba (Leidy, 1879), (68), pues en aquel tiempo no se hacía una clara diferenciación entre los organismos de estas especies.

El género Endamoeba fué creado para la descripción de amibas parásitas del intestino de invertebrados y el de Entamoeba empezó a diferenciarse por su naturaleza parasitaria exclusiva del hombre.

Existen criterios importantes para una mejor diferenciación de las especies a la luz de nuevas observaciones de estos organismos.

El género Endamoeba presenta como distintivo morfológico, una gran zona central del núcleo provista de cromatina que forma, alrededor de éste, un anillo granular ancho, mientras que el género Entamoeba presenta un cariosoma de tamaño relativamente pequeño, situado cerca del centro del núcleo (Craig y Faust, 1979), (63). Otra característica importante que cabe citar es el hecho de que Endamoeba



tiene una membrana nuclear gruesa, a diferencia de las especies de Entamoeba, las cuales presentan una membrana relativamente delgada y un gran número de pequeños gránulos o grumos de cromatina que se adhieren a la membrana nuclear; el conjunto se describe como cromatina en rueda de carro, (Craig y Faust, 1979), (63, 68).

En cuanto a su acción parasitaria, como ya se mencionó los huéspedes de Endamoeba son invertebrados, mientras que el genero Entamoeba, se propuso para las especies histolytica, coli y gingivalis, parásitos comunes del hombre.

A pesar de las diferencias antes citadas entre estos dos géneros de amibas, la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica, en su dictamen 99 dispuso en 1928, que Entamoeba fuese sinónimo (homónimo) de Endamoeba (Craig y Faust, 1979), (63, 68), y no fué sino veintiseis años después, a finales de 1954, cuando la misma Comisión revocó este dictamen y se legalizó que el género Entamoeba debería ser usado en lugar de Endamoeba, proponiendo entonces a la especie E. Coli como especie tipo.

A partir de entonces, el género Entamoeba se cita al hacer referencia de las especies que tengan características genéricas de Entamoeba.

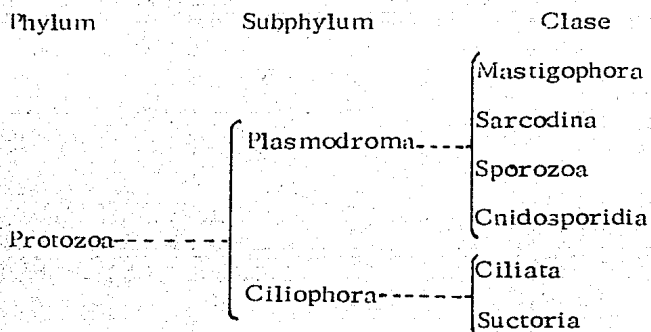
## Entamoeba histolytica y los Protozoarios

Debido al constante avance científico y tecnológico que trae consigo nuevos conocimientos acerca de los seres vivos, los protozoarios, como todos los organismos, han estado sujetos a diferentes formas de agrupación taxonómica, de tal manera que las clasificaciones ya establecidas y que en un principio se basaban en criterios personales, se han modificado a la luz de esos nuevos conceptos.

Hasta la fecha son tres las clasificaciones más aceptadas que de los protozoarios se han hecho: a) Kudo, R.R. (1931), (36, 68), b) Honigberg, B. N. (1964), (36, 66) y c) la de Levine, N. D. (1980), (36).

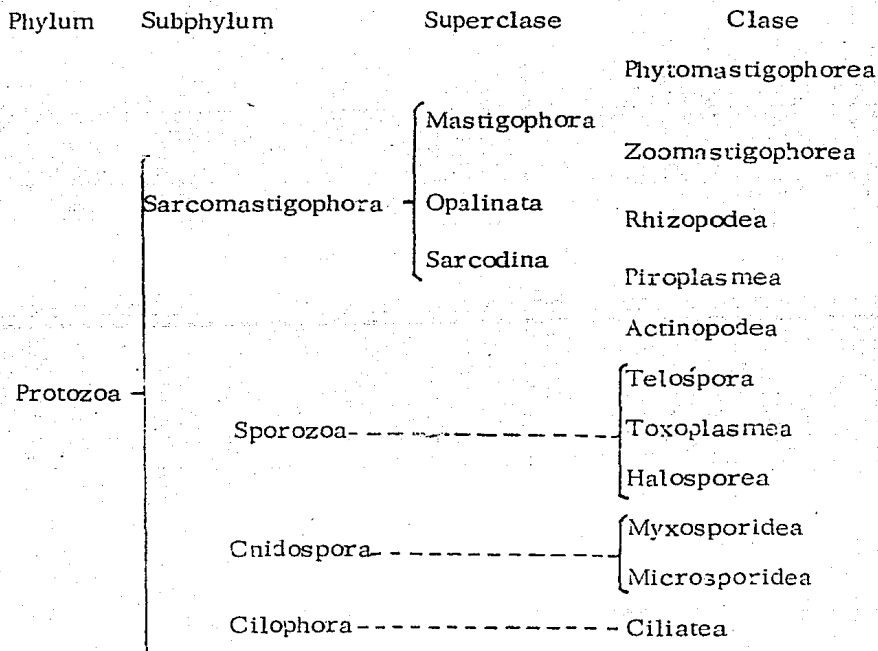
a) Kudo (68), consideró que los protozoarios están en dos Subphyla, (Plasmodroma y Ciliophora), el Subphylum Plasmodroma se divide en cuatro clases ( Mastigophora, Sarcodina, Sporozoa y Cnidosporidia).

A su vez el Subphylum Ciliophora se divide en dos clases ( Ciliata y Suctoria ).



b) Honigberg (36, 65) agrupó a los protozoarios dentro del Phylum Protozoa, dividido en cuatro Subphyla (Sarcomastigophora, Sporozoa, Cnidosporidia y Cilophora).

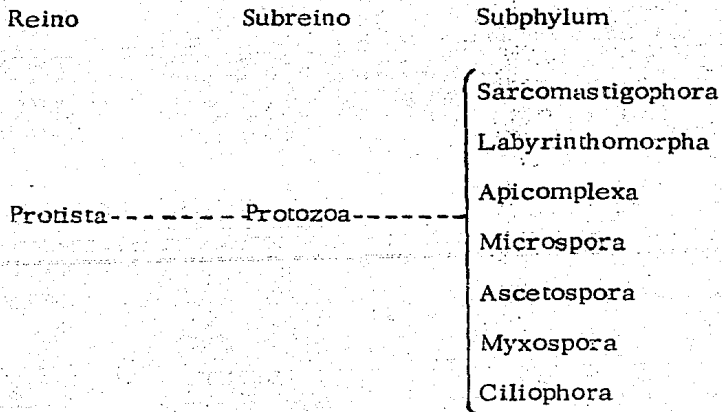
El Subphylum Sarcomastigophora lo subdividió en tres Superclases (Mastigophora, Opalinata y Sardodina); el Subphylum Sporozoa se dividió en tres clases (Telosporea, Toxoplasmea y Halosporea); el Subphylum Cnidosporidia fué dividido en dos clases (Myxosporidia y Microsporidia) y en el Subphylum Cilophora se acomodó una clase (Ciliatea).



Honigberg, 1964.

c) Levine (36), considera, con base en la información de la microscopía electrónica y a las nuevas especies descubiertas en los últimos años, que los protozoarios ya no pueden clasificarse de acuerdo a lo propuesto por Honigberg. Esta opinión es compartida por muchos zoólogos y cada vez está teniendo mayor aceptación.

Según Levine, los protozoarios son un Subreino del Reino Protista, a partir del cual se derivan siete Phyla (Sarcomastigophora, Labyrinthomorpha, Apicomplexa, Microspora, Ascetospora, Myxospora y Ciliophora).



Levine, 1980

Por lo tanto, Entamoeba histolytica podría clasificarse en tres formas diferentes:

Para Kudo (68):

Phylum: Protozoa (Goldfuss, 1818).  
Subphylum: Plasmodroma (Dolfein, 1902).  
Clase: Sarcodina (Hertwig y Lesser, 1874).  
Subclase: Rhyzopoda (von Siebold, 1845).  
Orden: Amœbida (Ehrenberg, 1830).  
Familia: Endamoebidae (Calkins, 1926).  
Género: Entamoeba (Casagrandi y Barbagallo, 1895).  
Especie: E. histolytica (Schaudinn, 1903).

Para Honigberg (36, 66):

Phylum: Protozoa (Goldfuss, 1818 emend, von Siebold, 1845).  
Subphylum: Sarcomastigophora (Honigberg y Balamuth, 1963).  
Superclase: Sarcodina (Hertwig y Lesser, 1874).  
Orden: Amœbida (Kent, 1880).  
Familia: Endamoebidae (Calkins, 1926).  
Género: Entamoeba (Casagrandi y Barbagallo, 1895).  
Especie: E. histolytica (Schaudinn, 1903).

Para Levine (36):

- Reino: Protista.
- Subreino: Protozoa (Golfuss, 1818 emend, von Siebold, 1845).
- Phylum: Sarcomastigophora (Honigberg y Balamuth, 1963).
- Superclase: Rhizopoda (von Siebold, 1845).
- Clase: Lobosea (Carpenter, 1861).
- Subclase: Gymnamoebia (Heackel, 1862).
- Orden: Amoebida (Ehrenberg, 1830).
- Suborden: Tubulina (Bovee y Jahn, 1966).
- Familia: Endamoebidae (Calkins, 1926).
- Género: Entamoeba (Casagrandi y Barbagallo, 1895).
- Especie: E. histolytica (Schaudinn, 1903).

## Medios de Cultivo

Una de las principales dificultades, constituida en problema, con la que se tropieza para el estudio de este sarcodario, era precisamente el poderlo obtener en forma aislada, en cantidades suficientes para los estudios morfológicos y, en general para ampliar el campo de investigación.

Como es sabido E. histolytica es naturalmente, y en la práctica, un organismo que afecta y establece sus relaciones ecológicas con el hombre. No se conocen en la naturaleza, formas de amibiasis en especies animales; sino solamente a través de estudios experimentales que se han podido producir "lesiones intencionadas" en muy pocos animales, hasta el momento el único receptivo es el hamster (Mesocricetus auratus), un roedor del Asia Central.

La obtención de trofozoítos y quistes de E. histolytica de las lesiones intestinales de portadores asintomáticos representan una posibilidad muy limitada en la práctica, para ello, la realidad de cultivarlas "in vitro" a partir de lesiones intestinales, tanto asociados a otros gérmenes (cultivos poliaxénicos) o en forma pura (cultivos axénicos) ha sido lo que favoreció el inmenso caudal de conocimientos morfodinámicos que hoy disponemos sobre E. histolytica.



Muchos investigadores y personal técnico han participado en esta conquista y se les rinde reconocimiento en las referencias bibliográficas de esta Tesis, pero que quizá por conocerlos personalmente, me permito mencionarlos aquí, rindiendo un tributo de admiración a su trascendental trabajo, me refiero al Dr. Louis Diamond y a la Q.F.B. Margarita de la Torre (17).

Las amibas que se manejaron en esta Tesis me fueron proporcionadas con la magnífica disposición y eficiencia de la Q. F. B. Margarita de la Torre, a quien junto con mi admiración por su trabajo, me satisface expresar aquí mi gratitud a su generosidad.

#### Aspectos históricos sobre el Cultivo "in vitro de

#### E. histolytica

En la actualidad disponer de E. histolytica puede hacerse de dos maneras:

a) Una forma consiste en obtenerlas directamente del huésped natural, el hombre, ya sea de personas portadoras a partir de una muestra fecal; de extracciones directas de lesiones ulcerosas del recto, del sigmoide, del colon descendente; mediante punciones directas en un absceso hepático amibiano, y de alguna lesión mucosa o cutánea de naturaleza amibiana.

b) La otra forma de obtenerlas es a partir de cultivos artificiales realizados in vitro con diferentes técnicas, pero basadas en la propuesta por Diamond en 1968, (25, 26), tendiente a disponer de amibas E. histolytica libres de cualquier otro organismo (cultivos axénicos).

Los medios de cultivo para E. histolytica tuvieron como punto de partida los inicios del presente siglo, en una época en la cual no se tenía la experiencia con que actualmente se cuenta y prevalecían muchas ideas erróneas sobre el conocimiento de las amibas y su significado patogénico.

Hasta 1913 se tenía la idea de que E. histolytica no podía ser cultivada por ningún método conocido, a diferencia de las amibas saprófitas que fácilmente crecían en medios artificiales.

Podemos considerar que los primeros intentos para cultivar a E. histolytica, tuvieron como punto de partida el año de 1918 cuando Cutler describió un método para el cultivo de esta amiba.

Boeck y Drobohlav (2), en 1925, desarrollaron un método en el cual cultivaron amibas con numerosas bacterias en un medio a base de albúmina de huevo (suero Locke-egg-suerum, L.E.S.); posteriormente sustituyeron el suero por albúmina de huevo cristalizada (Locke-egg-crystalized egg'albumin, L.E.A.), obteniéndose así mejores cultivos.

En 1947 Jacobs (32), utilizó penicilina en sus cultivos y logró el primer cultivo monoxénico libre de bacterias en un medio condicionado donde E. histolytica crecía junto con Clostridium perfringens.

A partir de entonces el uso de antibióticos se hizo más frecuente para eliminar a las bacterias que normalmente acompañaban a las amibas en cultivo y en ese mismo año Shaffer y Frye (56), cultivaron a Amibas en presencia de Bacteroides symbiosus.

El interés por cultivar a E. histolytica libre de otros organismos aumentaba constantemente, siendo muchas las modificaciones que se hicieron a los medios de cultivo sin que se consiguieran eliminar por completo a los organismos (Phillips (50), 1950; Chia Teum Pan (48), 1960).

Transcurrieron 14 años y en 1961, Diamond (59), diseñó un nuevo medio de cultivo condicionado en el cual eliminó a la flora bacteriana y a partir de quistes tratados y preparados se desarrolló E. histolytica asociada con Tripanosoma cruzi y con algunas especies de Crithidia, (cultivos monoxénicos).

Este medio ofreció de inmediato ciertas ventajas sobre otros anteriormente desarrollados, ya que es más fácil de preparar y el cultivo y subcultivo de la amiba monoaxénica es menos complicado, por tratarse de un medio precondicionado.

La idea original de cultivar a Entamoeba histolytica sin compañía de otros organismos se vió realizada hasta 1968, cuando el mismo Diamond (25, 26), con base en el medio por él desarrollado anteriormente, hizo que la amiba se desarrollará axénicamente en un medio más simplificado y útil para el cultivo axénico.

En este caso se utilizarón quistes que se introducían en un medio monofásico libre de bacterias en el que se habían semibrado tripanosomátidos del Género Crithidia.

Posteriormente las amibas y los flagelos asociados se transfirieron a medios difásicos, en donde los Crithidia murieron y la amiba se estableció axénicamente.

En nuestro país desde 1965 se han empleado métodos diferentes para aislar a E. histolytica de pacientes que padecían amibiiasis, iniciando en 1968 los cultivos monoaxénicos con Bacteroides symbiosus y T. cruzi mexicana, logrando eliminar la flora microbiana acompañante con el empleo de penicilina.

Un año después de que Diamond (59), estableció el cultivo axénico de E. histolytica, es decir, en 1969, investigadores del Servicio de Gastroenterología, del Hospital General Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social iniciaron el cultivo axénico de esta amiba en medios monofásicos y difásicos modificados.

## Material y Método

Para la elaboración de este trabajo se dispuso de amibas cultivadas en medio axénico según la técnica desarrollada por Diamond en 1968, (25, 26). Estos se hicieron de medios monofásicos y difásicos modificados por el personal del laboratorio de Gastroenterología del Centro Médico Nacional.

Los cultivos nos ofrecieron muestras de E. histolytica en cantidad y calidad ideales para la realización de este trabajo.

Las amibas utilizadas pertenecieron a la cepa HM 1, con un período de incubación de 48 hrs. mantenidas en tubos de ensayo con tapón de rosca a temperatura de 37°C.

Para las diferentes observaciones se hicieron preparaciones con portaobjetos y cubreobjetos previamente lavados y esterilizados, utilizándose también Cámaras de Rose como las que normalmente se emplean en las técnicas de Cultivo de Tejidos.

Las muestras en porta y cubreobjetos se sellaron con una mezcla de cera de abeja y parafina fundida a 56°C.

Con pipetas Pasteur se tomaron muestras del botón de amibas sedimentado en el tubo de ensayo, estas muestras se colocaron en el centro del portaobjetos y se les agregó una gota del mismo medio,

se cubrió con el cubreobjetos y se selló con la cera-parafina, formándose así una Cámara líquida muy delgada.

Las Cámaras de Rose se armaron en condiciones estériles y a través de la goma de hule látex se colocaron las amibas con una jeringa de aguja delgada.

Para la observación de la eritrofagocitosis se tomaron 3cc. de sangre de una persona que nunca hubiera padecido amibas, la muestra de sangre se colocó en un tubo de ensayo centrifugándolo a 600 r.p.m. durante 15 minutos, se separó el plasma y los eritrocitos se resuspendieron en solución salina estéril (Hepes).

De esta suspensión se hicieron preparaciones en porta-cubre-objetos y en Cámaras de Rose, añadiendo en cada caso una gota del cultivo de amibas.

Las observaciones fueron inmediatas y se prolongaron hasta 180 minutos (3 horas) después.

Todas las preparaciones se analizaron con los sistemas ópticos especiales de Contraste de Fases, Interferencia Policromática de la luz (Jamin-Leabedef) y Contraste Diferencial de Interferencia (Nomarski).

Finalmente se tomaron registros foto y cinematográficos de los diferentes aspectos de este protozoario y constituyen el resultado gráfico de esta Tesis.

## Resultados

### I. Morfología.

Los Trofozoítos. Entamoeba histolytica cultivada in vitro en medio axénico es un excelente material biológico que, considerándolo como célula puede ser estudiado con ventaja en citología dinámica a través de las técnicas de Cultivo de Tejidos asociadas a los notables recursos de la Microscopía Moderna.

E. histolytica tiene la ventaja de adaptarse con facilidad a las nuevas condiciones del cultivo de tejidos extendiéndose sobre la superficie de las laminillas, facilitando así el empleo de los sistemas ópticos especiales, lo que permite observaciones repetidas y prolongadas sin lesionar a la amiba, así como poder obtener registros foto y cinematográficos sobre los diferentes aspectos que esta amiba presenta durante su ciclo de vida.

Por lo anterior fué posible estudiar a Entamoeba histolytica desde el punto de vista de la Citología Dinámica, como célula, independientemente de su posición filogenética y de su naturaleza patógena, aprovechando para ello la amiba cultivada en medio axénico y los recursos de la óptica moderna aplicada a la Biología, que permiten -

los estudios Biofísicos por medio de haces de rayos fotónicos.

E. histolytica, como ya se ha mencionado, presenta dos fases: quiste y trofozoito. Cada una con características tan diferentes que nos permiten distinguirles con gran facilidad.

E. histolytica, en cultivos axénicos durante su fase de trofozoito tiene un tamaño que varía de 15 a 35 micras, muestra un citoplasma claramente diferenciado en una zona periférica hialina y una zona central granulovacuolar con movimientos activos de ciclosis.

En el citoplasma es posible apreciar finos filamentos aislados que al ser estudiados por la microscopía electrónica resultaron estar constituidos por complejos de actina y miosina (Chávez et. al. 1971), (13, 15).

E. histolytica presenta uno o dos núcleos con endosoma central único y condensaciones cromáticas periféricas en la membrana nuclear (cromatina en rueda de carro). Es una estructura biológicamente muy activa que con rápidos movimientos de ciclosis continuamente se desplaza dentro del citoplasma, característica comparativa con otras células de gran actividad metabólica que principalmente intervienen en la síntesis de proteínas.

En casos excepcionales es posible observar trofozoitos gigantes que contienen hasta veinte núcleos, endoplasma muy vacuolado y grumoso además de delgado exoplasma hialino con movimientos acti-



vos de contracción.

En torno al núcleo y sobre la superficie nuclear, se observan cúmulos de esférulas variables en número y tamaño, generalmente pequeñas y de 18 a 20 micras, las cuales son brillantes al contraste de fases y con relieve sobre la superficie nuclear, que el Departamento de Cultivo de Tejidos del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, ha descrito como "esférulas yuxtannucleares" (Chávez et. al. 1971), (17).

La relación de las esférulas con el núcleo es tan constante que son buena referencia para su localización cuando éste se oculta entre las numerosas vacuolas y grumos de citoplasma. Cada uno de los núcleos presentes en las amibas muestra su correspondiente grupo de esférulas.

En cultivos prolongados en Cámaras de Rose, los trofozoítos se disponen en láminas muy delgadas y secretan una sustancia mucóide que se adhiere al cubreobjetos, tñiéndose de tono rojo pálido en sus localizaciones intra y extracelular. Los trofozoítos secretan la sustancia y se alejan de ella.

En ciertas ocasiones E. histolytica forma un retículo canalicular en el citoplasma, que se desarrolla simultáneamente en varios trofozoítos, dura de 15 a 30 minutos, desaparece y vuelve a aparecer después de varias horas.

Quando esta amiba se desplaza, los canaliculos se orientan según el eje mayor de la amiba y participan del movimiento de ciclo-sis.

Durante su formación son al principio escasos y muy finos, pero rápidamente aumentan en número y tamaño para después disminuir en número pero no en magnitud. Cuando esto sucede se observa una intensa actividad pinocítica acompañada de veloces desplazamientos pseudopódicos.

Estos canaliculos en determinado momento coexisten con las vacuolas pinocíticas pero no tienen su origen en ellas: cuando esto sucede nos recuerdan por su forma el sistema retículo endoplasmático, pareciendo además estar en relación directa con los momentos más vivaces o activos de la amiba.

Transitoriamente en los trofozoitos en reposo puede observarse un conjunto de organelos de localización yuxtannuclear semejantes al aparato de Golgi, éstos aparecen temporalmente a continuación de desaparecer el sistema canalicular, observándose además la expulsión de una porción citoplásmica anucleada.

## II. Movimiento

Los trofozoitos se mueven activamente por contracciones del citoplasma y por la emisión de pseudópodos principalmente. Sin embargo con respecto al movimiento pueden destacarse cuatro aspectos principales:

1) Activos movimientos de desplazamiento por las contracciones del citoplasma y emisión pseudopódica.

2) Movimientos de gesticulación producidos por el citoplasma periférico, en el que no se realiza un desplazamiento de la amiba.

3) Activos movimientos de ciclois del citoplasma y sus estructuras.

4) Movimientos que originan cambios morfológicos especiales durante la realización de ciertas actividades celulares como la Pinocitosis, la Fagocitosis y la División Celular.

### III. Endocitosis

La endocitosis es el proceso a través del cual la célula ingiere organismos vivos, partículas inorgánicas, coloides, solutos y solventes; llevando implícito la invaginación simultánea del plasmoma con la formación de canales o vacuolas que envuelven el material ingerido.

Por conveniencia para explicar este fenómeno de ingestión se han adoptado términos de Pinocitosis y Fagocitosis, refiriéndose a la entrada de organismos o partículas a las células sin que estos se observen al microscopio fotónico, como "Pinocitosis"; y cuando dicho material puede observarse al pasar al interior células, como "Fagocitosis" (Jeon, 1973), (67).

En ambos procesos se observa una similitud básica en la que están implícitos diferentes fenómenos como son: cambios bioquímicos y morfológicos, la iniciación de estímulos, el acompañamiento de requerimientos energéticos y cambios continuos en la forma y el tamaño de las invaginaciones primarias.

#### IV. Pinocitosis

Desde los primeros estudios de Edwards (27), en 1925, sobre la formación de vacuolas por sustancias químicas y la primera observación de la Pinocitosis en amibas por Mast y Doyle (43), en 1934, se han publicado muchos datos y revisiones a este respecto, - dándole un nuevo enfoque a los diferentes aspectos de la endocitosis, incluyendo lo referente a la relación soluto y solvente (Brandt, (3), 1958; Schumaker, (55), 1958; Chapman-Andresen y Holter, (11), 1964).

La Pinocitosis ha sido considerada como un fenómeno inducido por ciertas sustancias (inductoras) que pueden estar presentes - en el medio, aún en concentraciones muy bajas, pero que son suficientes para la formación de canales que difieren en magnitud y duración (Chapman-Andresen, (10), 1962).

En los medios de cultivo, la Pinocitosis es un fenómeno extendido y lento (Rustad, (54), 1961), lo que determinó a considerarle como "Pinocitosis Permanente" (Wohlfarth-Botterman y Stockem, (60), 1966). Como para muchos autores este tipo de Pinocitosis lenta y continúa, es parte esencial de la locomoción y del movimiento de membrana que se realiza en las amibas por mecanismos fisiológicos

similares a los ocurridos en muchas células de mamíferos en relación al medio microecológico que le rodea.

Según el medio, diferentes condiciones inducen a la formación de canales e invaginaciones (Komnick et al, (34), 1972), y la formación de vacuolas pinocíticas depende de estímulos mecánicos o químicos que pueden relacionarse con los principales problemas de movimiento citoplasmático y amiboide (Jeon, (67), 1973).

Ambas consideraciones pueden aplicarse a la formación de canales y vacuolas pinocíticas, pero es evidente que esto se acompaña de interacciones fisicoquímicas complejas, que traen como resultado cambios en la carga e hidratación de la superficie celular (Nachmias, (45, 46), 1968).

También se ha observado la influencia de algunos factores sobre la capa mucosa de la membrana de la amiba, mismos que favorecen la formación de canales y vacuolas (Marshall y Nachmias, (39, 40), 1965; Cooper, (23), 1968; Hendil, (30), 1971).

La superficie de absorción e inducción del soluto, fué primeramente interpretada como causa de una disminución en la tensión y rigidez del plasmonema (Brandt, (3), 1958).

Posteriormente se demostró que es la relación de iones de calcio lo que determina la estructura y resistencia de la membrana (Brandt y Freeman, (4), 1967; Brandt y Hendil, (5, 6), 1970), incluyén-

dose además la despolarización de la superficie (Josefsson, (33), 1968). Los cambios de carga en la superficie son transmitidos a través del plasmonema con reacción ulterior del citoplasma adyacente.

Durante la formación de canales pinocíticos los pseudópodos tienen aspecto de canales, están compuestos de citoplasma hialino, contienen pocos organelos y el protoplasma se mueve rápida y activamente.

Entamoeba histolytica mediante el proceso de Pinocitosis - incorpora los nutrientes disueltos en la fase líquida o en soluciones salinas, se lleva a cabo por toda la superficie de la amiba; tiene períodos de mayor actividad en relación con los cambios del medio y con la formación y desarrollo de la red canalicular reticuloendoplásmica.

Anteriormente se pensaba que esta incorporación se realizaba mediante un simple fenómeno de ósmosis, pero en realidad la "Pinocitosis" es un mecanismo biológico de endocitosis muy activo, en el que los trofozoítos llegan a incorporar hasta 32 veces su volumen en una hora, sin que se observen imágenes de encharcamiento líquido, (Chévez et. al. (18), 1971).

La intensa actividad pinocítica ocasiona desplazamientos continuos de la superficie celular y membrana citoplásmica, hacia el interior, bajo la forma de endocitosis.

Por otro lado, los continuos movimientos del contorno celular, lanzan hacia el exterior mantos pseudopódicos en forma de exocitosis. El cambio de forma (formación de Rosetas), la disminución en su desplazamiento y una gran adhesión al sustrato son característicos de una intensa Pinocitosis (Mast y Doyle, (43), 1934; - Chapman, Andresen y Prescott, (12), 1956; Chapman-Andresen ( 8, 9, 10), 1958, 1960-1962; Stockem, (57), 1966).

La formación de aparatos de captura e incorporación especiales y los movimientos de desplazamiento de algunas secciones de la membrana hacia el interior de la amiba, indican el inicio de la Pinocitosis, lo que da la impresión vacuolar y alveolar a E. histolytica.

La incorporación de nutrientes por este mecanismo se traduce en un complejo proceso de captura y transporte de energía, que implica importantes modificaciones biológicas para su realización, - entre las que podemos mencionar Regeneración, Restitución y Secuestro de Membrana.

En relación a este proceso se han observado modificaciones morfológicas en el citoplasma, se refieren a la formación y desarrollo de un Sistema Canalicular Transitorio, suele durar de 15 a 20 minutos, posteriormente desaparece y vuelve a formarse varias horas después. Estas redes canaliculares se evidencian en los momentos de mayor actividad Pinocítica y son acompañados de veloces des-



plazamientos pseudopódicos de la amiba.

Cuando estos canales se forman son escasos y muy finos pero rápidamente aumentan en número y tamaño, para posteriormente disminuir en número pero no en magnitud.

Este sistema no tiene origen en las vacuolas pinocíticas aunque después entren en contacto con ellas, a tal grado que semejan el retículo endoplásmico coincidiendo con los momentos más vivaces de la amiba.

Cuando este sistema canalicular desaparece, en el núcleo se hacen presentes las esférulas yuxtancleares y se advierte también la expulsión de una porción de citoplasma sin núcleo.

Es evidente que la Pinocitosis en Entamoeba histolytica implica una gran complejidad estructural en la que va implícito un significado biológico de tal magnitud en el que no sólo hay ingestión de sustancias disueltas, sino que intervienen enormes manejos de energía como parte del complejo metabólico de este microorganismo.

## V. Fagocitosis

El término de Fagocitosis puede ser usado para describir la entrada de organismos y partículas en el interior de la célula pudiendo ser observado al microscopio fotónico (Jeon, (67), 1973).

Este proceso mantiene una similitud morfológica con la Pinocitosis, representando la iniciación normal del proceso de alimentación de las amibas, siendo además un proceso fisiológico normal, mientras que la Pinocitosis es un fenómeno exclusivamente artificial (Jeon, (67), 1973).

Las fases del ciclo alimenticio de las amibas comprende diferentes eventos como son: La captura del alimento, la deshidratación del alimento mediante las vacuolas alimenticias concomitante con la muerte de la presa, la subdivisión consecuente de la vacuola a pocas horas de haber sido ingerido el material, la coalescencia de las pequeñas vacuolas después de la digestión y su transformación en productos utilizados por el citoplasma y finalmente, la formación de vacuolas de expulsión o excretoras.

El contenido de estas vacuolas es expulsado de la célula generalmente a los 2 ó 3 días de fusión con el plasmalema y la incorpo-

ración de la membrana vacuolar con la superficie celular (Mast, (41, 42), 1938-1942; Andresen, (1), 1956; Torch, (58), 1959).

En los primeros estados de las vacuolas alimenticias, inmediatamente después de la captura de la presa, se observa una zona de "reorganización" alrededor de la membrana de la vacuola alimenticia, además de la iniciación del transporte vesicular de agua de la vacuola y los canales, principalmente en el citoplasma (Christiansen y Marshall, (21, 22), 1965).

Treinta minutos después de la formación de vacuolas, las enzimas digestivas empiezan a actuar, acompañadas de acumulación de una serie de vesículas que son los lisosomas ligados a la membrana y que vacían su contenido en las vacuolas, después de que se ha llevado a cabo, la deshidratación del alimento.

Posteriormente cuando se lleva a cabo la subdivisión de la vacuola original, se forma un material que rodea el citoplasma, concentrado principalmente alrededor de las vacuolas resultantes, que tienen como función la excreción.

Desde que Lösh en 1875 descubrió a Entamoeba histolytica, se supo que era una amiba hematófaga, pero actualmente sabemos que es capaz de ingerir otras células como son los leucocitos, linfocitos, monocitos y muy particularmente células hepáticas, capturándolas y englobándolas mediante la "Fagocitosis".

Este proceso tiene un papel biológico mayor del que se le suponía, hasta que en el Departamento de Cultivo de Tejidos se estudió y registró todo el proceso de incorporación y digestión de hematíes, la Eritrofagocitosis.

La Fagocitosis de otras células es semejante a la Eritrofagocitosis, por lo que este proceso nos indicará el mecanismo por el cual la amiba captura e incorpora al citoplasma sustancias sólidas que le sirven de alimento (Chévez, et. al. (16, 19), 1972).

En la Eritrofagocitosis la membrana plasmática tiene un papel biológico determinante para la captura e incorporación de las células, siendo además sorprendente el número de hematíes que Entamoeba histolytica puede incorporar, llegando al orden de centenares por hora y por microorganismo.

Este proceso comienza cuando en los trofozoítos se hace evidente una gran actividad general, pero principalmente se observa un aumento de su área y la emisión de pseudópodos de desplazamiento.

Durante la Fagocitosis se observa una capacidad de atracción a distancia de la membrana hacia los hematíes, adheriéndolos firmemente a su superficie y dirigiéndolos a la parte posterior, demostrando con este proceso una polaridad funcional; de tal manera que cúmulos de hematíes adheridos a la membrana son arrastrados durante el desplazamiento de la amiba y lentamente se incorporan al citoplasma.

Durante la incorporación los eritrocitos presentan modificaciones morfológicas causadas por la acción de la membrana, que llegan hasta la fragmentación del hematíe, el que una vez envuelto por la membrana pasa al citoplasma y es cubierto por una vacuola digestiva, que con su acción enzimática inicia la digestión.

Otro tipo de célula puede ser ingerida mediante la destrucción parcial e incorporación de fragmentos pero en general la Fagocitosis se efectúa a través de mecanismos diferentes:

- 1) Acción de enzimas proteolíticas que debilitan y rompen las uniones celulares.
- 2) Constricciones de la membrana sobre el tejido, provocando el desprendimiento de células que son ingeridas.
- 3) Acción traumática causada por el constante golpeo de la membrana sobre el tejido, que invade, observado directamente en el tejido hepático y del colon.

Nuestro Departamento ha hecho otra aportación de gran importancia en la Biología de Entamoeba histolytica al describir otra forma biológica para la captura de energía, completamente desconocida. Se refiere a la captura, fijación, y digestión externa en la superficie de la membrana plasmática, con la posterior absorción de energéticos a través de ella.

La fijación superficial se hace por una trompa de membrana y citoplasma que forma túneles a través de los cuales pasa el alimento al interior de la amiba.

Tanto la Fagocitosis como la Pinocitosis suele acompañarse de la llegada y concentración de finas granulaciones dispuestas en torno a las vesículas, muy densas al Contraste de Fases y que semejan a las Microquínestosferas de Rose.

## VI. Reproducción

El ciclo de vida de Entamoeba histolytica presenta una enorme complejidad morfofisiológica, tanto en su fase de quiste como en la de trofozoito.

El proceso de reproducción es aparentemente sencillo, se realiza mediante división celular directa, de tipo esquizogénico por bipartición, de corta duración, entre 20 y 40 segundos, sin que pueda predecirse el momento, por cambios morfodinámicos, en que un trofozoito va a dividirse; en la práctica se toma como referencia; cierta tendencia a mantener un estado de reposo con alargamientos del cuerpo; sin embargo, no siempre es seguro este signo. Si la amiba se va a dividir, se advierten en los extremos del cuerpo alargado movimientos de ciclosis en sentido opuesto.

La bipartición comienza con un simple alargamiento del cuerpo por movimientos polares opuestos de separación, formando un estrecho puente de citoplasma cada vez más delgado, que se transforma en filamento y termina rompiéndose, dando origen de esta manera a dos nuevos trofozoitos con volumen y contenido estructural celular aparentemente distribuído en partes iguales.

La división celular va precedida por la multiplicación nuclear, de manera que un trofozoíto generalmente mononuclear empieza, mediante estiramientos y estrangulamientos del núcleo, a producir dos o más núcleos, al principio de tamaños y formas diferentes. En todo caso la multiplicación nuclear no se acompaña en E. histolytica de mitosis o cariocinesis.

Algunas veces las estrangulaciones nucleares, no siempre seguidas por división citoplasmática, dan origen a trofozoítos gigantes multinucleados, en los que hemos podido observar hasta 26 núcleos; después de algún tiempo, y en las mismas condiciones, la masa citoplásmica del trofozoíto empieza a disminuir por el desprendimiento de porciones irregulares de citoplasma con núcleo, originando así trofozoítos más pequeños.

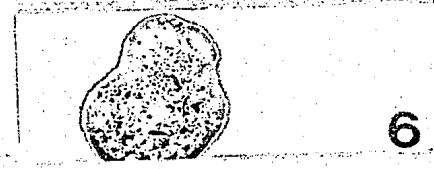
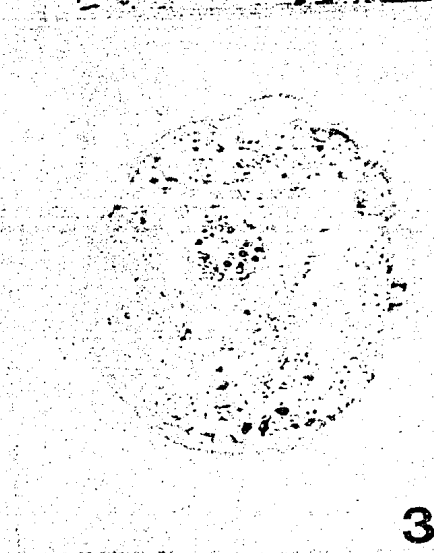
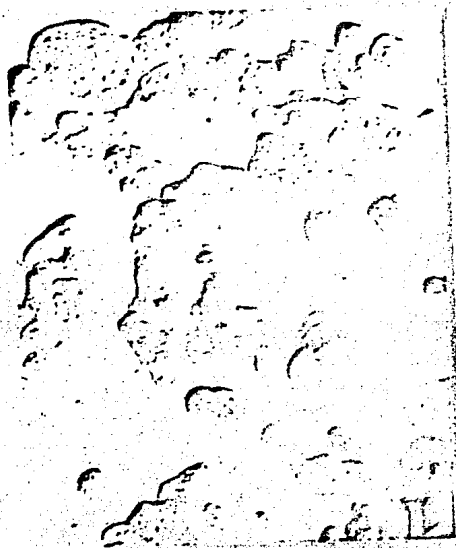
En este proceso de disgregación, algunas porciones de citoplasma se desprenden sin núcleo, después de algún tiempo se destruyen o son reincorporadas por la propia amiba o por alguna otra que se encuentre en la vecindad.

En ocasiones puede observarse que de un trofozoíto binucleado se originan dos amibas mononucleadas, pero de un tamaño notablemente diferente, diferencia que no desaparece y hace que en un mismo campo puedan observarse trofozoítos de diversos tamaños.

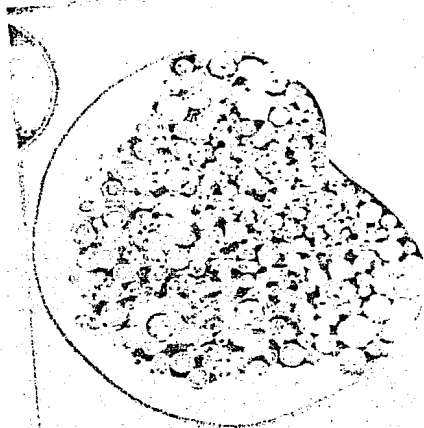


Esta variedad en el tamaño de los trofozoitos, ha conducido a pensar que se traten de especies, sub-especies o razas diferentes; sin embargo, es la misma amiba patógena para el hombre, Entamoeba histolytica.

Lamina 1



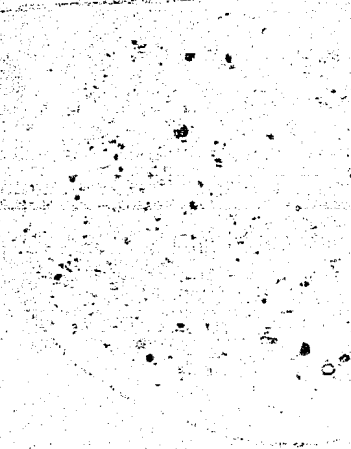
Lamina 2



7



8

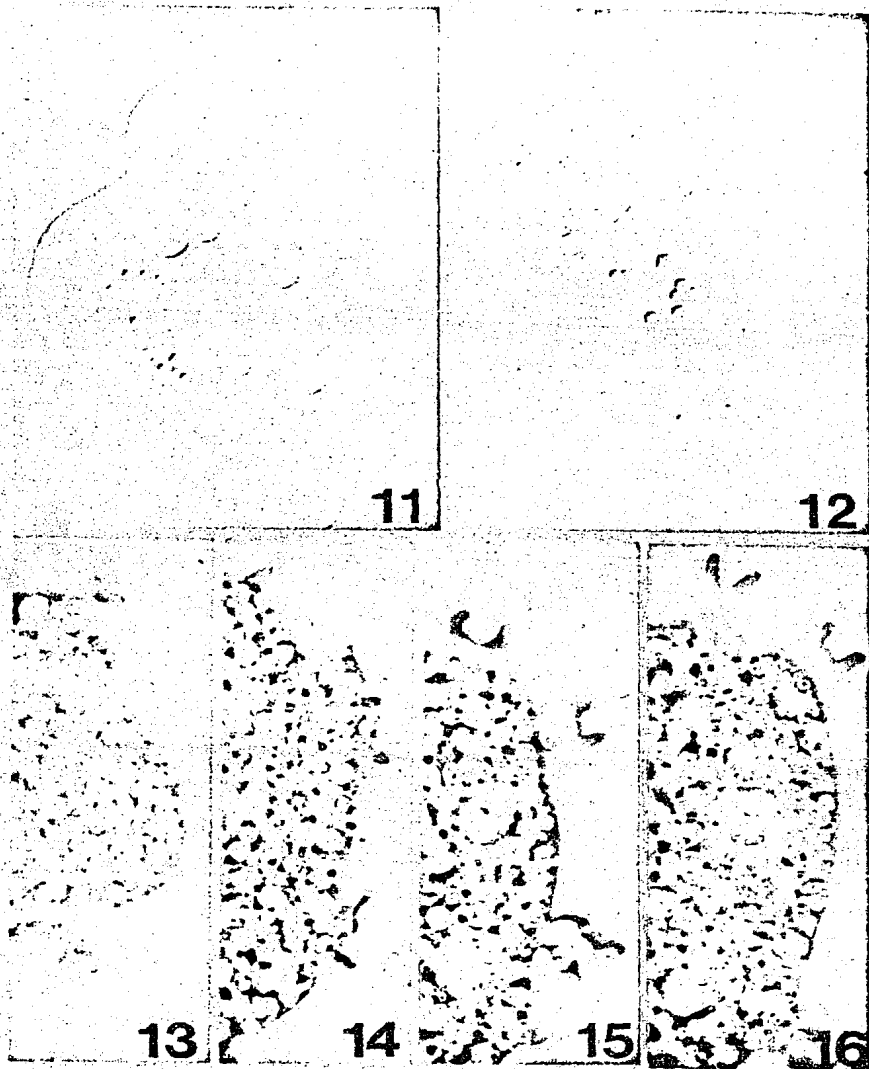


9



10

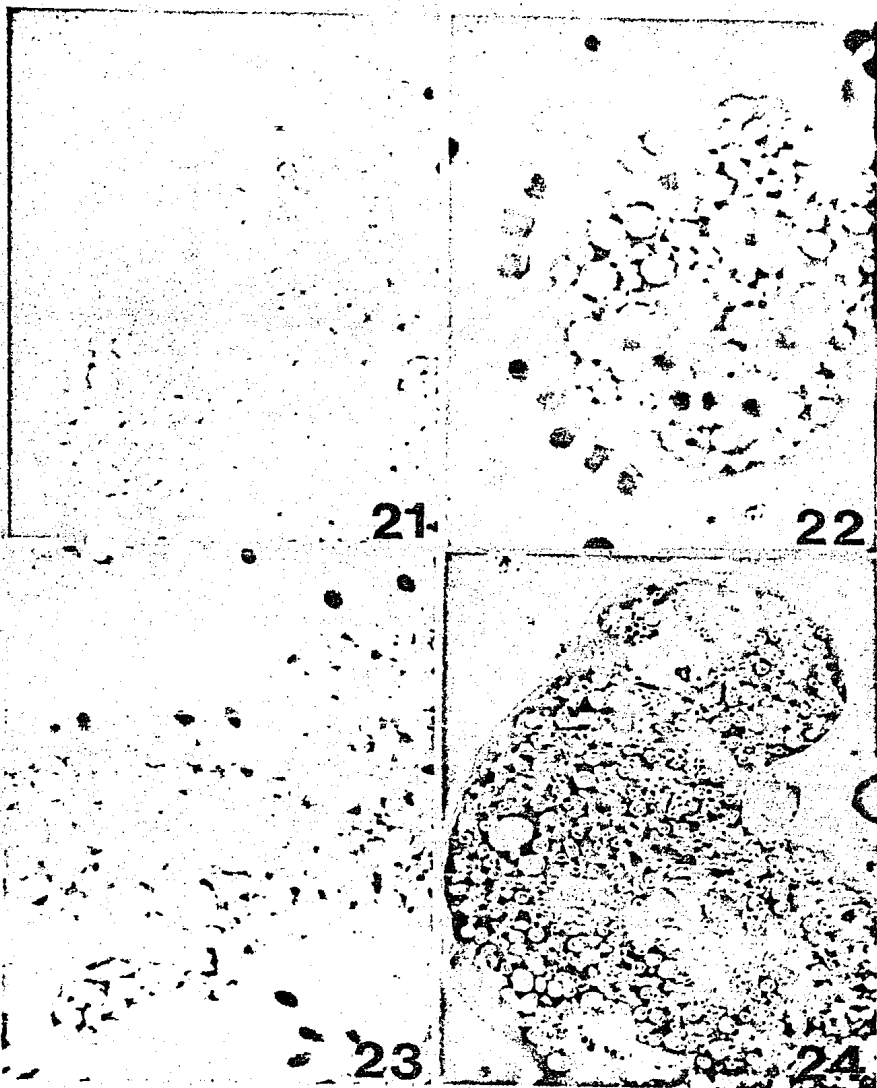
### Lamina 3



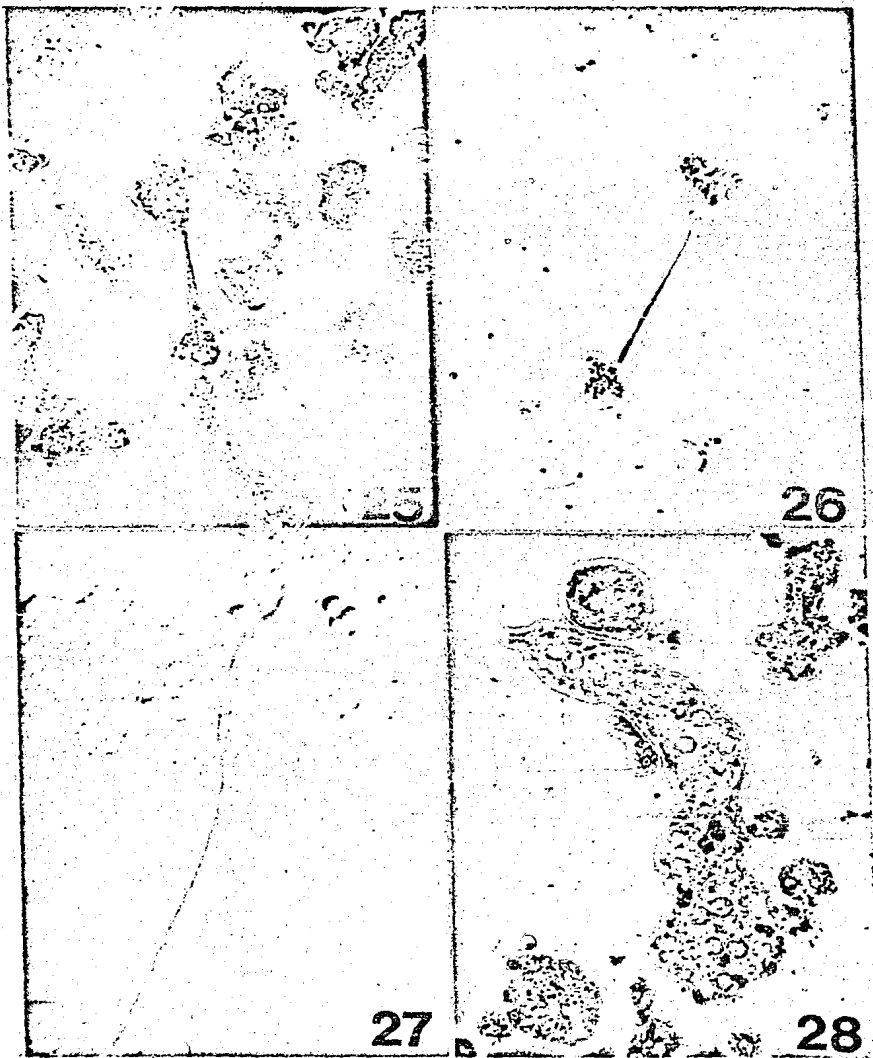
Lamina 4



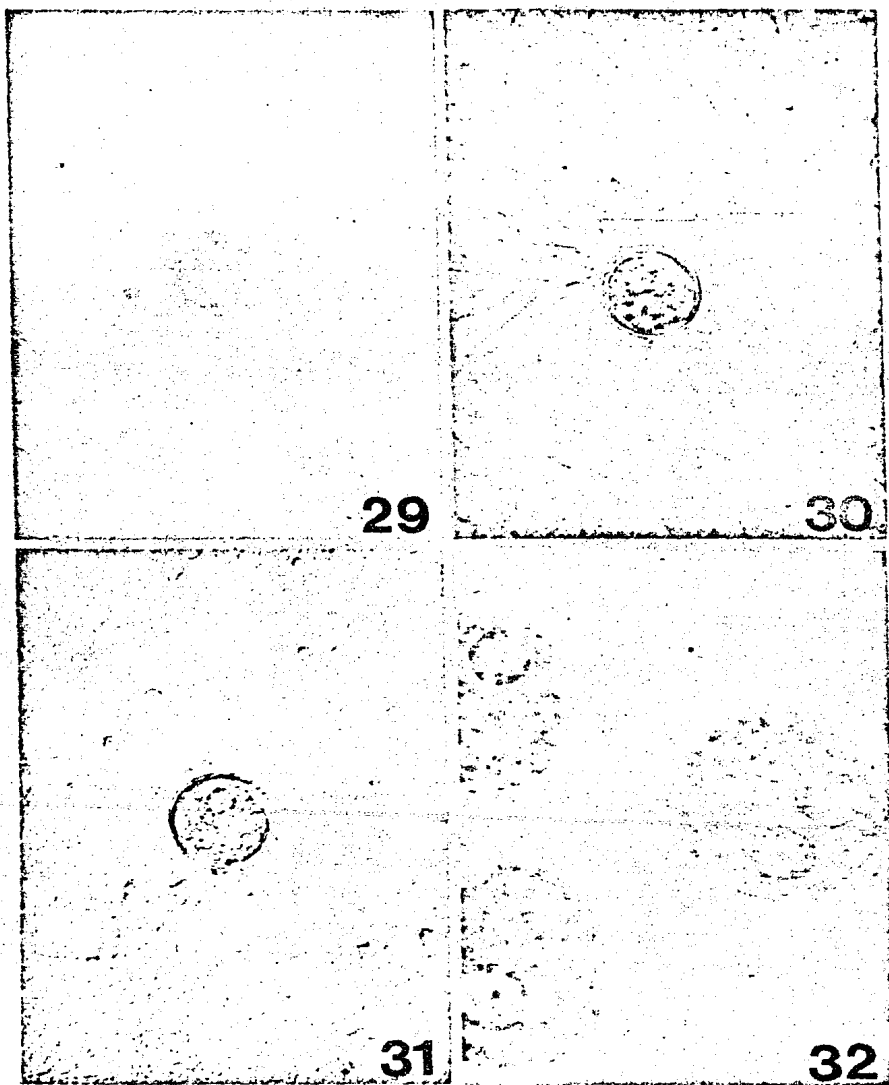
Lamina 5



Lamina 6



Lamina 7





## Discusión

Resulta extraña la forma como las amibas fueron conocidas por el hombre, habiendo pasado inadvertidas por el descubridor de los protozoarios, Anton van Leeuwenhoek (38). Fué Rösel von Rosenhof (68), pintor miniaturista y aficionado a la microscopía quien las vió por vez primera en 1755, al descubrir un microorganismo que constantemente cambiaba de forma y que llamó "der kleine proteus" (el pequeño proteo, que posteriormente Linneo (68), lo denominó Volvox chaos en 1758 y lo renombró Chaos proteus en 1767.

Ehremberg, (68), en 1839, creó el género Amoeba, y Gros (68), naturista ruso descubrió en 1849, la primera amiba parásita del hombre conocida como Amoeba gingivalis, posteriormente llamada Entamoeba gingivalis, por otro lado, Lewis (68) en 1870, observó a Entamoeba coli (Kudo (68), 1969).

Hasta el año de 1875 nada se sabía acerca de la existencia de Entamoeba histolytica y mucho menos de su naturaleza patógena - sobre el hombre, pero en ese año el Doctor Fedor Aleksandrevitch - Lesch (Lösch) la observó por vez primera en un campesino de la región de Arkangel, internado en una clínica de San Peterburgo, hoy

Leningrado (Martínez Báez (38), 1975).

A partir de entonces y al relacionarla con diversas lesiones observadas en varios órganos del cuerpo humano, el interés por conocerla a fondo aumentó constantemente, con las limitaciones que el desconocimiento de su ciclo de vida y la tecnología de la época imponían.

Al paso del tiempo se logró conocer más acerca de las lesiones causadas por este microorganismo, comprobando que es el agente causal de la enfermedad conocida como Amibiasis, pero de su Biología muy poco se logró saber, resultando incluso que su clasificación taxonómica fuera variable, siendo colocada durante muchos años en el género Endamoeba y posteriormente en el género Entamoeba, donde se incluyó a esta amiba, por compartir características morfológicas, principalmente a nivel del núcleo, descritas para este nuevo género.

En 1903 Huber precisó los caracteres diferenciales de los quistes de las amibas hasta entonces conocidas como parásitas del intestino humano: E. coli y E. histolytica. (Huber (68), 1903).

En el mismo año Schaudinn describió los detalles estructurales de estas dos especies de amibas y tiempo después se estableció definitivamente el nombre de Entamoeba histolytica (Martínez Báez (38), 1975).

Tradicionalmente se ha descrito a este organismo como un protozooario que se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, pero que prevalece principalmente en México, India, China, Africa y algunas regiones de Sudamérica. Tradicionalmente se le considera como una enfermedad tropical, sin embargo, su distribución no se restringe a las zonas tropicales y subtropicales, ya que se ha localizado en las regiones árticas y antárticas (Cheng (62), 1974).

La amiba vive en la luz y en los tejidos de la pared del colon del organismo humano, donde produce la Amibiasis intestinal, pero a través de la vena porta puede invadir a otros órganos como el hígado, pulmón, riñón, corazón, cerebro, piel y tejido subcutáneo perineal dando origen a la Amibiasis invasora (Flores-Baroeta et. al. (28), 1970).

Su ciclo de vida en el organismo humano no es completamente conocido pero se sabe que presenta dos fases: una activa, forma vegetativa, denominada trofozoïto y otra infestante llamada quiste, sin que aún se sepa el significado biológico de esta última (Kudo (68), 1969; Meglitsch (69), 1972).

El trofozoïto de este organismo es una amiba activa que mide entre 15 y 60 micras de diámetro, es típicamente monopódico y produce largos pseudópodos durante su movimiento acompañados de la formación de lobópodos eruptivos (Cheng (62), 1974).

Su citoplasma esta diferenciado muy claramente en un exoplasma hialino y un endoplasma granuloso y vacuolado que suele contener vacuolas, eritrocitos, leucocitos, fragmentos de tejidos de células epiteliales y bacterias. El núcleo es de tipo vesicular, con membrana visible cuando se tiñe, granulos periféricos comparativamente pequeños, endosoma central y pocos granos de cromatina dispersos.

El trofozoito se multiplica por división binaria directa en dos amibas pequeñas y con frecuencia de diferente tamaño que no suelen guardar ninguna relación una con otra; poco a poco crecen y después de unas horas se confunde con las demás. En condiciones "in vitro" se reproducen por millones durante el día.

El quiste juega un papel biológico desconocido, pero se considera como la forma infectante y resistente de Entamoeba histolytica. Es una estructura esférica rodeada de una pared resistente. contiene cuatro núcleos, adicionalmente glicógeno y cuerpos alargados refringentes semejantes a un bastón con extremos redondeados, llamados cuerpos cromatoides (Kudo (63), 1959; Farmer (65), 1980).

Los quistes suelen ser resistentes a la desecación y a ciertas sustancias químicas, pudiendo vivir hasta un mes en el agua, en las heces fecales 12 días y sobrevivir a temperaturas superiores a los

50 grados Centígrados (Cheng (62), 1974).

Los quistes al ser ingeridos, se establecen en el ileón y se desenquistan. Este proceso sólo se ha podido observar experimentalmente cuando son colocados en medios de cultivo, a temperaturas de 36 - 37 grados centígrados durante 5 ó 6 horas. La pared quística se rompe y emerge un trofozoito multinucleado que inmediatamente empieza a dividirse y aumenta de tamaño (Cheng (62), 1974).

Lo anterior coincide con la mayoría de las descripciones que de Entamoeba histolytica se han hecho, considerando a las amibas como microorganismos de gran simplicidad estructural y funcional relativa, pues su estudio citológico y dinámico más detallado, pone de manifiesto diferenciación morfológica y complejidad fisiológica propia de los organismos con gran actividad metabólica (Chávez et. al. (14), 1971).

Los resultados que presentamos en este trabajo se obtuvieron mediante la aplicación de las técnicas y metodología modernas del cultivo de células y tejidos, sistemas ópticos de microscopía moderna, como el contraste de fases, la interferencia policromática de la luz y el contraste diferencial de interferencia, además de registrar foto y cinematográficamente los momentos más vivaces de este microorganismo.

Esta forma de considerar a Entamoeba histolytica como célula y no como organismo, permitió observar detalladamente sus dife-

rentes procesos vitales, como son: el movimiento, la pinocitosis, la eritrofagocitosis, la fagocitosis, la división y la citogénesis.

Los trofozoítos mostraron una zona periférica hialina con activos movimientos de membrana y una zona central endoplásmica gruesa, vacuolada y con rápidos movimientos de cicloosis, se observó - de uno a dos núcleos de tipo vesicular y condensaciones cromáticas periféricas; el cariosoma es único y central.

La presencia en la región nuclear de finas esférulas aunque de función desconocida, son buena referencia para localizar al núcleo cuando éste se oculta en las numerosas granulaciones o vacuolas del citoplasma (Chévez et. al. (15), 1971).

El movimiento de los trofozoítos fué muy activo, y al observársele directamente a través de los sistemas ópticos resulta un espectáculo maravilloso de morfología dinámica.

Otras modificaciones morfológicas susceptibles de ser observadas y estudiadas "in vivo" fueron los mecanismos a través de los cuales las amibas incorporan energéticos del medio que los rodea: la Pinocitosis y la Fagocitosis.

Durante la Pinocitosis entra a la célula no sólo agua sino también sustancias disueltas o suspendidas en los líquidos. (Meltzer (44, 1904 y Lewis (37), 1931). Debe quedar bien establecido este concepto para aclarar otros estados vacuolares del citoplasma, como los ocurri-

dos durante la tumefacción y vacuolización aunados al desequilibrio osmótico.

Al descubrirse la pinocitosis se dedujo que podría ser una respuesta celular a variaciones del medio ambiente, basándose en que la pinocitosis se incrementa durante las primeras horas que siguen al cambio del medio nutritivo.

Tiempo después se asoció la pinocitosis con la fagocitosis, considerándola como una forma de fagocitosis selectiva y continua de líquidos (Lewis (37), 1931).

Los primeros estudios cuantitativos de la pinocitosis se realizaron en la amiba Chaos chaos mediante gamaglobulina marcada con fluoresceína y se observó que la amiba era capaz de incorporar líquidos que comprendían el 35 y 40% de su volumen total (Holter y Marshall (31), 1954). En el año de 1931 se obtuvieron valores semejantes en células de mamífero cultivadas in vivo. (Lewis (37), 1931).

En 1957 se observó que la adición de pequeñas cantidades de insulina al medio nutritivo producía un importante incremento cuantitativo de la pinocitosis sin modificar la selectividad (Paul (49), 1957). La influencia de esta hormona en el metabolismo tisulo celular esta en favor de considerar a la pinocitosis como un proceso anabólico.

Algunas sales y proteínas inducen e incrementan el fenómeno de la pinocitosis (Mast y Doyle (43), 1934). En 1954 se exploró la acción de varios cationes en Amoeba proteus encontrándose que el sodio y el potasio son capaces de inducir la pinocitosis, alterando la morfología dinámica del proceso al modificar la formación de canales y vacuolas (Chapman-Andresen (8), 1958).

Actualmente se desconoce el proceso de incorporación final de los energéticos contenidos en la vacuola pinocítica hacia el citoplasma; pero se puede considerar que las sustancias, previa digestión en la vacuola pasan la barrera interfásica por medio del transporte activo de membrana, lo que implicaría la coexistencia ordenada de captación de energéticos en la fase líquida, digestión intravesicular, transporte activo al contenido citoplásmico y su asimilación.

En células de mamífero, Holter y Marshall (31), 1954, y Gey et. al. (29), 1955, resaltaron la relación de las vacuolas pinocíticas y las partículas microesferulares que entran en relación con ellas, relacionándolas con las mitocondrias. Rose (51,52), (1956-1957) consideró que ciertos organelos están relacionados con la liberación de energía contenida en las vesículas pinocíticas y propuso el término de microquinetósferas.

De cualquier manera no se ha comprobado el papel biofísico-químico que algunos organelos entre ellos las mitocondrias pueden tener.



ner en el metabolismo y utilización de energía, o su participación en los procesos digestivos sobre los líquidos ingeridos durante la pinocitosis.

Empleando inhibidores metabólicos como el monóxido de carbono y cianuro de potasio en Amoeba proteus, se observó que disminuía notablemente la formación de bocas pinocíticas con resultados similares al utilizar bajas temperaturas (De Terra y Rustand (24, 53), 1959).

En Entamoeba histolytica, como en otras amibas, la pinocitosis tiene tales similitudes con la realizada por las células de mamífero cultivadas "in vitro" que desde que se observó por Mast y Doyle (43), en 1934, no ha habido impedimento para considerarla como tal, pero con diferencias considerables que son necesarias mencionar: En las células de mamíferos la pinocitosis se hace a través de característicos movimientos ondulatorios de la membrana, mientras que en Entamoeba histolytica se desarrolla todo un aparato captor iniciado con la emisión de prolongaciones digitiformes que a manera de labios constituyen una boca.

En las células de mamíferos una vez formada la vesícula pinocítica, es transportada por el citoplasma con una ordenación centripeta y sin la concurrencia de la formación de estructuras especiales; en la amiba con frecuencia la boca pinocítica se prolonga por medio de un túnel que recuerda el aparato captor nutricional de otros orga-

nismos unicelulares como los Myxomicetes, por ejemplo en Physarum policephalum, en el cual la boca pinocítica se continua con un largo tubo que atravieza la barrera exoendoplásmica y coloca al líquido en el endoplasma vecino al núcleo.

Los trofozoitos de Entamoeba histolytica y de otros protozoarios forman, con gran facilidad, estos aparatos de captura, siendo posible resaltar más aún el significado de la pinocitosis en la captura e ingestión de energéticos.

## Conclusiones

1. Entamoeba histolytica es un microorganismo, un Sarcodario, que en forma natural afecta sólo al hombre, localizándose en el intestino (colon), donde ocasiona la enfermedad conocida como Amibiasis intestinal.

2. Este protozoo tiene dos formas muy distintas, el trofozoito y el quiste, que constituyen la expresión morfodinámica de su ciclo biológico.

3. El trofozoito se considera la forma amibosa, vegetativa del microorganismo, y el quiste, la forma de resistencia, propagación y nueva infestación.

4. El trofozoito considerado como célula, desde el punto de vista de la citomorfología dinámica, permitió ver y reconocer " in vitro " la estructura celular y sus funciones vitales en impresionante armonía de materia y función.

5. La aplicación de los modernos sistemas ópticos de la microscopía fotónica, (campo oscuro, luz polarizada, contraste de fases, interferencia policromática de la luz, contraste diferencial de interferencia y fluorescencia espectral), revelaron detalles estructurales de

Entamoeba histolytica en su forma vegetativa, nunca antes imaginados.

6. El trofozoïto reveló sus componentes celulares clásicos: membrana, citoplasma, núcleo y abundantes organelos (gránulos, vacuolas, túbulos, etc.), todos participando en las funciones vitales: Endocitosis (pinocitosis, fagocitosis), reproducción, locomoción, etc.

7. En Entamoeba histolytica la Pinocitosis y la Eritrofagocitosis son dos procesos metabólicos muy importantes e impresionantes relacionados no sólo con la biología del microorganismo, sino también con su capacidad patógena.

8. Con los trofozoïtos de Entamoeba histolytica cultivados "in vitro", en especial con los de cultivo axénico, se pueden diseñar y armar modelos biológicos celulares, obteniéndose resultados muy impresionantes, hermosos y valiosos.

9. Los quistes de Entamoeba histolytica son una interrogante biológica en torno a la reproducción del microorganismo y a su capacidad de resistencia, propagación e infección.

10. La estructura y las evidencias morfodinámicas de los trofozoïtos y quistes de Entamoeba histolytica revelan una complejidad estructural y funcional de este sarcodario, muy superior a lo que antes se pensaba.

11. El empleo de las técnicas del Cultivo de Tejidos y de la microscopía fotónica, en la observación de los microorganismos vivos, ofrecen un camino seguro en el estudio morfodinámico de este protozario.

## BIBLIOGRAFIA

1. Andersen, N. (1956). Cytological investigation on the giant amoeba Chaos chaos.  
Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 29: 435-555.
2. Boexk, W. C. and I. Drobhlay. (1925). The Cultivation of Entamoeba histolytica.  
Am. J. Hyg. 5:371.
3. Brandt, P.W. (1958). A study of mechanisms of pinocytosis.  
Exp. Cell. Res. 15:300.
4. Brandt, P. W. and A. R. Freeman. (1967). Plasma membrane. Substructural Changes correlated with electrical resistance and pynocytosis.  
Science 155: 582-585.
5. Brandt, P. W. and K. B. Hendil. (1970). In surface Chemistry of Biological Systems.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 323-335.
6. Brandt, P. W. and G. D. Pappas. (1962). An Electron microscopic study of Pinocytosis in Ameba.  
J. Cell. Biol. 15:55.
7. Castelazo, A. L. (1975). Discurso Inagural. Memoria 5 de la conferencia Internacional sobre Amibiasis. IMSS. México.  
33-57.
8. Chapman-Andresen, C. (1958). Pinocytosis of inorganic salts by Amoeba proteus.  
Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Chim. 31:77
9. Chapman-Andresen, C. (1960). Lecture. In X th.  
Int. Congr. Cell. Biol. p. 100 Paris.
10. Chapman-Andresen, C. (1962). Studies on Pinocytosis in Amoebae.  
Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. 33:73-264.

11. Chapman-Andresen, C. and Holter, H. (1964). Differential uptake of protein and glucose by pinocytosis in Amoeba proteus. Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. 34:211-226.
12. Chapman-Andresen, C. and D. M. Prescott. (1956). Studies on pinocytosis in the amoebae Chaos chaos and Amoeba proteus. Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 30:57.
13. Chévez, A.; I. Iturbe Alessio; M. Aubanel y M. Segura. (1971). Actividad fibrinogénica y fibrinolítica de Entamoeba histolytica sobre el plasma humano *in vitro*. Arch. Inv. Méd. Vol. 1:211-208.
14. Chévez, A.; I. Iturbe Alessio; M. Aubanel. (1971). Cambios en el trofozoito de Entamoeba histolytica producidos por modificaciones en el medio. Arch. Inv. Med. Vol. 1: 219-228.
15. Chévez, A.; I. Iturbe Alessio; M. Aubanel y M. Segura. (1971). Aspectos morfológicos en la biología del trofozoito de Entamoeba histolytica a través de diferentes sistemas ópticos. Arch. Inv. Med. Vol. 1:229-244.
16. Chévez, A.; I. Iturbe Alessio; M. Segura y D. Corona. (1972). Relaciones biológicas entre E. histolytica y otras células. I. Complejo de asociación amiba-leucocito. Arch. Inv. Med. Vol. 2:241-256.
17. Chévez, A.; I. Iturbe Alessio; M. Segura y D. Corona. (1972). Esférulas yuxtannucleares de E. histolytica. Estudio morfológico y dinámico. Arch. Inv. Med. Vol. 2:257-264.
18. Chévez, A.; I. Iturbe Alessio; M. Segura y D. Corona. (1972). La pinocitosis como expresión anabólica de E. histolytica. Arch. Inv. Med. Vol. 2:265-274.
19. Chévez, A.; I. Iturbe Alessio; M. Segura y D. Corona. (1972). Fagocitosis de eritrocitos humanos por E. histolytica. Arch. Inv. Med. Vol. 2:275-286.
20. Chévez, A.; B. Sepúlveda; M. Segura e I. Iturbe Alessio. (1973). Respuestas morfológicas de los trofozoitos de E. histolytica a la acción del suero humano inmune correspondiente. Arch. Inv. Med. Vol. 1:71-78.

21. Christiansern, R. G., and J. M. Marshall. (1965). A study of Phagocytosis in the amoeba Chaos chaos.  
Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. 35:419-436.
22. Christiansen, R. G. and J. M. Marshall. (1965). A study of Phagocytosis in the amoeba Chaos chaos.  
J. Cell. Biol. 25:443.
23. Cooper, B. (1968). Study on Pinocytosis in Amoeba.  
Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg 36:385.
24. De Terra, N. and R. C. Rustand. (1959). The dependance of Pinocytosis on temperature and aerobic respiration.  
Exptl. Cell Res: 17:191.
25. Diamond, L. S. (1968). Improved Method for the monoaxenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 and E. histolytica - like amebae with trypanosomatids.  
J. Parasit. 54:715.
26. Diamond, L. S. (1968). Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica - like amebae.  
J. Parasit. 54:1047.
27. Edwards, J. G. (1925). Formation of food-cups in amoebae induced by chemicals.  
Biol. Bull. 48:236.
28. Flores-Barroeta, F.; R. Saavedra-Shimidzu, R. y Velasco-Aviles. (1970). Invasión de Entamoeba histolytica a diversos órganos y tejidos en sujetos humanos.  
Arch. Inv. Med. Vol. 1:129-146.
29. Gey, G. O.; P. Shapras; P. B. Ban and M. K. Gey. (1955). Fine Structure of Cells.  
New York, Interscience Publishers, Inc. p. 38.
30. Hendil, K. B. (1971). Membrane Resistance during the pinocytosis.  
Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg 38:187.
31. Holter, H. and J. M. Marshall (1954). Studies on Pinocytosis in the Amoeba Chaos chaos.  
Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Sér. Chim. 29:7.



32. Jacobs, L. (1947). The elimination of viable bacteria from cultures of Entamoeba histolytica and the subsequent maintenance of SUCH cultures. Am. J. Hyg. 46:172.
33. Josefsson, J. D. (1968). Some bioelectrical properties of A. proteus. Acta Physiol. Scand.
34. Kornick, H.; W. Stockem and K.E. Wohlfarth-Bottermann. (1972). An Study of Pinocytosis. Int. Rev. Cytol. 66:395.
35. Landa, L.; M. Guerrero Alcazar; I. Iturbe Alessio y A. Chévez. (1973). Estudio "in vitro" de la actividad farmacológica de drogas antiamebianas. Arch. Inv. Med. Vol. 1:87-92.
36. Levine, N. D.; J. O. Corliss, F.E.G. Cox; G. Deroux; J. Grain; B. M. Honigberg; G. F. Leedale; A.R. Loeblich; J. Louis; D. Lynn; E. C. Merinfeld; G. Paljansky; V. Sprangue; J. Vavra and F. G. Wallace (1980). A newly revised classification of the Protozoa. J. Protozoo 27 (1): 37-58.
37. Lewis, W. H. (1931). Pinocytosis. Bull. Johns Hopkins Hosp. 49:17.
38. Martínez Baéz, M. (1975). Historia de la Amibiasis. Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amibiasis. IMSS. México 45-52.
39. Marshall, J. M. and V. T. Nachmias. (1965). Cell Surface and Pinocytosis. J. Histochem. 13:92.
40. Marshall, J. M.; V. N. Schumaker and P. W. Brand. (1959). Pinocytosis in amoebae. Ann, N. Y. Academic Sci. 78, 515-523.
41. Mast, S. O. (1938). Digestion of fats in Amoeba proteus. Biol. Bull. 75: 389-394.

42. Mast, S. O. (1942). The hydrogen ion concentration of the content of the food vacuoles and the cytoplasm in Amoeba and other phenomena concerning the food vacuoles.
43. Mast, S.O., and W. L. Doyle. (1934). Ingestion fluid by amoebae. *Protoplasma* 20:555.
44. Meltzer, S. J. (1904). Edema. *Amer. J. Med.* 8:19.
45. Nachmias, V. T. (1968 a) Further electron microscope studies on fibrillar organization of the ground cytoplasm of Chaos chaos. *J. Cell. Biol.* 38:40.
46. Nachmias, V. T. (1968 b) Inhibition of streaming in amoeba by pinocytosis inducers. *Exp. Cell. Res.* 51:347.
47. Ortíz, O. L.; B. Sepúlveda; A. Chévez; y A. Iturbe-Alessio; (1973). Efecto de la gamma globulina inmune antiambiobiana sobre el trofozoito de E. histolytica. *Arch. Inv. Med. Vol. I:79-86*.
48. Pan, T. (1960). Studies on the monoxenic cultivation of E. histolytica with hemoflagellates. *J. Inf. Dis.* 106:284.
49. Paul, J. (1957). Demostration of the IX International Congress for Cell Biology. St. Andrews. Agosto 28-Septiembre 3.
50. Phillips, B. T. (1950). Cultivation of Entamoeba histolytica with Trypanosoma cruzi. *Science* 3:8.
51. Rose, G. G. (1956). Cinematographic Analysis of the mechanisms of development of VP cell (Variant Pinocytic cells) in Gay's strain hela. *Proc. Am. As sn. Cancer. Rer.* 2:145.
52. Rose, G. G. (1957). Microkinetospheres and VP satellites of Pinocytic cells observed in tissue cultures of Gey's strain hela with phase contrast cinematographic techniques. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5:697.
53. Rustand, R.C. (1959). Molecular orientation at the surface of amoeba during pinocytosis. *Nature. London,* 183:1058-1059.

54. Rustand, R. C. (1961). Pinocytosis.  
Sci. Amer. 204 (4):121.
55. Schumaker, V. N. (1958). Uptake of protein from solution by Amoeba proteus.  
Exp. Cell. Res. 15:314.
56. Shaffer, J. G. and W. W. Frye. (1947). Studies of the growth requirement of Endamoeba histolytica. I. Maintenance of strain of E. histolytica through one hundred transplants in the absence of an active y multiplying bacterial flora.  
Am. J. Hyg. 47:214.
57. Stockem, W. (1966). Versuche mit p<sup>32</sup> an Amoeba proteus.  
Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 74:372.
58. Torch, R. (1959). The cytology of Pelomyxa.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 78:407.
59. Torre de la, M.; L. Landa; B. Sepúlveda. (1970) Avances en los métodos para el cultivo de E. histolytica.  
Arch. Inv. Med. Vol. 1:9-14.
60. Wohlfarth-Bottermann, K. E. and Stockem, W. (1966). Amoeba proteus und ihre Deutung durch genetische Untereinheiten.  
Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 73:444.

## LIBROS

61. Baker, J. R. (1973). Parasitic Protozoa.  
2nd. Edition. Hutchinson University Library. London.
62. Cheng, T. (1974). General Parasitology.  
Academic Press. New York.
63. Craig, G.; Faust, C. (1979). Parasitología Clínica.  
Salvat Ed. Barcelona.
64. Döbel, C. (1960). Antony van Leewenhoeck and His "Little animals"  
Dover Publications, INC. New York.
65. Farmer, J. (1980). The Protozoa Introduction to protozoology.  
The C. U. Mosby Co. St. Louis, Missouri.
66. Jahn, T. L.; Bovee, E. C. and Jahn, F.F. (1980). How To Know  
The Protozoa.
67. Jeon, K. W. (1973). The Biology of Amoeba.  
Academic Press; Inc. New York.
68. Kudo, R. R. (1976). Protozoología.  
Compañía Editorial Continental, S. A. México.
69. Meglitsch, P. A. (1972). Invertebrate Zoology.  
2nd. edition. Oxford University Press. New York.