

302827

5



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

Con estudios incorporados a la U. N. A. M.

**MODIFICACION DEL PATRON ELECTROFORETICO DE
LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica*
CULTIVADA CON ANALOGOS DE PIROFOSFATO
Y METABOLITOS AISLADOS DE
*Zanthoxylum liebmanniarum***

FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A
ANA BERTHA CAMACHO VARGAS

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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.

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO "FEDERICO GO -
MEZ" BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. ENEDINA JIMENEZ CARDOSO JEFE DEL LA -
BORATORIO DE INVESTIGACION EN PARASITOLOGIA.**

A mis padres:

*Félix Camacho Torres y Ana María Vargas de Camacho.
Por su esfuerzo realizado para darme una profesión y por
su gran ejemplo de superación y honestidad.
Con mi más profundo cariño, como mínimo esfuerzo para
honrarlos.*

*A mis hermanos, cuñadas y sobrinos:
con fraternal cariño.*

*A la Familia Jiménez Rivera
por el gran apoyo que me brindaron en todo momento para
la culminación de mi carrera.*

*A mi tía Cata
por su compañía y cariño que siempre me ha brindado.*

*A mi tía Chela
Por sus hábiles y sabias consejas. Gracias por estar cerca de mí.*

***Al Ing. Jorge Sancho Rodríguez,
Quien siempre ha estado cerca de mí
el cual con su afecto y pensamiento
me dio la fuerza e inspiración para
llegar a esta meta.***

***Así también, quiero hacer patente mi agradecimiento
especial al Dr. José Luis Romero Zamora quien coadyuvó
al buen desarrollo de este trabajo.***

*A la Escuela de Química de la Universidad Motolinía,
por permitirme llegar dentro de sus aulas a una formación
profesional durante los estudios realizados en ella.*

*A todos mis maestros que participaron con sus conocimientos
y consejos para que llegara a la meta deseada.*

*A la Dra. Enedina Jiménez Cardoso
por su acertado asesoramiento en la investigación
del presente trabajo.*

*Y a todas aquellas personas que de alguna forma
participaron y me apoyaron para la terminación
de este trabajo, a todos ellos, mis más sinceros
agradecimientos.*

AL HONORABLE JURADO

DR. BENJAMIN NOGUEDA TORRES

M. EN C. RICARDO ALEJANDRE

Q.F.B. GUADALUPE ANGELICA LOPEZ SOTELO

Q.F.B. GRACIELA SOSA GARCIA

INDICE

Capítulo I

1. INTRODUCCION

	Página
1.1 Planteamiento del problema	1.
1.2 Objetivos	3.
1.3 Hipótesis	3.

Capítulo II

2. ANTECEDENTES

2.1 Amibiasis	4.
2.2 Antecedentes de la planta en estudio	5.

Capítulo III

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama general	7.
3.1.1 Diagrama con análogos de Pirofosfato	8.
3.1.2 Diagrama del extracto crudo de <u>Zanthoxylum liebmanniarum</u>	9.
3.1.3 Diagrama con metabolitos aislados de <u>Zanthoxylum liebmanniarum</u> .	10.

3.2	Material, reactivos y equipo	11.
3.2.1	Material biológico	11.
	3.2.1 Cepa de <u>Entamoeba histolytica</u> HMII- IMSS	11.
3.2.2	Material de laboratorio	11.
3.2.3	Reactivos	12.
3.2.4	Equipo	13.
3.2.5	Preparación de reactivos	13.
	3.2.5.1 Cultivo axénico de <u>Entamoeba histolytica</u>	13.
	3.2.5.2 Preparación de los lisados (mezcla estabilizadora)	15.
	3.2.5.3 Corrimiento electroforético	16.
	3.2.5.4 Desarrollo de la reacción	17.
3.3	Metodología	19.
3.3.1	Análogos de Pirofosfato	19.
3.3.2	Investigación del número y la viabilidad de <u>Entamoeba histolytica</u> cultivada en presencia de seis diferentes - concentraciones de tres análogos de Pirofosfato	19.
3.3.3	Investigación de la modificación en el patrón isoenzimático de la Fosfoglucomutasa (E.C.2.7.5.1) de <u>Entamoeba histolytica</u> cultivada en presencia de seis diferentes concentraciones de análogos de Pirofosfato y sin ellos.	20.
3.3.4	Investigación del número y viabilidad de <u>Entamoeba histolytica</u> cultivada en presencia del extracto crudo de <u>Zanthoxylum liebmanniarum</u> .	21.
	3.3.4.1 Extracto de <u>Zanthoxylum liebmanniarum</u>	21.
	3.3.4.2 Metabolitos secundarios de <u>Zanthoxylum liebmanniarum</u>	21.
3.3.5	Investigación de la modificación al patrón isoenzimático de la Fosfoglucomutasa (E.C.2.7.5.1) de <u>Entamoeba histolytica</u> cultivada en seis diferentes concentraciones del extracto crudo de <u>Zanthoxylum liebmanniarum</u> y sin ellas	22.
3.3.6	Investigación de la modificación al patrón isoenzimático de Fosfoglucomutasa (E.C.2.7.5.1) de <u>Entamoeba histolytica</u> cultivada en dos diferentes concentraciones de los 10 metabolitos aislados de <u>Zanthoxylum liebmanniarum</u>	22.

3.4 Análisis estadístico

23.

Capítulo IV

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Resultados

24.

4.2 Discusión

53.

Capítulo V

5. CONCLUSIONES

55.

BIBLIOGRAFIA

57.

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El patrón isoenzimático de Entamoeba histolytica ha sido considerado como un parámetro de virulencia por diferentes autores (18,20,27,31,32,38,40).

En otros estudios realizados, se demostró que éste podía modificarse (43), coincidiendo con otras personas durante la axenización de cultivos monoxénicos (4,8,9,25,26,39); eliminándose la correlación entre una ameba invasora y un determinado zimodemo. Sin embargo, en fechas recientes no se ha podido reproducir los resultados de esta modificación, corroborándose la estabilidad del perfil isoenzimático (6,16,17,27).

La parcial caracterización de la hexocinasa (7) una de las isoenzimas que se utiliza para diferenciar cepas patógenas de las que no lo son, mostró similitudes en su estructura en ambas cepas, aunque el corrimiento isoenzimático es diferente en cada una de ellas. Infiriendo que la electromovilidad podría estar influenciada por otros parámetros. Entre ellos las condiciones de cultivo en donde la presencia de bacterias fue determinante (24). Pues como se ha descrito el zimodemo o patrón isoenzimático de la hexocinasa cambio durante la axenización.

Otro factor que puede influir es el relacionado a las condiciones nutricionales del medio de cultivo; así se ha demostrado un incremento de las enzimas modificando la virulencia del protozoario cuando fueron cultivadas en presencia de colesterol (19).

Otro posible factor es la heterogeneidad enzimática que se puede presentar en la fosfomonoesterasa (1) y más aun al fagocitar bacterias puede retener sus enzimas, específicamente hidrolasas bacterianas para producir hidrógeno. De ahí se explica la susceptibilidad de Entamoeba histolytica a los agentes oxidantes (14). Por otro lado la importancia de crecer en presencia de bacterias se relaciona con la virulencia de Entamoeba histolytica pues los trofozoitos cultivados axénicamente la incrementan cuando se les adiciona estos microorganismos o cuando se inoculan en el hígado del hámster (46).

Una de las explicaciones que se proponen es que probablemente el DNA de las bacterias se incorpora temporalmente al protozoario y esta modificación es suficiente para justificar estos hechos.

Por otro lado Entamoeba histolytica cuenta con un número muy importante de enzimas localizadas en la membrana y en el citoplasma de ellas, y estas son capaces de degradar sustratos como el colágeno (29).

Entamoeba histolytica es un protozoario con capacidades enzimáticas muy particulares sobre todo en el mecanismo de carbohidratos (35,36), como al utilizar pirofosfato para fosforilar a la Fructosa 6 P y formar Fructosa 1,6 difosfato mediante la Fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato (E.C.2.7.5.1.90) en lugar de emplear ATP (E.C.2.7.1.11). Con éste descubrimiento se realizaron estudios señalando que la Fosfofructocinasa amibiana dependiente de Pirofosfato inorgánico (E.C.2.7.1.90) puede ser inhibido por análogos de Pirofosfato inorgánico trayendo como consecuencia una disminución en su viabilidad (12).

Por otro lado se ha descrito al Colopahutle (Zanthoxylum liebmanniarum), planta medicinal del Valle de Puebla como una de las utilizadas en el tratamiento de la infección amibiana. En base a esta información adquirida se motivó el interés por realizar estudios de un efecto amebicida específico en los extractos de su corteza para corroborar su acción farmacológica anti-amibiana sugerida por un conocimiento empírico popular.

1.2 OBJETIVOS

1. Investigar el posible efecto letal de dos concentraciones de 10 metabolitos -- aislados de Zanthoxylum liebmanniarum sobre cultivos axénicos de Entamoeba histolytica.
2. Investigar el posible efecto de seis concentraciones de los análogos de Pirofosfato, los cuales se postula inhiben a la enzima Fosfofructocinasa dependiente de Pirofosfato lo cual ocasionará alteración en la vía glicolítica y por lo tanto producirá un efecto tóxico sobre los trofozoitos.
3. Investigar las posibles alteraciones isoenzimáticas que se reflejen en la electromovilidad de la Fosdoglucmutasa (E.C.2.7.5.1) interpretando que éste podría ser una consecuencia del efecto letal producido en los trofozoitos de -- Entamoeba histolytica.

1.3 HIPÓTESIS

Los extractos de Zanthoxylum liebmanniarum tienen un efecto letal sobre los cultivos de trofozoitos de Entamoeba histolytica que se manifiesta por cambios en el patrón electroforético isoenzimático específicamente de la Fosdoglucmutasa -- (E.C.2.7.5.1).

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 AMIBIASIS.

Entamoeba histolytica fue descubierta por el Dr. Friedrich Lösh (21) en las heces de un paciente varón con disentería, en San Petesburgo, Rusia. El investigador siguiendo los postulados de Koch logró reproducir la enfermedad en perros, señalando a Entamoeba histolytica como la responsable de la disentería amibiana.

En 1903 Fritz Schaudinn (41) precisó aún más los caracteres estructurales de Entamoeba y la denominó histolytica por su capacidad para lisar tejidos. Este protozoo presenta diferentes fases en su ciclo de vida: Trofozoito, prequiste, quiste, metaquiste y trofozoito metaquistico. (13,22). Los quistes tienen importancia porque constituyen la fase infectante del huésped. Las formas más frecuentes de transmisión son la contaminación de alimentos y la transmisión de persona a persona. Otro factor importante en la transmisión es la forma como se eliminan las excretas en una comunidad. La contaminación fecal de las manos por falta de higiene y la contaminación del agua a través del fecalismo al aire libre que lleva las heces hacia ríos, arroyos o depósitos de agua mal protegidos. (5,30,43).

Entamoeba histolytica es un protozooario entérico cosmopolita del hombre, afecta al 10% de la población mundial siendo la mayor parte portadores asintomáticos. Podría asegurarse que no existe un país libre de este protozooario. Es el responsable de 60,000 muertes anuales en el mundo por lo que constituye un problema de salud pública muy importante (45).

Recientemente se ha incluido en este problema a los homosexuales en quienes este protozooario puede permanecer como comensal o invasor. (3,23).

En nuestro país la amibiasis es la protozoosis más importante, su prevalencia es muy variable va de 9.95% a 14% variando de acuerdo a las personas estudiadas y la localidad. (15).

Es por ello que la amibiasis ocupa un lugar relevante como causa de enfermedad y de muerte. De 5209 autopsias, ésta ocupó el 7o. lugar como causa de muerte. (34).

Entamoeba histolytica puede cursar con o sin manifestaciones clínicas, siendo esto un gran problema, pues los trofozoitos pueden permanecer como comensales en la luz del intestino sin producir daño aparente, o invadir el epitelio intestinal pasando a circulación y otros órganos por razones desconocidas. Apesar del número y la calidad de la investigación los mecanismos de patogénesis en Entamoeba histolytica continúan siendo un enigma. (3).

Dentro de la fisiopatogenia de la amibiasis la adherencia mediada por carbohidratos (33) constituye el primer contacto con las células del huésped para después producirse una citólisis de la células adheridas por la amiba y finalmente la fagocitosis de las mismas así como globulos rojos.

2.2 ANTECEDENTES DE LA PLANTA EN ESTUDIO.

El género Zanthoxylum de la familia de las rutáceas, comprende alrededor de 80-especies, encontradas principalmente en Africa, Australia y América. En México se localiza al Norte y Centro de la República hasta llegar al sur de Oaxaca, en Michoacán, Hidalgo, Puebla y Chiapas.

Muchas especies de este género tienen una amplia reputación como plantas medicinales en varias partes del mundo, de las cuales se han aislado y caracterizado gran variedad de metabolitos secundarios de interés farmacológico.

El Valle de Tehuacán está ubicado en el sureste del estado de Puebla y norte de Oaxaca; altitud promedio 1,580 m sobre el nivel del mar; clima semiárido; población: Popolacas y Nohuas. En esta zona se realizó una exploración etnobotánica de información bilateral (intercambio de datos y material con la gente). Dentro de las especies de uso medicinal se encontró en San Andrés Cacaloopan, Puebla al Colopahtle (Zanthoxylum liebmanniorum), que en Náhuatl significa "yerba de la lengua", al masticar su corteza produce sensación de adormecimiento en la lengua.

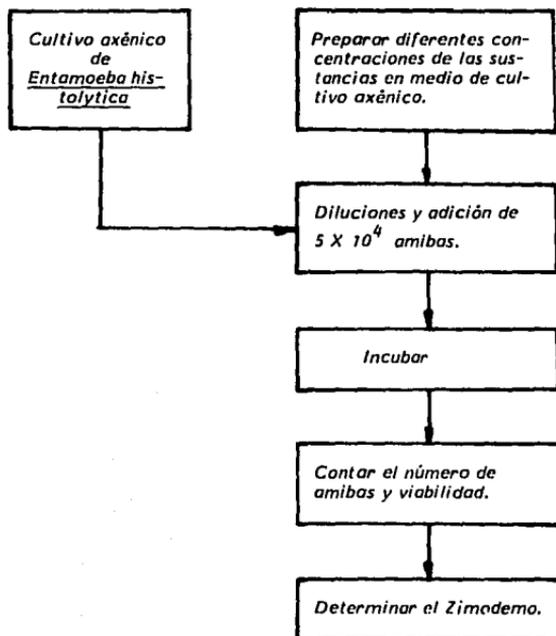
Es un arbusto ó árbol pequeño de 3-4.5 m de altura, es con espinas o sin espinas - esparcidas, folíolos de 1.3 cm de largo verde amarillento y granulados con dientes - muy pequeños, semillas negras lustrosas y brillantes. Presenta actividad biológica en su corteza.

La infusión acuosa de su corteza se utiliza como remedio contra la amibiasis e infecciones parasitarias intestinales y en ocasiones como anestésico local. (42,44).

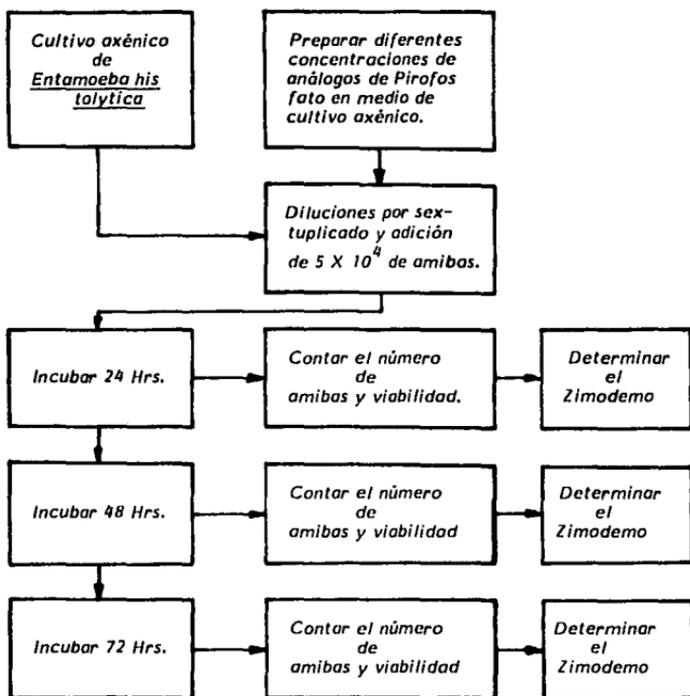
CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

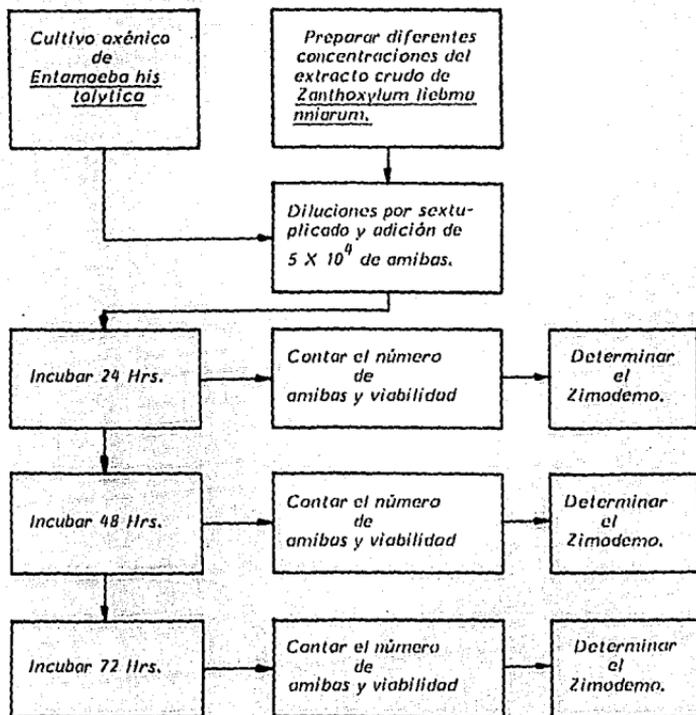
3.1 DIAGRAMA GENERAL



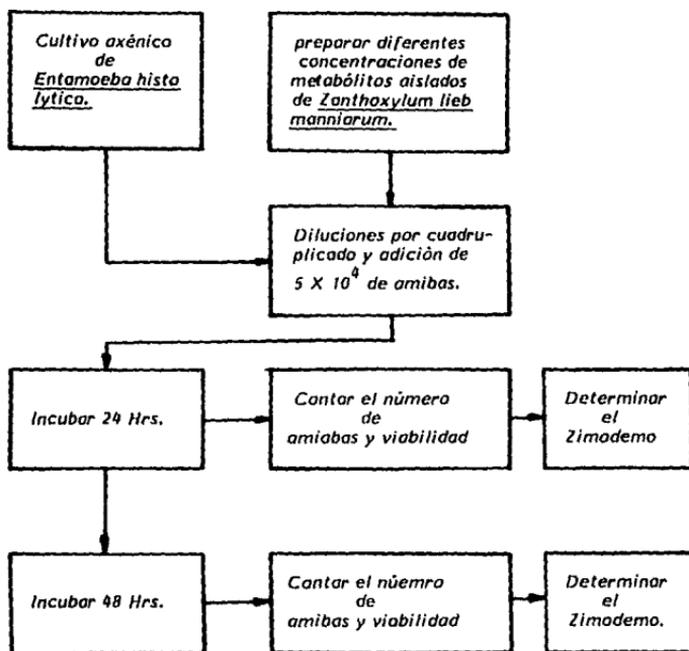
3.1.1. DIAGRAMA CON ANALOGOS DE PIROFOSFATO



3.1.2 DIAGRAMA DEL EXTRACTO CRUDO DE Zanthoxylum liebmanniarum.



31.3. DIAGRAMA CON METABOLITOS AISLADOS DE Zanthoxylum liebmanniarum.



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO.

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.-

- 3.2.1.1. Cepa de Entamoeba histolytica HMI - IMSS.- Se cultivó axénica —
mente por el método de Diamond (10) que se describe en el inciso
3.2.5.1.

3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO.

Agitador magnético

Baño de hielo

Gradilla para tubos

Mechero Bunsen

Papel filtro Whatman No. 1 cualitativo

Parrilla de alambre

Peine de plástico

Pinzas de punta

Piceta de 500 ml

Tela absorbente Spontel

Tela de alambre con asbesto

Tubos de plástico Falcon para centrifuga con tapón de rosca

Material de vidrio:

Cámara de Neubauer

Cubre objetos

Embudo de talle largo

Frascos ambar de 50 ml

Matraz Kitazato de 500 ml.

*Matraz Erlenmeyer Pyrex de 100 y 250 ml. con tapón de —
rosca.*

Matraz aforado de 10, 50 y 100 ml

Pipetas Pasteur

Pipetas serológicas de 1.0, 2.0, 5.0 y 10 ml

Placas de vidrio de 15 X 25 cm

Probetas de vidrio de 100, 500 y 1000 ml

Portaobjetos

Tubos de ensayo de 10 X 100 mm con tapón de rosca

Tubos de ensayo de 13 X 100 mm

3.2.3. REACTIVOS

Ácido ascórbico. Cristales. (Sigma)

Agar bacteriológico. Altamente higroscópico. (Bloxon)

Ácido caproico 99-100% (pfs). (Sigma).

Ácido málico, sal cristalina 95-100%. (Sigma)

Almidón de papa, hidrolizado. (4501 Sigma)

Azul tripano. Cristales. (Sigma)

Citrato de amonio férrico. (Merck)

Clorhidrato de L-Cisteína. HCl Hidrato. (pfs). (Sigma)

Cloruro de magnesio. (J.T. Baker)

Cloruro de sodio, Q.P. (J.T. Baker)

Dextrosa anhidra, Reactivo analítico. Técnica Química)

Ditioeritrol (Merck)

EDTA Reactivo analítico. (Técnica Química)

Extracto de levadura. Altamente higroscópico. (Bloxon)

Fosfato de potasio monobásico, Reactivo analítico. (Técnica Química).

Fosfato de potasio dibásico, Reactivo analítico. (Técnica Química).

Glucosa 1 - fosfato. Sal cristalina. (Sigma)

Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, Cristalizada y liofilizada. (Sigma)

Hidróxido de sodio. (L. Laitz)

Metosulfato de fenazina (PMS) Cristales. (Sigma)

Mezcla vitamínica. (Micolab)

Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADP), Sal monosódica. (Sigma)

Nitro azul de tetrazolium. Cristalino, amarillo limón. (Sigma)

Peptona tripticasa. (Becton & Dickinson)

Suero bovino. (Micolab)

Trizma base, Cristalino aprox. 99,9% (Sigma)

Trizma HCl, Cristalino. (Sigma)

3.2.4. EQUIPO

Auto clave (presto)

Balanza analítica (Mettler AE-163)

Bomba de enfriamiento

Bomba de vacío manual

Celdas con cámara de enfriamiento

Centrifuga Sorval con refrigeración modelo RC-5

Congelador (Ultra low)

Filtro láminar (Veco)

Fuente de poder

Incubadora Medi-lab Marck No. 415

Microscópio de luz Invertida (Zeiss)

Microscópio óptico (Zeiss)

Nivel de gota

Potenciómetro Corning Modelo pH Meter

Refrigerador (Whirpool)

Reloj

Termómetro 0-100°C

3.2.5. PREPARACION DE REACTIVOS

3.2.5.1.- Cultivo axénico de Entamoeba histolytica.

Para el cultivo axénico de Entamoeba histolytica se utiliza el medio de cultivo TYI-S-33 constituido por los siguientes componentes:

Caldo nutritivo TY.

	<u>cantidades en gramos</u>
Peptona tripticasa	2,0
Extracto de levadura	1,0
Dextrosa	1,0
Cloruro de sodio	0,2

<i>Fosfato de potasio monobásico</i>	<i>0.06</i>
<i>Fosfato de potasio dibásico</i>	<i>0.1</i>
<i>Acido ascórbico</i>	<i>0.02</i>
<i>Clorhidrato de L-cisteína</i>	<i>0.1</i>
<i>Citrato de amonio férrico</i>	<i>0.00228</i>
<i>Agua destilada</i>	<i>82 ml</i>

PROCEDIMIENTO:

Disolver los reactivos en el orden en que se menciona con aproximadamente 50 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 6.8 - 6.9 con NaOH 0.1 M. y llevar a un volumen de 82 ml con agua bidestilada. Clarificar mediante filtración, a través de papel filtro Whatman # 1 y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min

Solución de vitaminas.

La solución de vitaminas se adquiere de las Laboratorios Microlab.

Suero bovino inactivado.

El suero se adquiere de los Laboratorios Microlab. Se descongela y se pone en baño maría durante 30 minutos a 56°C.

Preparación del medio de cultivo TYI-S-33.

Para cada 75 ml de caldo TY, se adiciona en condiciones estériles - 3 ml de mezcla vitamínica Microlab y 15 ml de suero bovino inactivado durante 30 min. a 56°C

Prueba de esterilidad.

Esta prueba de esterilidad se lleva a cabo para determinar la existencia de una posible contaminación por bacterias y fue incubar el medio TYI-S-33 durante 24 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se observa al microscopio con el fin de descartar una posible contaminación.

Inoculación de los trofozoitos al medio de cultivo TYI-S-33.

La cepa se cultiva en matraces de 125 ml durante 48 horas al finalizar este período colocar los matraces en baño de hielo durante 5 min para desprender las células de las paredes del matraz, pasar a tubos falcon de plástico estériles y centrifugar durante 10 min a 500 X g absorber el sobrenadante por medio de una bomba de vacío con una pipeta pasteur estéril, dejar el volumen necesario para inocular los tubos.

Número y viabilidad de los trofozoitos.

Contar el número de células mediante la cámara de Neubauer con el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{No.} \times A}{B} \times C$$

$$\frac{\text{No.} \times 10}{5} \times 1000 =$$

$$\text{No.} \times 2000$$

No. = Suma de los 5 cuadros

A = Factor para determinar el valor por mm (10).

B = Número de cuadrantes (5)

C = Factor para determinar el valor por ml (1000)

La viabilidad se determina por la exclusión de azul tripano al 0.04% en donde la avidez al colorante determina la viabilidad de las amibas.

3.2.5.2.- Preparación de los lisados (Mezcla estabilizadora)

Solución de ácido caproico 200 mM.

Tomar 1.16 ml de ácido caproico y diluir con 50 ml de agua destilada.

Solución de EDTA 200 mM.

Pesar 2,92 g de EDTA y diluir con 50 ml de agua destilada.

Solución de ditioeritrol 200 mM.

Pesar 1,54 g de ditioeritrol y diluir con 50 ml de agua destilada.

3.2.5.3.-Corrimiento electroforético.

Solución reguladora de Trizma 0.1 M. pH = 7.4

Pesar 12.4 g de Trizma base, 11.61 g de ácido málico, 2.03 g -- de $MgCl_2$, 3.72 g de EDTA y 12.8 ml de NaOH 10 N.

Disolver primeramente el Trizma, el ácido málico y el $MgCl_2$, mezclar después el EDTA y el NaOH, ajustar el pH a 7.4 y -- aforar a un litro con agua destilada.

Solución reguladora de fosfatos 0.01 M. pH = 7.0

Pesar 17.4 g de Na_2HPO_4 anhidro y 12.15 g de NaH_2PO_4 .

Disolver por separado, mezclar y ajustar el pH = 7.0, aforar a 1 litro con agua destilada.

Preparación de las placas de vidrio con gel de almidón de papa.

Pesar 8.0 g de almidón de papa SIGMA 4501, mezclar con 100 ml -- de solución reguladora de Trizma pH = 7.4.

La mezcla de almidón y la solución reguladora deberá formar una -- suspensión uniforme, calentar en un matraz Kitazato hasta hacerse -- espesa y luego menos viscosa, evitar que el almidón se pegue en el -- fondo del matraz por medio de una agitación rápida. Una vez que -- la viscosidad del almidón decae notoriamente desgasificar por me -- dio de vacío, vertir en la placa de vidrio en la que se va a formar la base del gel. Utilizar placas de vidrio de 15 X 25 cm tan pronto lle -- gue a temperatura ambiente insertar un peine en donde irán las -- muestras y queda listo para utilizarse.

PROCEDIMIENTO:

Utilizar en el corrimiento electroforético celdas con cámara de enfriamiento para mantener la temperatura a 8°C, colocar en éstas - las placas de vidrio.

Hacer las conexiones de las soluciones reguladoras por medio de - almohadillas gruesas de tela absorbente (Spontel) májadas con la misma solución, para lograr un buen contacto con la superficie del - gel, colocar otro vidrio grueso en los extremos de las almohadillas, Hacer el corrimiento durante 4 horas a 180 - 200 volts y 50 mA por placa.

3.2.5.4.-Desarrollo de la reacción.

Solución de Trizma-HCl 0.3 M. pH = 8.0

Pesar 0.3 g de Trizma-HCl, diluir con 100 ml de agua destilada, - ajustar pH = 8.0 con NaOH.

Cloruro de magnesio 1 M.

Pesar 20.32 g de cloruro de magnesio, diluir con 100 ml de agua - destilada.

NADP (1 mg / ml).

Pesar 100 mg de NADP y disolver en 10 ml de agua destilada.

Glucosa 1 - fosfato (12.5 mg/ml)

Pesar 312.5 mg y disolver en 25 ml de agua destilada.

Glucosa - 6 - fosfato deshidrogenasa (G6-PD) (100 UI/ml).

Adicionar 10 ml de agua destilada al frasco que contiene la enzima - (1000 UI/ml) } tomar de ese mismo 1 ml

Metosulfato de fenazina (PMS) (1 mg/ml.)

Pesar 10 mg de PMS y diluir en 10 ml de agua destilada.

Nitro azul de tetrazolium (MTT) (5 mg/ml).

Pesar 50 mg de MTT y diluir en 10 ml de agua destilada.

Todos los reactivos se mantuvieron en refrigeración a 4°C

Agar al 1 %.

Pesar 1 g de agar bacteriológico y diluir en 100 ml de agua destilada. Calentar la mezcla hasta punto de ebullición, guardar en tubos de ensaye, en porciones de 10 ml en cada tubo, conservar en refrigeración.

Para el desarrollo de la reacción utilizar la siguiente mezcla reactiva:

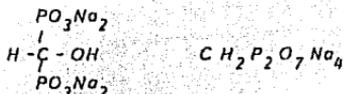
Trizma-HCl 0.3 M, pH = 8.0	7.0 ml
Cloruro de magnesio 1 M.	0.2 ml
NADP (1 mg/ml)	0.1 ml
Glucosa-1-fosfato (12.5 mg/ml)	1.0 ml
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)	0.1 ml
Metosulfato de fenazina (PMS) (1mg/ml)	1.0 ml
Nitro azul de tetrazolium (MTT) (5mg/ml)	1.0 ml
Agar al 1 %	10.0 ml.

3.3 METODOLOGIA

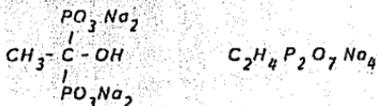
3.3.1. ANALOGOS DE PIROFOSFATO.

Los análogos de pirofosfato fueron facilitados por la gentileza del Dr. Benjamin Ortíz del Instituto de Química de la UNAM.

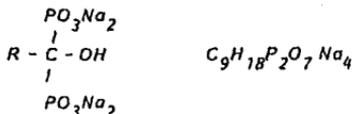
A) 1 hidroximetilen difosfonato tetrasódico.



B) Sal sódica (1 hidroxil etileno) bisfosfónico.



C) Hidroxinonano difosfonato tetrasódico



3.3.2. INVESTIGACION DEL NUMERO Y LA VIABILIDAD DE Entamoeba histolyti ca CULTIVADA EN PRESENCIA DE SEIS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TRES ANALOGOS DE PIROFOSFATO.

Los análogos de pirofosfato se preparan en una concentración inicial de -- 1 mg/ml, utilizar como diluyente el medio TY (10). De ellos se llevan a cabo diluciones partiendo de las soluciones iniciales (1mg/ml) hasta obtener -- las siguientes concentraciones de 1,0; 5,0; 10; 50; 250 y 500 g/ml. Utilizar -- como diluyente nuevamente el medio TY (10), esterilizar a través de filtro -- milipore 0,22 μm

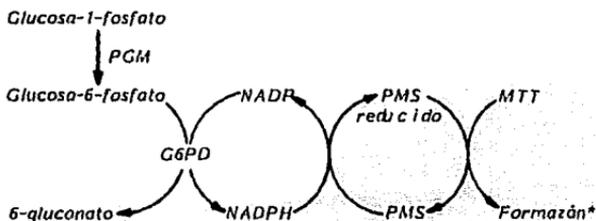
PROCEDIMIENTO:

Colocar por sextuplicado cada dilución en tubos de ensaye de 10 X 100 mm con tapón de rosca, completar su volumen a 6 ml con medio de cultivo TY -5-33. Inocular cada tubo 5×10^4 trofozoitos para cada tubo. Dejar incubar a 37°C durante 24, 48 y 72 horas. Después de las primeras 24 horas, dos tubos de cada concentración se centrifugan durante 10 min. a 500 x g a 4°C y su volumen se lleva a 1 ml en éste se determina el número y viabilidad de los trofozoitos de acuerdo al procedimiento que se describe en el inciso 3.2.5.1.

Los tubos con 48 y 72 horas se tratan de la misma forma antes mencionada, así como los seis controles correspondientes a los trofozoitos cultivados en ausencia de los análogos.

3.3.3. INVESTIGACION DE LA MODIFICACION EN EL PATRON ISOENZIMATICO DE FOSFOGLUCOMUTASA (E.C.2.7.5.1.) DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE SEIS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANALOGOS DE PIROFOSFATO Y SIN ELLOS.

La reacción propuesta es la siguiente:



* Compuesto colorido

Todos los tubos en donde se determina el número y viabilidad de los trofozoitos se centrifugan, deshechar el sobrenadante, del sedimento preparar los lisados adicionando una mezcla estabilizadora que se describe en el inciso 3.2.5.2. Dejar los lisados durante 24 horas a 0°C, centrifugarlos nuevamente a 3000 x g a 4 °C y determinar el corrimiento electroforético como se describe en el inciso 3.2.5.3, así como el desarrollo de la reacción en el inciso 3.2.5.4.

3.3.4. INVESTIGACION DEL NUMERO Y VIABILIDAD DE Entamoeba histolytica - CULTIVADA EN PRESENCIA DEL EXTRACTO CRUDO DE Zanthoxylum liebmanniarum.

3.3.4.1. EXTRACTO DE Zanthoxylum liebmanniarum.

De la corteza seca y molida hasta polvo del arbusto, utilizar las siguientes concentraciones: 1, 5, 10, 50, 250 y 500 g/ml Utilizar como diluyente el medio TY (10) y esterilizar a través de filtro millipore 0.22 μ m.

PROCEDIMIENTO:

Por sextuplicado utilizar las concentraciones antes mencionadas, en ellas adicionar 5×10^8 trofozoitos siguiendo la metodología que se indica en el inciso 3.3.2, de ésta sección.

3.3.4.2. METABOLITOS SECUNDARIOS DE Zanthoxylum liebmanniarum.

Los metabolitos secundarios de Zanthoxylum liebmanniarum se aislaron y codificaron en el Instituto de Química de la U.N.A.M., por el DR. Benjamín Ortiz y la Q.F.B. Rocío López Ulacia.

1.- 4-A 2.- E-IX 3.- C-IX 4.- M-4

5.- I VIII 6.- 8-E 7.- M-9 8.- M3'

9.- F-14 10.- M2P5.

De los compuestos 4-A y E-IX emplear dos concentraciones 25 y 62.5 g/ml De los compuestos C-IX; M-4; I VIII Y 8-E las dos diferentes concentraciones corresponden a 50 y 125 g/ml En rela -

ción a los compuestos M-9; M3' las concentraciones a utilizar son de 11 y 280 g/ml y finalmente los compuestos F-14 y M2P5 se emplean 250 y 675 g/ml. Diluir en el medio TY (10), esterilizar a través de filtro millipore 0.22 m.

PROCEDIMIENTO:

Por cuadruplicado cada dilución se coloca en tubos de ensaye de 10-X 100 mm se completa su volumen a 6 ml., se inocula cada tubo con 5×10^4 trofozoitos, dejar incubar durante 24 y 48 horas. Al finalizar estos períodos los tubos se centrifugan durante 10 minutos a 500 x g a 4 °C, su volumen se lleva a 1 ml en el que se determina el número y viabilidad de los trofozoitos de acuerdo al procedimiento que se describe en el inciso 3.2.5.1.

3.3.5. INVESTIGACION DE LA MODIFICACION AL PATRON ISOENZIMATICO DE FOSFOGLUCOMUTASA (E.C.2.7.5.1.) DE Entamoeba histolytica CULTIVADA EN SEIS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO CRUDO DE Zanthoxylum liebmanniarum Y SIN ELLAS.

PROCEDIMIENTO:

Después de cuantificar el número de los trofozoitos en forma como se describe en el inciso 3.3.2. Los tubos son centrifugados y del sedimento se preparan los lisados de forma igual a la que se describe en el inciso 3.3.2. La determinación del corrimiento electroforético se lleva a cabo en la forma en que se describe en el inciso 3.2.5.3. y 3.2.5.4.

3.3.6. INVESTIGACION DE LA MODIFICACION AL PATRON ISOENZIMATICO DE FOSFOGLUCOMUTASA (E.C. 2.7.5.1.) DE Entamoeba histolytica CULTIVADA EN DOS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LOS 10 METABOLITOS AISLADOS DE Zanthoxylum liebmanniarum.

PROCEDIMIENTO:

Después de cuantificar en forma como se describe en el inciso 3.3.2. los tu-

Los lisados se preparan en forma igual a la que se describe en el inciso 3.3.2.

3.4 ANALISIS ESTADISTICO.

Los resultados se evalúan mediante estadística descriptiva (11) de ella se considera la media así como la desviación estandar, se utiliza el análisis de varianza para determinar deficiencias cuando el valor de la probabilidad es menor o igual a 0.05.

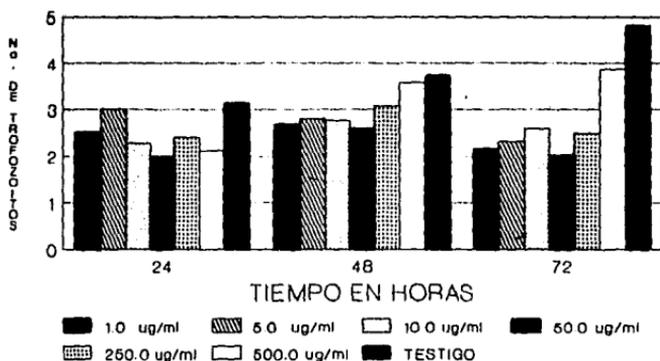
CAPITULO IV

4.1 RESULTADOS

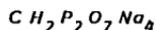
El número de trofozoitos viables después de cultivarse en presencia de diferentes concentraciones con el análogo de pirofosfato inhibidor 1 se presenta en la Figura 1.

FIGURA 1

SOBREVIVENCIA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA CON EL INHIBIDOR 1.



Inhibidor 1.- 1 hidroximetilen difosfonato tetrasódico.

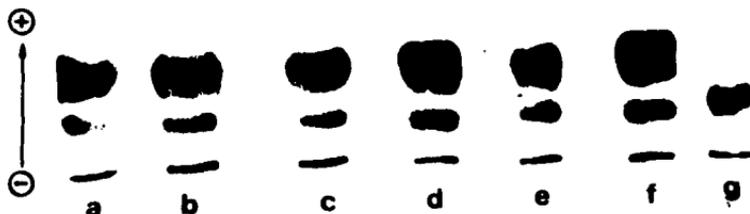


Estos resultados corresponden al valor de la media de los valores obtenidos en experimentos realizados por duplicado. El análisis estadístico de ellos mostró, que no hubo diferencias significativas después del cultivo de 24 y 48 horas. No así a las 72 horas y en forma más importante al compararlos con el testigo pues dio un valor de $p < 0.001$.

El patrón electroforético de los trofozoitos cultivados con el análogo de pirofosfato 1 en las diferentes concentraciones después de 24 horas se presenta en la Figura 2.

FIGURA 2

CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL INHIBIDOR 1 DESPUES DE 24 HORAS.



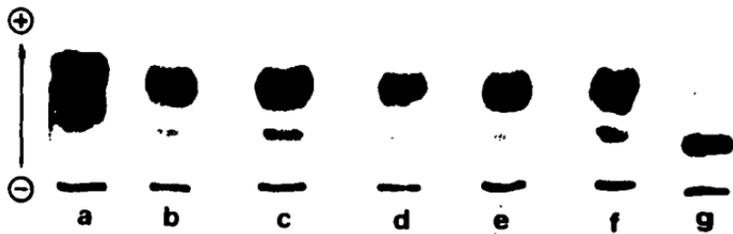
Entamoeba histolytica cultivada con a.- 1.0; b.- 5.0; c.- 10 d.- 50; e.- 250; f.-500 g/ml y g.- control después de 24 horas. La reacción se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazil y nitro azul de tetrazolium.

En ella se observaron el desarrollo de una doble banda. Esta modificación electroforética se manifestó sin presentar relación con la concentración del análogo.

La Figura 3 presenta los resultados obtenidos cuando se cultivaron los trofozoitos con el mismo análogo después de 48 horas; en donde se observo nuevamente esta alteración electroforética sin observarse relación con la concentración utilizada, aún después del cultivo de 72 horas. Haciéndose notar la diferencia con los trofozoitos cultivados en ausencia del inhibidor en donde no se presento esta alteración.

FIGURA 3

CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL INHIBIDOR 1 DESPUÉS DE 48 HRS.

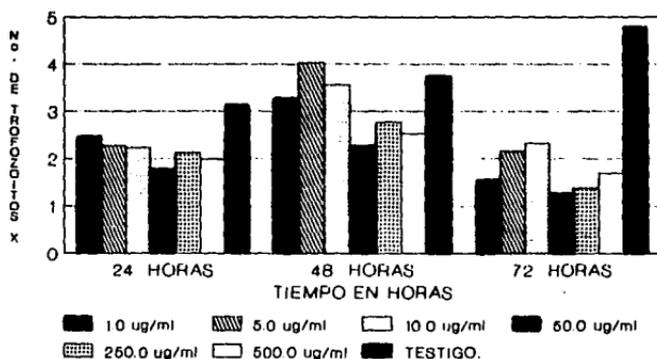


Entamoeba histolytica en presencia de a.- 1.0; b.- 5.0; c.- 10; --- d.- 50; e.- 250; f.- 500 g/ml g.- control después de 48 horas. La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

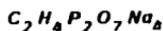
Los resultados al utilizar el análogo de pirofosfato inhibitor II se muestra en la Figura 4.

FIGURA 4

**SOBREVIVENCIA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA
CON EL INHIBIDOR II.**



**Inhibidor II.- Sal sódica (1 hidroxil etileno)
bisfosfonico.**

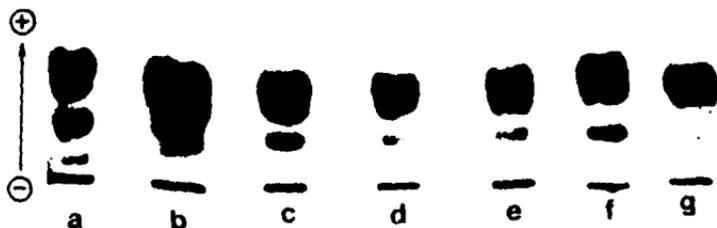


En ella nuevamente observamos el nivel de sobrevivencia después de 72 horas de cultivo. En el que el número de trofozoitos fue menor en relación a la concentración utilizada, pero sobre todo con respecto al testigo donde el valor fue de $p < 0.001$.

El patrón isoenzimático desarrollado por la fosfoglucomutasa de los trofozoitos-cultivados 24 horas en presencia del inhibidor II se presenta en la Figura 5.

FIGURA 5

CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL INHIBIDOR II DESPUES DE 24 HRS.



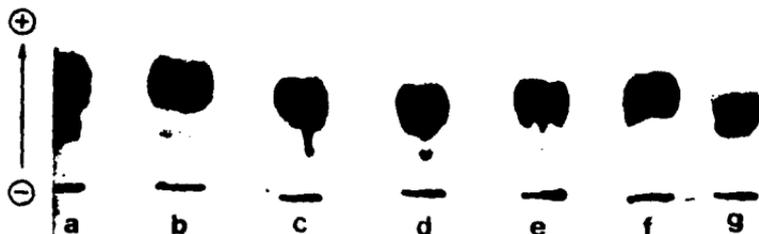
Entamoeba histolytica en presencia de a.- 1,0; b.- 5,0; c.- 10; --- d.- 50; e.- 250; f.- 500 g/ml y g.- control. después de 24 Hrs. La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

En donde se revela el desarrollo de isoenzimas dependientes de la concentración utilizada.

Sin embargo después del cultivo de 48 y 72 horas éstas alteraciones se hicieron -- menos visibles y no hubo relación con la concentración como se muestra en la Figura 6 a las 48 horas y en la Figura 7 después de 72 horas de cultivo como en el caso anterior los testigos dieron una banda.

FIGURA 6

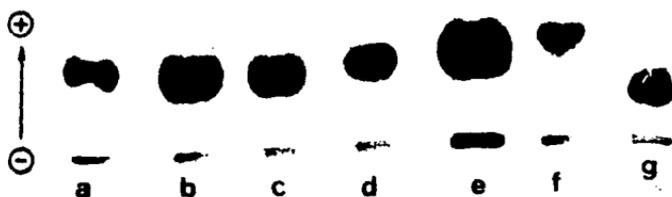
CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL INHIBIDOR II A LAS 48 HORAS.



Entamoeba histolytica en presencia de a.- 1.0; b.- 5.0; c.- 10; --- d.- 50; e.- 250; f.- 500 g/ml y g.- control. después de 48 Hrs. La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

FIGURA 7

CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL INHIBIDOR II DESPUES DE 72 HRS.

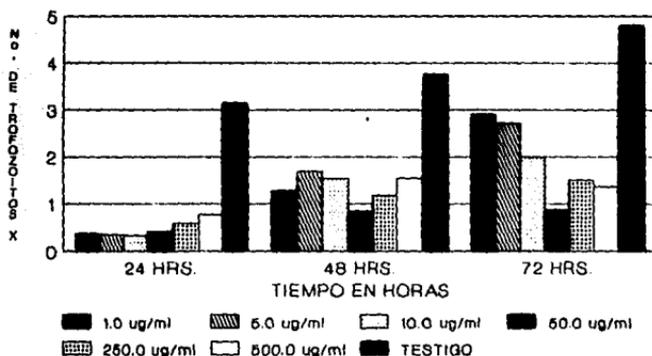


Entamoeba histolytica en presencia de a.- 1.0; b.- 5.0; c.- 10; ---
d.- 50; e.-250; f.- 500 g/ml y g.- control. después de 72 Hrs.
La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

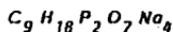
Por el contrario el efecto de sobrevivencia más importante se observó con el análogo de pirofosfato inhibidor III a las 24 horas. Sin embargo lo observado en este tiempo de incubación fue temporal pues después de 48 y 72 horas de cultivo, el número de trofozoitos viables se incrementó en forma proporcional a la concentración utilizada del inhibidor como se muestra en la Figura 8.

FIGURA 8

**SOBREVIVENCIA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA
CON EL INHIBIDOR III.**



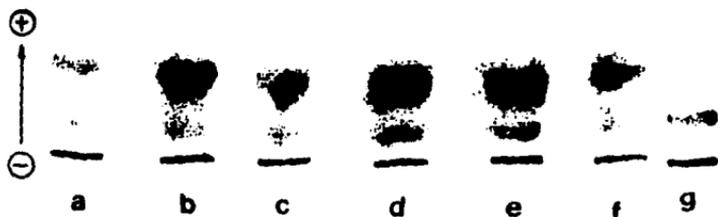
Inhibidor III.- hidroxil nonano difosfonato
tetrasódico.



Finalmente al incubar los trofozoitos con el inhibidor III despues de 24 horas se -
presentó el mismo fenómeno electroforético sin relación con la concentración utiliza-
da como se observa en la Figura 9.

FIGURA 9

**CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA
DE Entamoeba histolytica CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFEREN-
TES CONCENTRACIONES DEL INHIBIDOR III DESPUES DE 24 HRS.**

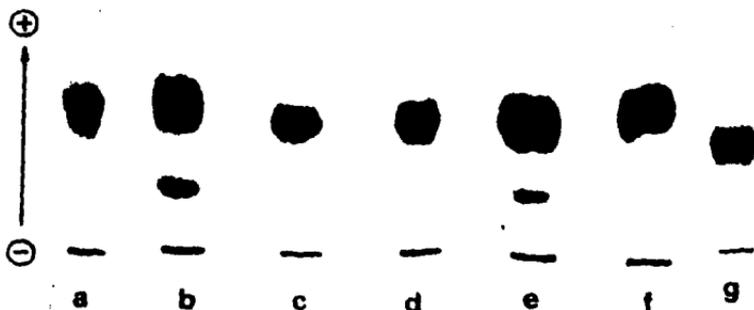


Entamoeba histolytica en presencia de a.- 1,0; b.- 5,0; c.- 10; ---
d.- 50; e.- 250; f.- 500 g/ml g.- control. despúes de 24 Hrs.
La reacción enzimática se manifestó despúes de la electroforesis-
con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

No así después del cultivo de 48 horas Figura 10 y 72 horas Figura 11 en donde este efecto tendió a desaparecer como se presenta en la Figura 10.

FIGURA 10

CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL INHIBIDOR III DESPUES DE 48 HRS.



Entamoeba histolytica en presencia de a.- 1,0; b.- 5,0; c.- 10; --- d.- 50; e.- 250; f.- 500 g/ml g.- control, después de 48 Hrs. La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

FIGURA 11

**CORRIENTO ELECTROFORETICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA
DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFEREN
TES CONCENTRACIONES DEL INHIBIDOR III DESPUES DE 72 HRS.**

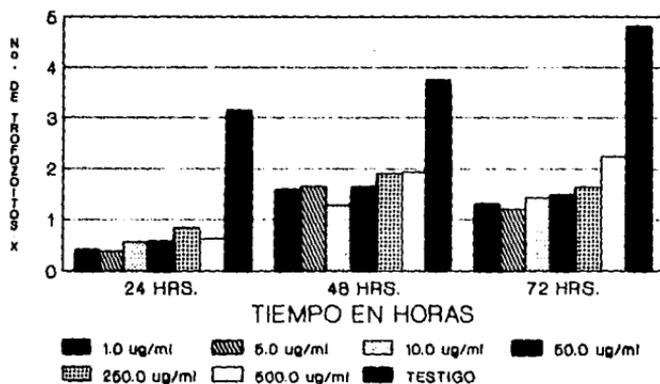


Entamoeba histolytica en presencia de a.- 1,0; b.- 5,0; c.- 10; ---
d.- 50; e.- 250; f.- 500 g/ml g.- control, después de 72 Hrs.
La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis-
con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

El efecto de sobrevivencia de Zanthoxylum liebmanniarum en forma de extracto utilizado en las concentraciones ya mencionadas sobre los trofozoitos de Entamoeba histolytica se manifestó disminuyendo su número como se muestra en la Figura 12.

FIGURA 12

SOBREVIVENCIA DE Entamoeba histolytica CULTIVADA EN PRESENCIA DEL EXTRACTO DE Zanthoxylum liebmanniarum.



En ella observamos que el período de 24 horas fue el más importante sin relación con la concentración tendiendo a desaparecer después de 48 y 72 horas mostrándose una diferencia estadísticamente significativa en los tres períodos con respecto a los cultivos testigo $p < 0,001$.

El patrón electroforético de la fosfoglucomutasa de Entamoeba histolytica desarrollado al utilizar diferentes concentraciones del extracto de Zanthoxylum liebmaniarum mostró el desarrollo de isoenzimas dependiente del tiempo de incubación.

Este efecto se manifestó en forma determinante después de 24 horas de cultivo — en donde se presentan dos bandas mientras que a las 48 horas solo aparece una banda — como se presenta en la Figura 13, para este último período.

FIGURA 13

CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE Entamoeba histolytica CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO DE Zanthoxylum liebmaniarum DESPUES DE 48 HORAS.

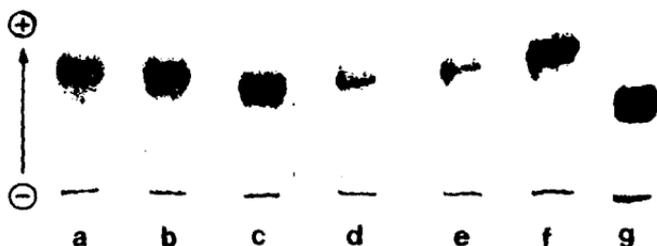


Entamoeba histolytica en presencia de a.- 1.0; b.- 5.0; c.- 10; --- d.- 50; e.- 250; f.-500 g/ml g.- control. después de 48 Hrs.
La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

De igual manera la Figura 14 muestra los resultados obtenidos a las 72 horas, en donde se observó un desplazamiento mayor de la segunda banda, dado que el tiempo de todos los corrimientos se realizaron en forma semejante.

FIGURA 14

CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO DE *Zanthoxylum liebmannium* DESPUES DE 72 HORAS.



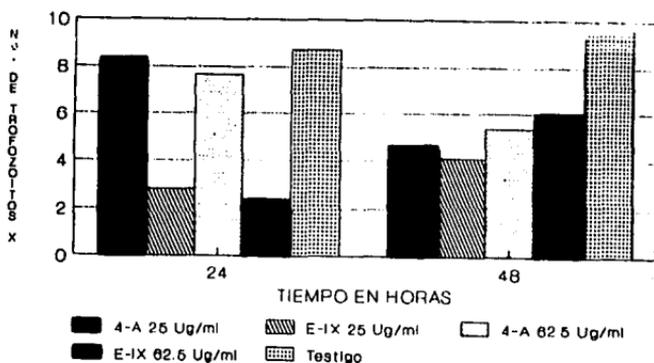
Entamoeba histolytica en presencia de a.- 1.0; b.- 5.0; c.- 10; --- d.- 50; e.- 250; f.- 500 g/ml g.- control. después de 72 Hrs. La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

Cuando se utilizaron los metabolitos 4-A y E-IX aislados de Zanthoxylum liebmanniarum después de 24 horas de cultivo. El efecto de sobrevivencia más importante lo desarrolló E-IX en las dos concentraciones comparativamente con el testigo. No así -- después de 48 horas en el que los trofozoitos viables incrementaron su número.

Aunque estos no llegaron a ser comparables con el testigo, pues sus valores fueron diferentes desde el punto de vista estadístico con una $p < 0.001$, como se muestra en la Figura 15.

FIGURA 15

SOBREVIVENCIA DE Entamoeba histolytica CULTIVADA EN PRESENCIA DE LOS METABOLITOS 4-A Y E-IX.

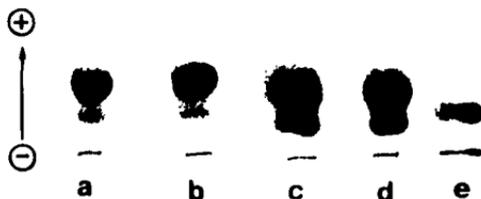


4-A Y E-IX.- Metabolitos aislados de Zanthoxylum liebmanniarum.

La electroforesis desarrollada por la fosfoglucomutasa de los trofozoitos cultivadas con los compuestos 4-A y E-IX después de 24 horas mostró nuevamente la presencia de isoenzimas en donde el metabolito 4-A no presentó relación con la concentración utilizada ni el tiempo de cultivo puesto que la imagen fue la misma, esto se presenta en la Figura 16.

FIGURA 16

CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL METABOLITO 4-A AISLADO DE *Zanthoxylum liebmannerum* DESPUES DE 24 HORAS.

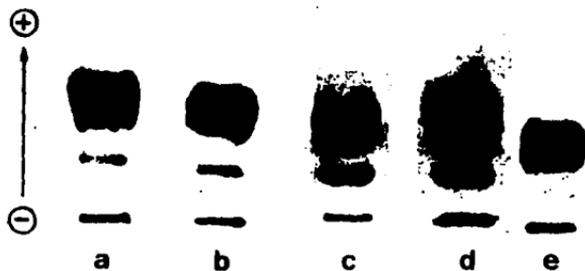


Entamoeba histolytica en presencia de a.- 25; b.- 25; c.- 62.5; --- d.- 62.5 g/ml e.- control, después de 24 Hrs. La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

Na así el metabolito E-IX en el que la banda electroforética superior pareció tener un grosor mayor a las 24 horas y se incrementó después de 48 horas de cultivo como se presenta en las Figuras 17 y 18.

FIGURA 17

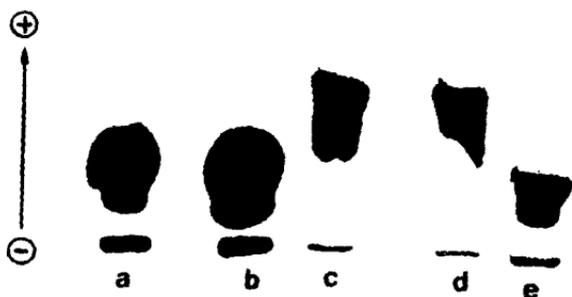
CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL METABOLITO E-IX AISLADO DE *Zanthoxylum liebmanniarum* DESPUES DE 24 HORAS.



Entamoeba histolytica en presencia de a.- 25; b.- 25; c.- 62.5; d.- 62.5 g/ml e.- control, después de 24 horas. La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

FIGURA 18

CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL METABOLITO E-IX AISLADO DE *Zanthoxylum liebmanniarum* DESPUES DE 48 HORAS.

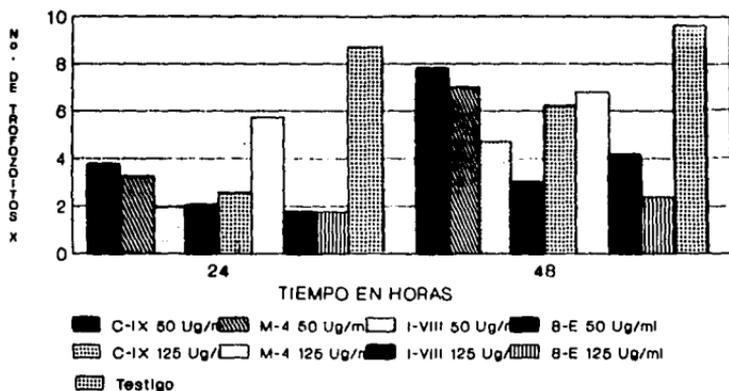


Entamoeba histolytica en presencia de a.- 25; b.- 25; c.- 62.5; d.- 62.5 g/ml e.- control, después de 48 horas. La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

Al adicionar los metabolitos C-IX; M-4; I VIII y 8-E, a cultivos de trofozoitos -- mostraron que despues de 24 horas el compuesto M-4 se comporfo en forma diferente a los demas, con el se desarrolló un efecto de sobrevivencia menos importante. Sin -- embargo despues de 48 horas de cultivo los trofozoitos viables cultivados con los meta- bolitos restantes crecieron, aunque en forma muy diferente y particular para cada -- compuesto. Como se observa en la Figura 19.

FIGURA 19

SOBREVIVENCIA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE LOS METABOLITOS C-IX; M-4; I VIII Y 8-E.

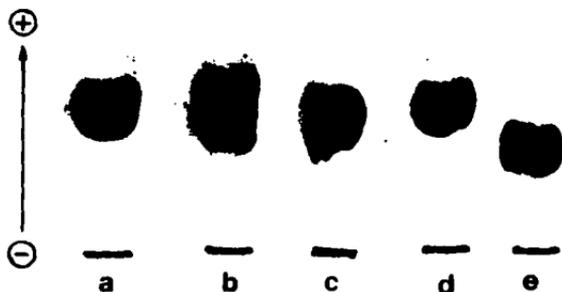


C-IX; M-4; I VIII Y 8-E.- Metabolitos aislados de Zanthoxylum liebmanniarum.

Al adicionar los compuestos C-IX; M-4; I VIII y 8-E, el primer compuesto desarrolló isoenzimas después de 24 horas de cultivo, pero después de 48 horas la banda inferior tendió a desaparecer haciéndose más gruesa la banda superior. Como se observa en la Figura 20.

FIGURA 20

CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL METABOLITO C-IX AISLADO DE *Zoanthylum liebmanniarum* DESPUES DE 48 HORAS.

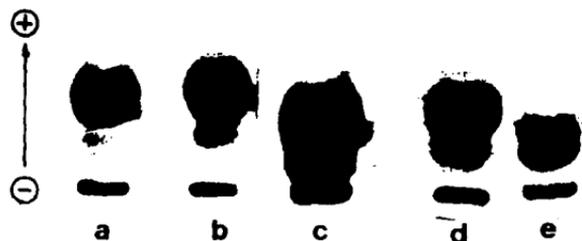


Entamoeba histolytica en presencia de a.- 50; b.- 50; c.- 125; d.- 125 g/ml e.- control, después de 48 horas. La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

El comportamiento de la fosfoglucomutasa en trofozoitos cultivados con los tres compuestos restantes M-4; I VIII Y 8-E fue muy semejante. Sin embargo a las 48 horas en algunos de los casos permanecieron como se presenta en las Figuras 21 y 22.

FIGURA 21

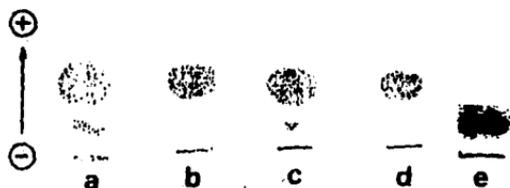
CORRIENTO ELECTROFORETICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE Entamoeba histolytica CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL METABOLITO I VIII AISLADO DE Zonitoxylum liebmannerum DESPUES DE 48 HORAS.



Entamoeba histolytica en presencia de a.- 50; b.- 50; c.- 125; --- d.- 125 g/ml e.- control. después de 48 horas. La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

FIGURA 22

CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL METABOLITO 8-E AISLADO DE *Zanthoxylum liebmanniarum* DESPUES DE 48 HORAS.

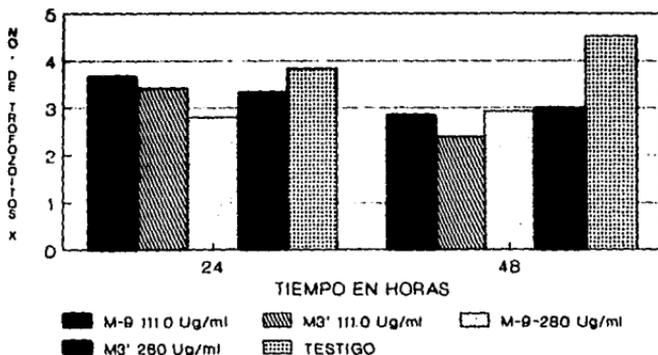


Entamoeba histolytica en presencia de a.- 50; b.- 50; c.- 125; ---- d.- 125 g/ml e.- control. después de 48 horas. La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

Cuando los trofozoitos fueron cultivados 24 horas con los compuestos M-9 y M3' - a pesar de que sus concentraciones fueron de las más altas. Estas tuvieron igual significado en el número de trofozoitos, como se muestra en la Figura 23 manteniéndose este efecto después de 48 horas. Aunque si lo hicieron al compararse con el número de trofozoitos testigo $p < 0.001$.

FIGURA 23

SOBREVIVENCIA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE LOS METABOLITOS M-9 y M3'.

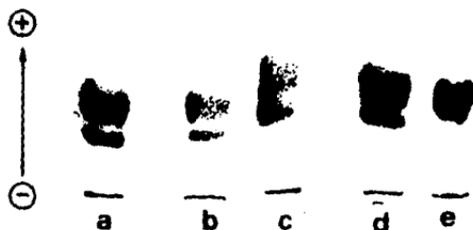


M-9 y M3'.- Metabolitos aislados de *Zanthoxylum liebmannianum*.

El cultivo de los trofozoitos con los compuestos M-9 y M3' después de 24 horas desarrollaron igualmente en la fosfoglucomutasa isoenzimas. Aunque en forma diferente pues las dos bandas electroforéticas se encontraron muy juntas haciéndose la diferencia por la distancia de los desplazamientos en donde fueron mayores con el compuesto M-9 sin observarse diferencias en la concentración utilizada y en el tiempo de incubación después de 48 horas de cultivo, esto se presenta en la Figura 24 y 25.

FIGURA 24

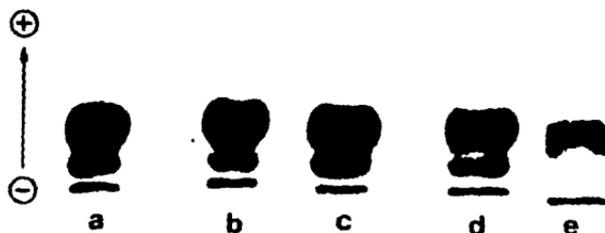
CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL METABOLITO M-9 AISLADO DE *Zanthoxylum liebmannerum* DESPUES DE 24 HORAS.



Entamoeba histolytica en presencia de a.- 111; b.- 111; c.- 280; d.- 280 g/ml e.- control, después de 24 horas. La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

FIGURA 25

CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE Entamoeba histolytica CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL METABOLITO M3⁺ AISLADO DE Zanthoxylum liebmanniarum DESPUES DE 24 HORAS.

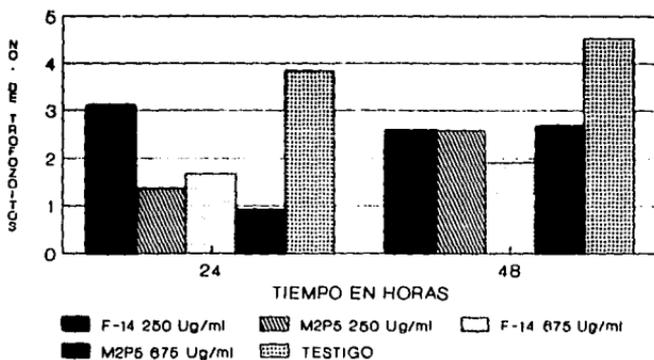


Entamoeba histolytica en presencia de a.- 111; b.- 111; c.- 280; --- d.- 280 g/ml e.- control. después de 24 horas. La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

No así los compuestos F-14 y M2P5 en donde el segundo compuesto desarrolló un efecto de sobrevivencia menos visible dependiendo de la concentración utilizada. Sin embargo, los trofozoitos viables después de cultivarlos 48 horas el efecto de sobrevivencia tuvo poca importancia y sólo mostró diferencias con respecto a los valores encontrados para el testigo como se observa en la Figura 26.

FIGURA 26

SOBREVIVENCIA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE LOS METABOLITOS F-14 Y M2P5

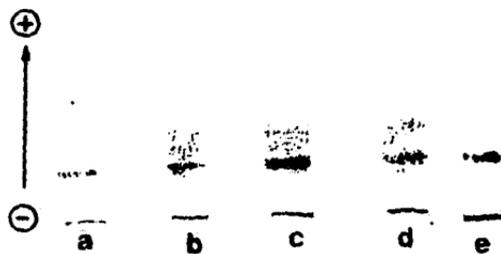


F-14 y M2P5.- Metabolitos aislados de Zanthoxylum liebmanniarum.

Finalmente el cultivo de los trofozoitos con los compuestos F-14 y M2P5 a las 24 horas desarrolló en la fosfoglucomutasa isoenzimas con la banda superior muy tenue con el primer compuesto pero a las 48 horas se hizo más visible y gruesa, esto se observa en las Figuras 27 y 28.

FIGURA 27

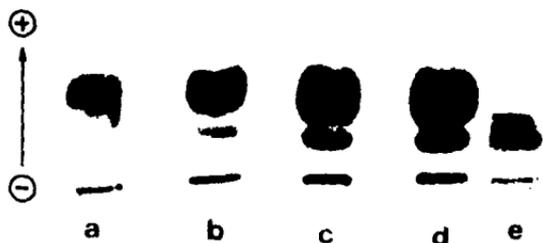
CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL METABOLITO F-14 AISLADO DE *Zanthoxylum liebmanniarum* DESPUES DE 24 HORAS.



Entamoeba histolytica en presencia de a.- 250; b.- 250; c.- 675; --- d.- 675 g/ml e.- control, después de 24 horas. La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

FIGURA 28

CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL METABOLITO F-14 AISLADO DE *Zanthoxylum liebmanniarum* DESPUES DE 48 HORAS.

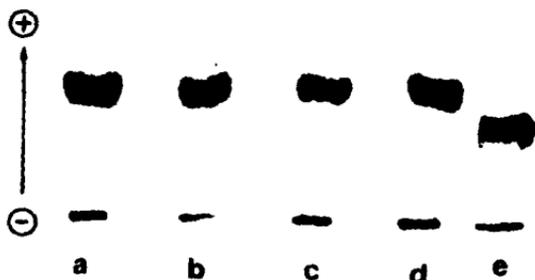


Entamoeba histolytica en presencia de a.- 250; b.- 250; c.- 675; -- d.- 775 g/ml e.- control. después de 48 horas. La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitro azul de tetrazolium.

Con el compuesto M2P5 el desarrollo de isoenzimas fue muy irregular a las 24 horas no hubo relación con la concentración utilizada ni con el tiempo de incubación como se muestra en la Figura 29.

FIGURA 29

CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL METABOLITO M2P5 AISLADO DE *Zanthoxylum fiebmanniarum* DESPUES DE 24 HORAS.



Entamoeba histolytica en presencia de a.- 250; b.- 250; c.- 675; --- d.- 675 g/ml e.- control. después de 24 horas. La reacción enzimática se manifestó después de la electroforesis con sulfato de fenazina y nitró azul de tetrazolium.

4.2 DISCUSION

El efecto letal de los metabolitos aislados de Zanthoxylum liebmannii sobre los trofozoitos de Entamoeba histolytica, sugiere que son compuestos potencialmente amebicidas. Correlacionandose este efecto con la modificación electroforética — de una enzima de la vía glicolítica específicamente de la Fosfoglucomutasa, siendo esta una de las primeras manifestaciones de los compuestos así como el efecto que produce la inhibición enzimática de la Fosfofructacinasa dependiente de Pirofosfato (12) con análogos de este compuesto.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el principio activo, de los tres inhibidores, mostró tener relación directa con su constitución química. En donde el efecto menos importante se observó con los análogos de Pirofosfato I y II a las 24 horas de cultivo y sólo hasta después de 72 horas se presentaron diferencias en su crecimiento comparativamente con el testigo.

Esto podría explicarse como una consecuencia de los recursos metabólicos del -- protozoario tan extraordinarios, pues cuenta con una enzima capaz de fosforilar a la Fructosa 6 (P) utilizando ATP y continuar la vía glicolítica (35,36).

Por otro lado el desarrollo de isoenzimas en la Fosfoglucomutasa se justifica infiriendo que la inhibición causada por los análogos de Pirofosfato, trajo como consecuencia que la fosforilación de la Fructosa 6 (P) no se llevara a cabo y por esta razón se acumulara favoreciendo la reacción reversible.

En estas condiciones la Fosfofructoisomerasa hizo posible que la Fructosa 6 (P) — acumulada se convirtiera a Glucosa 6 (P) y la Fosfoglucomutasa en forma de isoenzimas la transformara a Glucosa 1 (P) como sucede en otros casos (1).

Estas suposiciones se apoyan, en los resultados experimentales obtenidos, pues la presencia de isoenzimas en la Fosfoglucomutasa fue clara revelando consistencia en este efecto donde el número de isoenzimas desarrolladas con los análogos I y II fue muy importante.

A pesar de ello, lo sorprendente fue, que el efecto se minimizó y llegó a desaparecer después de 48 y 72 horas. a) Los análogos de Pirofosfato se biotransforman y ya no actuaron. b) El aumento en la síntesis de Pirofosfato por los cual la inhibición competitiva ya no se da. De donde inferimos que los trofozoitos recuperaron su vía metabólica habitual al utilizar Pirofosfato en lugar de análogos y así fosforilar la Fructosa 6 (P) con la Fosfofructocinasa dependiente de Pirofosfato. Esto puede explicarse de tres maneras: a) Los análogos de Pirofosfato fueron biotransformados (por los sistemas metabólicos de la amiba) a metabolitos que no presentan inhibición. b) El aumento de la síntesis de Pirofosfato en la amiba podrá disminuir la inhibición competitiva de los análogos estudiados. c) Dado que se presentaron isoenzimas de la Fosfoglucomutasa dependiente de Pirofosfato que son menos sensibles a los compuestos por lo cual el efecto letal fue menos marcado. De tal manera que el tiempo de incubación y las condiciones de cultivo fue determinante en los resultados obtenidos.

Por otro lado el efecto letal más importante lo encontramos con el inhibidor III, a las 24 horas de cultivo. Sin embargo, este disminuyó a las 48 y 72 horas. La interpretación de estos resultados fue que la inhibición de la enzima por el análogo provocó daños más drásticos aun en concentraciones pequeñas que no pudieron ser compensadas por la amiba dando el efecto letal más tempranamente.

A pesar de ello después de este período suponemos que el análogo se agotó o fue metabolizado por esta razón después de 48 y 72 horas ya no hubo efecto. Al comparar el efecto letal del extracto completo de Zanthoxylum liebmanniarum con el análogo de Pirofosfato III, observamos cierta similitud, pues en ambos se observó a las 24 horas y la concentración utilizada no fue relevante.

Esta igualdad de comportamiento parece interesante pues se trata de un extracto crudo, que produce una modificación similar en el corrimiento electroforético de la enzima y la única diferencia fue que esta alteración permaneció durante más tiempo, tendiendo a desaparecer a las 72 horas, observándose sólo una banda como en los tests. Por lo que inferimos que los cambios producidos en la enzima desaparecieron al agotarse el extracto.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. La fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato de Entamoeba histolytica cepa HM1- — IMSS fue inhibida por tres análogos de pirofosfato I) Hidroximetilen difosfonato tetrasódico. II) Sal sódica del ácido (1-hidroxi-etilideno) bisfosfónico. III) Hidroxinonano difosfonato tetrasódico.
2. Se observaron diferentes niveles de letalidad con los tres análogos de Pirofosfato predominando con el análogo de pirofosfato III) Hidroxinonano difosfonato tetrasódico.
3. El efecto letal de los compuestos sobre los trofozoitos de Entamoeba histolytica disminuyó después de 48 y 72 horas de cultivo.
4. La presencia de isoenzimas de la Fosfoglucomutasa en los trofozoitos viables fue indicativo del efecto letal producido por los análogos de Pirofosfato.
5. Se observó un efecto letal semejante con el análogo III) Hidroxinonano difosfonato tetrasódico y el compuesto crudo de Zanthoxylum liebmanniarum desarrollándose igualmente isoenzimas.
6. Se probaron cuatro grupos de compuestos aislados de Zanthoxylum liebmanniarum con diferentes concentraciones. Dentro del primer metabolito E-IX tuvo el efecto letal más importante con el desarrollo de isoenzimas y el compuesto 4-A igualmente lo presentó pero en forma más tardía a las 48 horas.
7. El segundo grupo de compuestos aislados de Zanthoxylum liebmanniarum utilizando con concentraciones de las más altas no tuvieron efecto letal importante pero sí el desarrollo de isoenzimas de la Fosfoglucomutasa.
8. El tercer grupo formado por los compuestos M-9 y M3' a pesar de utilizar concentraciones de las más altas no tuvieron efecto letal importante pero sí el desarrollo de isoenzimas de la Fosfoglucomutasa.

9. Finalmente el cuarto grupo constituido por los compuestos F-14 y M2P5 tuvieron un efecto letal importante a las 24 horas con el desarrollo de isoenzimas de la Fosfoglucomutasa que desaparecieron después de 48 horas.

10. Probablemente el efecto letal de estos compuestos se inició con alteraciones metabólicas que traen como consecuencia el desarrollo de isoenzimas.

11. De tal manera que se propone que el patrón electroforético de la Fosfoglucomutasa podría ser indicativo de alteraciones metabólicas antes de que se produzca un efecto letal en los trofozoitos de Entamoeba histolytica.

BIBLIOGRAFIA

1. Agrawal, A., C.V. Pandery. and P. Sagar. Acid phosphomonoesterase heterogeneity in axenically grown *Entamoeba histolytica*. Ann. Trop. Med. Parasitolog. **81**: 459-61, 1987.
2. Allsopp, J.E., A. Mindel., P. Sargeant and P. Williams. *Entamoeba histolytica* as a common intestinal parasite in homosexual men. N. Engl. J. Med. **315**: 353-356, 1986.
3. Amador, F., E. Jimenez. y J. Kumate. Correlación clínica del zimodemo de *Entamoeba histolytica* en pacientes de un hospital psiquiátrico. Arch. Invest. Med. (Mex). **331** (1) --- 331-334, 1986.
4. Andrews, B.J., L. Mentzoni. and B. Bjorvatn. Zymodeme conversion of isolates of *Entamoeba histolytica*. Trans. Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg. **84**: 63-65, 1990.
5. Biagi, F., ENFERMEDADES PARASITARIAS. La prensa médica mexicana S.A. 2a. Edición. 81-124. México 1982.
6. Blanc, R.N. and P. Sargeant. Experimental production of new zymodemes of *Entamoeba histolytica* supports the hypothesis of genetic exchange. Trans. Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg. **83**: 787-790, 1989.
7. Bracha, R., A. Choyen., R. Rusenberg., L. Warren and D. Mirelman. Isolation and partial characterization of the hexokinase isoenzymes from pathogenic and non-pathogenic strains of *Entamoeba histolytica*. Mol. and Biochem. Parasitol. **25**: 203-212, 1987.
8. Cheng, X.J. and M. Huang. Effect of hamster liver passage of the isoenzymes of *Entamoeba histolytica*. XI seminario sobre amibiasis. Libro de resúmenes. México D.F. Nov. del 15 al 17. 115, 1989.
9. Cheng, X.J. and M. Huang. Preliminary studies on isoenzyme of *Entamoeba histolytica*. XI seminario sobre amibiasis. Libro de resúmenes. México D.F. Nov. del 15 al 17. 114, 1989.
10. Diamond, S.L., D. Harlow and C. Cunnick. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans. Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg. **72** (4): 431-432, 1978
11. Domenech, I. and J.M. Massons. BIOESTADÍSTICA: METODOS ESTADÍSTICOS PARA INVESTIGADORES. Editorial Herder. Barcelona, España, 1982.

12. Eubank, W. and R. Reeves. Analag inhibitors for the pyrophosphate-dependent phospho-fructokinase of *Entamoeba histolytica* and their effect on culture growth. Journal of Parasitology. **68** (4): 599-602. 1982.
13. Faust, C.E., P. Russell and R. Jung. PARASITOLOGIA CLINICA. Editorial Salvat. 8a. -- edición. Barcelona, España. 1984.
14. Ghandirian, E., S.D. Somerfield and P.A. Kingshavn. Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to oxidants. Infection and Immunity. **51**: 263-267. 1986.
15. Gutierrez, G. Epidemiología de la amibiasis en México. Boletín mensual: Secta Salud. -- **1** (4): abril. 1986.
16. Jackson, F.T., P. Sargeant., J. Williams and A. Simjee. Observations on zymodeme studies of *Entamoeba histolytica* in Durban, South Africa. Arch. Invest. Med. (Mex), **13** (3): 83-87. 1982.
17. Jackson, F.T., V. Gathiram, S. Suparsad, and C.A. Anderson. Stability of the zymodemes of *Entamoeba histolytica* in culture. Archives of the Medical Research. **23** (2): 71. 1992.
18. Jiménez C.E. and J. Kumate. Correlación clínica de zimodemos de *Entamoeba histolytica*. Archivo de Investigación Médica. (México) **13** (3): 77-81. 1982.
19. Katiyar, S.K., A.K. Prasad., S.Ghoshal., S. Das and P.Sagar. Cholesterol induce changes in glucose-6-phosphate generating enzymes, Concavalin A agglutinability and haemolytic activity of axenic *Entamoeba histolytica*. Ann. Trop. Med. Parasitol. **163**: 201-205. -- 1987.
20. Krastad, D.J. Isoenzyme patterns and pathogenicity in amebic infection. Isr. J. Med. -- Sci. **22**: 918-920. 1986.
21. Löh F.V. Massenhafte Entwicke lung Von Amöben in Dickdarm. Vir chow's Archiv. F., Path Anat. **65**: 195. 1985.
22. Martínez P.A. AMIBIASIS. Editorial Médica Panamericana. México D.F. 1989.
23. Mathews, H.M., D.Healy and D. Mildvan. Isoenzyme analysis of *Entamoeba histolytica* -- isolated from homosexual men. The Journal of infectious Diseases. **153** (4): 142-148. -- 1986.

ESTA TESTIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

24. Mirelman, D., R. Bracha and A. Chayen. *Entamoeba histolytica: Effect of growth conditions and bacterial associates in isoenzyme patterns and virulence.* Experimental Parasitology, 62: 142-148, 1986.
25. Mirelman, D., R. Bracha, A. Wextler and A. Chayen. *Alteration of isoenzyme patterns of a cloned culture of non-pathogenic Entamoeba histolytica upon change in growth conditions.* Archivo de Investigación Médica (México), 17: 187-192, 1986.
26. Mirelman, D., R. Bracha, A. Wextler and A. Chayen. *Changes in isoenzyme patterns of a cloned culture of nonpathogenic Entamoeba histolytica during axenization.* Infection and Immunity, 50 (3): 827-832, 1986.
27. Moss, D.M. and H.M. Mathews. *A fast electrophoretic isoenzyme technique for the identification of invasive and non-invasive Entamoeba histolytica and Entamoeba histolytica like organisms.* J. Protozoology, 30 (3): 253-255, 1987.
28. Mukherjee, R.M., K.C. Bhol., S. Mehra., T.K. Maltra and K.N. Jalan. *Zymodeme alteration of Entamoeba histolytica isolates under varying.* Trans. Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg. 87: 490-491, 1993.
29. Muñoz, M.L., J. Calderón and M. Rojkind. *Presencia de actividad colagénica en presencia de trofozoitos de Entamoeba histolytica.* Archivo de Investigación Médica (México) 13 (3): 192-202, 1982.
30. Pérez, T.R. and H. Brandt. *AMIBIASIS. Editorial La Prensa Médica Mexicana, 1a edición. México D.F. 1970.*
31. Proctor, E.M., Q. Wong, J. Yang and S. Keystone. *The Electrophoretic isoenzyme patterns of strains of Entamoeba histolytica isolated in two major cities in Canada.* Annals of Trop. Med. and Hyg. 37: 296-301, 1987.
32. Proctor E.M. and Q. Wong. *Patrones isoenzimáticos de cepas de Entamoeba histolytica aisladas en Columbia Británica.* Archivo de Investigación Médica (México), 18: 151-156, 1987.
33. Radvin, I.J., B. Craft and L.R. Guerrant. *Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica.* J. Exp. Med. 152 (August): 377-390, 1980.
34. Ramos M.E., M.F. Martínez., A.F. Velasco., B.F. Flores and G.L. Aguirre. *Amibiasis: Estudio comparativo de 5000 necropsias del Hospital General "Dr. Bernardo Sepúlveda C" del Centro Médico Nacional.* Archivo de Investigación Médica (México), 17 (1): 351-357 1986.

35. Reeves, E.R. Metabolism of *Entamoeba histolytica*. Schaudin 1903. Advances in Parasitology, 23: 105-142. 1984.
36. Reeves, E.R., R. Serrano and D. South. 6-phosphofructokinase (pyrophosphate). Properties of the enzyme from *Entamoeba histolytica* and its reaction mechanism. Journal of Biological Chemistry, 25 (10): 2958-2962. 1976.
37. Reeves, E.R., D. South., J. Harold and L. Warren. Pyrophosphate: D-Fructose 6-phosphate 1-phosphatransferase. A new enzyme with the glycolytic function of 6-phosphofructokinase. Journal of Biological Chemistry, 24: 7737-7741. 1974.
38. Sargeant, G.P. and E. Williams. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoeba of man. Trans. Roy. Soc. of the Trop. Med. and Hyg. 72 (2): 225-227. 1979.
39. Sargeant, G.P., H. Jackson., R.S. Wiffen and R. Bhojani. Biological evidence of genetic exchange in *Entamoeba histolytica*. Trans. Roy. Soc. of the Trop. Med. and Hyg. 82: 862-867. 1988.
40. Sargeant G.P., H. Jackson., R.S. Wiffen and R. Bhojani. Confiabilidad de los zimodemas de *Entamoeba histolytica* para el diagnóstico del laboratorio clínico. Archivo de Investigación Médica (México), 18: 69-75. 1987.
41. Schaudinn, F. Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. (Vorlau Fig. - Mittheilung). Arb. Kais. Gesund. (Berlin), 19: 547-576. 1903.
42. Senties, N.A., L.E. Estrada. Las plantas medicinales del Valle de Tehuacán, Puebla. Resumen del Congreso Latinoamericano de Botánica, Lima Perú, 1982.
43. Sápulveda, B. La amibiasis invasora por *Entamoeba histolytica*. Gac. Med. Mèx. 100: 201-254. 1970.
44. Tamayo A., E. Jimenez., L. Mantesinos., Z. Ramírez y J. Kumate. Investigación de los cambios en el patrón electroforético o zimodemo en amibas cultivadas en presencia de un extracto acuoso de Colapahle (*Zantoxylum liebmanniarum*). Resúmenes del X seminario sobre amibiasis, México, 99, 1986.
45. Wals, J.A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis estimation of the global magnitudes of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. 8: 228-238, 1986.
46. Wittner, M. and R.M. Rosenbaum. Role of bacteria in modifying virulence of *Entamoeba histolytica* studies of amoebae from axenic cultures. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 19: 755-761, 1970.