



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Visualización del Nucléolo en el trofozoito de  
*Entamoeba histolytica* con Microscopia de  
Fuerza Atómica**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**Especialista en Microscopia Electrónica**

P R E S E N T A:

**RUBEN ISAI MADRIZ VILLANUEVA**

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Luis Felipe Jiménez García



México D.F.

2011



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 esta 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.

## DEDICATORIAS

A mi querida madre por ser esa fuente de admiración, amor incondicional y apoyo durante toda mi vida, valores que me han demostrado que en la vida los límites para la superación personal son inexistentes.

A mi padre y hermanos que siempre han estado presentes cuando los he necesitado.

A mi queridísima amiga Paulina Gutiérrez, quien me guio, aconsejo y se convirtió en mi faro durante mi viaje por los nebulosos trámites burocráticos universitarios por toda la trayectoria del programa.

A mis tías Laura Vilanueva e Hildelisa Mejía quienes me ayudaron durante mi carrera universitaria cuando acudí a ellas.

A la familia Mejía Villanueva por su apoyo, comprensión y cariño otorgado durante el transcurso de la especialidad.

Por último, a la familia Guízar Villanueva quienes me adoptaron y brindaron apoyo incondicional durante los momentos difíciles.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme cumplir mi sueño de ser un orgulloso egresado de la casa de estudios más grande de América latina.

Al magnánimo Dr. Luis Felipe Jiménez García, por despertar el potencial científico de aquellos que lo rodeamos y haberme otorgado la oportunidad de ser parte de su gran equipo de trabajo. En una oración: Por acceder a ser el mejor tutor que un estudiante pueda pedir.

A la Dra. Lourdes Agredano, Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, y al Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin, por todo el apoyo técnico y la ayuda para la parte experimental y analítica de este trabajo, así como por sus valiosos comentarios para la culminación de esta investigación.

Al Esp. Mic. Elec. Marco Antonio González Jiménez por su gran apoyo técnico, las amenas charlas y sus valiosos comentarios para formarme como microscopista electrónico.

A la Maestra Silvia Juárez Chavero por su apoyo técnico y valiosos comentarios durante los procedimientos de laboratorio.

A la Dra. Reyna Lara, por brindarme su apoyo incondicional y guiarme durante la investigación.

A La Dra. Bibiana Chávez, del Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del IPN, por su apoyo técnico y hacer la valiosa donación de los trofozoítos de *E. histolytica*, sin los cuales nada de esto hubiese sido posible.

A la Dra. Guadalupe Zavala Padilla para la cual no tengo palabras de agradecimiento por todo su apoyo, paciencia y dirección durante esta investigación. Solo me queda decirle que sin lugar a dudas, ha sido la mejor profesora de toda mi carrera.

# ÍNDICE

**RESUMEN**

**ABSTRACT**

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Aspectos Morfologicos	2
1.2 Microscopia de Fuerza Atomica (AFM)	3
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>2</b>
2.1 Objetivo general	66
2.2 Objetivos particulares	¡Error! Marcador no definido.6
<b>III. HIPÓTESIS</b>	<b>7</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>8</b>
4.1 <i>Procesamiento general</i>	68
4.2 <i>Corte y tinción</i>	69
4.3 <i>Microscopia Óptica</i>	610
4.4 <i>Microscopia Electrónica de Transmisión</i>	610
4.4 <i>Microscopia de Fuerza Atómica</i>	611
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>112</b>
5.1 <i>Microscopia Óptica</i>	612
5.2 <i>Microscopia Electrónica de Transmisión</i>	613
5,3 <i>Microscopia de Fuerza Atómica</i>	615
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>19</b>
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>21</b>
<b>VIII. LITERATURA CITADA</b>	<b>22</b>



## RESUMEN

La microscopia de Fuerza Atómica (AFM) es una técnica que combina la versatilidad de la microscopia óptica con una resolución comparada a la de la microscopia electrónica y permite medir detalles estructurales a resoluciones de unos cuantos nanómetros en tercera dimensión en la muestra misma

En este estudio, se muestra el trofozoito de *Entamoeba histolytica* bajo el Microscopio de Fuerza Atómica, analizando su estructura nuclear. Se obtuvieron imágenes del trofozoíto con técnicas de microscopia de campo claro, Electrónica de Transmisión (TEM) y Fuerza Atómica (AFM). Se llevo a cabo la comparación de la estructura nuclear de *E. histolytica* con las imágenes obtenidas, con las cuales se muestra la presencia de nucléolo en el trofozoíto de *E. histolytica*.



## ABSTRACT

Atomic Force Microscopy (AFM) is a technique that combines the versatility of Optic microscopy with a resolution compared to that of the Transmission Electron Microscope. In addition, it allows to measure structural details in 3 dimensions down to nanometric resolutions.

This study shows the trophozoite of *Entamoeba histolytica* using the Atomic Force Microscope, analyzing its nuclear structure.

Images of the *E. histolytica* trophozoite were obtained using light, Transmission Electron (TEM) and Atomic Force (AFM) Microscopy techniques. A comparison of the nuclear structures with these techniques revealed the presence of a well defined nucleolus in the trophozoite of *E. histolytica*.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Aspectos Morfológicos

### 1.1.1 *Entamoeba histolytica*

*Entamoeba histolytica* es un organismo unicelular de distribución mundial que en su forma de trofozoíto presenta un diámetro de 20-40µm (Petri, 1993). Este parasito intestinal es móvil gracias a su ectoplasma que le permite formar un pseudópodo; su núcleo presenta un cariosoma compacto central y cromatina en gránulos uniformes en tamaño y localización.

*E. histolytica* presenta dos fases de desarrollo bien establecidas: el trofozoito y el quiste, los cuales constituyen las formas invasiva e inféctate respectivamente.

El trofozoíto en la forma móvil es extraordinariamente pleomorfo dado a que su movilidad y aspecto son influidos por cambios de pH, osmolaridad y potencial de redox. Este es de tamaño variable (10-60µm) y presenta una membrana citoplasmica dividida en dos porciones: ectoplasma y endoplasma (Petri, 1993).

El endoplasma tiene una estructura granular fina, con abundantes vacuolas y vesículas (Pumarola, 1991), mientras que el ectoplasma es la pared periférica del trofozoíto, de la cual, los pseudópodos son prolongaciones de la misma. Estos últimos proporcionan movilidad al parasito de aproximadamente 50 µm/seg (Romero, 1993) y sirven de ayuda para su nutrición por fagocitosis

Microestructuras como el retículo endopasmico rugoso, aparato de Golgi, microtubulos o mitocondrias no son visibles al microscopio electrónico (Pumarola, 1991). El núcleo es esférico y presenta cromatina adherida a la cara interna de la membrana nuclear y un

endosoma que contiene con un acumulo de cromatina pequeño (Petri 1993: Brown 1985: Romero 1993).

El quiste maduro tetranucleolado es forma infectante de *E. histolytica*, siendo este redondo u ovalado de 10-25µm de tamaño. Posee una pared lisa de 0.6µm y es resistente al jugo gástrico y factores ambientales externos (Pumarola, 1991). Siendo el hombre su principal reservorio. Como portador sano o convaleciente, el humano es la principal fuente de excreción de quistes infectantes patógenos.

Este organismo unicelular es causante de la amebiasis, la cual afecta en particular a países en vía de desarrollo, infectando alrededor de 500 millones de personas y anualmente 100.000 mueren por complicaciones (Kucik, 2004). Así, la amebiasis es considerada la tercera parasitosis causante de mortalidad mundial después de la malaria y la esquistosomiasis (Pillina, 2008).

### 1.1.2 Nucléolo

Una de las estructuras más prominentes en el núcleo de los eucariontes es el nucléolo. Esta varía en cantidad y tamaño de acuerdo a la especie estudiada siendo visible con diferentes técnicas de microscopía.

En *E. histolytica*, la estructura del nucléolo carece de membrana y ocupa una gran porción substancial del interior del núcleo. Este contiene genes ribosomales (rDNA), una gran cantidad de proteínas y varios tipos de RNA los cuales organizan en dominios de tres elementos ultra estructurales y a la vez so las tres regiones morfológicas distinguibles y distintas: el componente granular, el componente fibrilar y los centros fibrilares (Alberts. et al. 2002).

Dentro del nucléolo, se lleva a cabo la síntesis y maduración del pre-rRNA, el ensamblado de las subunidades del ribosoma y en general, la producción de

componentes pre-ribosomales, como la transcripción de genes de rRNA (Raska 2006: Scheer 1994: Jiménez-García1993).

En los últimos años se determinó que el nucléolo participa en la biosíntesis y procesamiento de componentes ribonucleoproteicos y de componentes del RNA además de conservar proteínas que regulan el ciclo celular de una manera óptima (Visintin, 2000).

La transcripción se lleva a cabo comúnmente en el componente fibrilar denso y dentro del mismo se inicia el procesamiento del pre-rRNA. Subsecuentemente el rRNA se une a proteínas ribosomales, conformado casi en su totalidad a las subunidades pre-ribosomales, las cuales pueden trasladarse al citoplasma (Jimenez-Garcia, 1993).

## ***1.2 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)***

Los avances tecnológicos en el campo de la nanotecnología han abierto las puertas para el análisis de material biológico, utilizando los instrumentos diseñados para las ciencias materiales y adaptándolos para observar muestras de carácter biológico, como es el caso de los microscopios de contacto.

Desde su aparición en los 80's (Bining, 1986), el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) ha sido un equipo importante para la elucidación de la microestructura de material biológico.

Siendo el AFM parte de la familia de los Scanning Probe Microscopes (SPM), se conforma de 5 elementos fundamentales: la punta, el escáner, el detector, el sistema de control electrónico y el sistema de aislamiento de vibración ((Jackson 1998: Size 1981: Zangwill 1988).

Con estos elementos, el AFM trabaja en diferentes modos de operación como Tapping, Contacto e Imagen de Fase. Esto proporciona imágenes tridimensionales en tiempo real, permitiendo monitorear un área localizada para obtener las propiedades de topografía, elasticidad y adhesión, lo cual no es posible obtener con técnicas de microscopia electrónica (Bonnell, 2001).

El Microscopio de Fuerza Atómica trabaja monitoreando la superficie de la muestra con una punta de radio de curvatura de 20 a 60nm que se localiza al final de un cantiléver. Las fuerzas entre la punta y la muestra provocan la deflexión del cantiléver, simultáneamente un detector mide esta deflexión a medida que la punta se desplaza sobre la superficie de la muestra generando una micrografía de la superficie. La fuerza interatómica que contribuye a la deflexión del cantiléver es la fuerza de Vander Waals (Gonzales, 2005).

La microscopia de fuerza atómica (AFM) es una técnica complementaria que combina la versatilidad y conveniencia de la microscopia óptica con una resolución comparada a la de la microscopia electrónica.

La mayor ventaja que ofrece esta técnica, a comparación del uso de la microscopia electrónica es que nos permite medir detalles estructurales a resoluciones de unos cuantos nanómetros en la muestra misma (Joshi et al. 1999).

La microscopia de fuerza atómica no solo complementa otras tecnologías de observación sino que puede analizar microestructuras para diagnósticos en diferentes campos de la biomedicina y biología.

En el campo biológico se puede aplicar esta técnica para la visualización de las estructuras con resoluciones manométricas, mediciones metroscopicas y para análisis de fuerzas en escalas de pico Newtons, lo que revela aspectos importantes de las fuerzas interactivas de la muestra (Guerrera, 2003).

Dado a que el AFM explora las superficies de la muestra, la visualización de las estructuras intra-celulares se hace imposible sin la segmentación de la misma. Cada segmento ofrece información distinta y complementaria, los cuales, al ser unidos, forman una completa y detallada imagen de la estructura completa en 3D.

El uso del AFM para obtener imágenes y nano manipulación de superficies de células y biomoléculas hace de esta, la herramienta perfecta para el análisis de organismos unicelulares (Guerrera, 2003), como lo es el parásito intestinal *Entamoeba histolytica*.

A pesar del reciente descubrimiento de la ultraestructura del nucléolo en *Entamoeba histolytica* (Vázquez-Echeverría et al. 2009) y tras haber numerosos estudios de la ultraestructura interna de *E. histolytica* con diferentes técnicas de microscopía (El-Hashimi 1970: Miller 1961: Albach 1977: Joshi 1999: Vázquez-Echeverría 2009), hasta hoy no se ha explorado la estructura interna del trofozoíto con resoluciones manométricas usando el microscopio de fuerza atómica.

El propósito de esta investigación es el estudio de la morfología ultraestructural del núcleo en *E. histolytica* usando técnicas de microscopía de fuerza atómica (AFM).

## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

- Obtener micrografías del nucléolo del protozooario *Entamoeba histolytica* con técnicas de Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

### 2.2 Objetivos particulares

- Obtener imágenes del trofozoíto de *E. histolytica* con técnicas de microscopia de campo claro.
- Obtener micrografías del nucléolo en el trofozoíto de *E. histolytica* con técnicas de Microscopia Electrónica de Transmisión.
- Comparar las imágenes obtenidas con las técnicas de microscopia de luz y Electrónica de Transmisión con las imágenes de AFM y determinar si el nucléolo es visible.

### III. HIPÓTESIS

- El Protozooario *Entamoeba histolytica* presenta un nucléolo no diferenciado
- No habrá diferencias significativas en la visualización de la estructura nucleolar en *E. histolytica* entre las imágenes obtenidas con técnicas de Microscopia óptica, Electrónica de Transmisión y de Fuerza Atómica.
- El análisis de imágenes obtenidas con el microscopio de Fuerza Atómica mostraran la estructura nucleolar en el trofozoíto de *E. histolytica* de una manera clara y contundente.



## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### **4.1 Procesamiento general**

Los trofozoítos de *E. histolytica* fueron donados por la Dra. Bibiana Chávez, del Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del IPN.

La recolección de los trofozoítos se llevo a cabo durante la fase de crecimiento logarítmico en tubos de ensayo y cubiertos con tapas de corcho estériles. Estos se centrifugaron hasta formar un botón de células en el fondo.

Se extrajo el botón de células de cada una de las 6 muestras y se colocaron en tubos de Ependorfs de 1.5ml en solución fijadora (mezcla de 1:1 de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% en PBS al 0.1 M y pH 7.2). Transcurrido el tiempo de fijación se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno, las muestras se centrifugaron durante 3 minutos a 12,000/RCF en una centrifuga mini spin de la marca Eppendorf.

Cada una de las seis muestras se dividieron formando doce de las cuales la mitad se posfijaron en tetra óxido de osmio al 1% durante una hora. Las muestras posfijadas de volvieron a lavar tres veces durante cinco minutos cada una en buffer de fosfato (PBS).

La deshidratación se llevo a cabo dos veces cada una con etanol a concentraciones graduales (30, 50, 70, 80, 96%) durante 10 minutos para evitar daños ultra estructurales de las células. Al termino de los cambio mencionados, se llevaron a cabo dos cambios de etanol absoluto durante 15 minutos cada uno, seguidos por dos cambios de óxido de propileno (agente intermediario) durante 15 minutos respectivamente.

Para llevar a cabo la preinclusion se utilizo una mezcla Epon 1:1 óxido de propileno durante toda la noche a temperatura ambiente, seguida de un cambio de mezcla Epon

2:1 óxido de propileno durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo mencionado se incluyeron las muestras en resina pura (Epon 812) en los tubos Ependorfs mismos deshaciendo un poco el botón y polimerizándolos durante 3 días a 55°C

## **4.2 Corte y tinción**

Los bloques de Epon fueron trabajados en el ultra micrótomo modelo Ultracut R, de la marca Leica, obteniendo cortes ultra-finos (40-90nm) y semi-finos (200-600nm).

A cada bloque se le tallo una pirámide con navajas de afeitar nuevas de doble filo (Gillette) en donde se encontraban los botones de células.

Las pirámides fueron rebanadas con cuchillas de vidrio en cortes semi-finos (200nm de grosor). En las cuchillas se coloca una barquilla hecha de cinta adhesiva y la misma es llenada con agua en la cual, las rebanadas de la pirámide flotan en la interface del aire y agua en donde se mantienen en suspensión dentro de la barquilla. Los cortes semi-finos son subsecuentemente levantados con diferentes técnicas de acuerdo a protocolos descritos para cada microscopio a usar:

Los cortes semi-finos son subsecuentemente levantados con un asa bacteriológica y colocados sobre portaobjetos de vidrio en los cuales se dejaron secar al aire para su visualización bajo el microscopio de campo claro y fuerza atómica.

### ***4.3 Microscopia Óptica***

Una vez obtenidos los bloques, se cortaron secciones de tejido de 600nm de espesor. Estos fueron colocados sobre un portaobjetos de vidrio y fijados por calor. Una vez fijados, los cortes fueron contrastados con azul de toluidina al 1%, lo cual se realizó poniendo una gota del colorante sobre la muestra fijada para posteriormente calentar por debajo el portaobjetos durante 2 segundos, contrastando así la muestra. Se lavo el exceso con suficiente agua bi-destilada y se dejo secar al aire para su análisis en un microscopio de campo claro.

Los cortes semi-finos teñidos con azul de toluidina incluidos en Epon, se observaron en campo claro en un microscopio Zeiss Axiostar con un objetivo 5X, 10X y 40X. Las imágenes se registraron digitalmente con una cámara Canon EOS 1000D acoplada al microscopio con el programa EOS Utility versión 2.4.0.1.

### ***4.4 Microscopia Electrónica de Transmisión***

Los cortes ultra-finos (40-90nm) obtenidos de los bloques de resina epoxica, fueron extraídos de la barquilla con rejillas de cobre que poseen membrana de collodion. Se hizo flotar cada rejilla sobre una gota de acetato de uranilo al 4%, durante 20 minutos, en una cámara húmeda y protegida de la luz. Se lavaron por goteo con agua bi-destilada. Subsecuentemente, las rejillas se flotaron sobre una gota de citrato de plomo a. 0.35% durante 10 minutos en otra cámara húmeda, en presencia de NaOH y protegidas de la luz. Finalmente se lavan con agua bi-destilada y se dejan secar a temperatura ambiente para su posterior observación en el Microscopio electrónico de transmisión.

Las rejillas fueron se observaron en un Microscopio Electrónico de Transmisión 1010 de la marca Jeol a diferentes aumentos (4,000-10,000X), las imágenes se registraron digitalmente con el programa Scion Image.

## 4.5 Microscopia de Fuerza Atómica

Los cortes semi-finos (200-350nm) teñidos y sin teñir se montaron en porta objetos de vidrio y se dejaron secar al aire. Las muestras se observaron en un microscopio de fuerza atómica modelo BioScope (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) operando en un modo de contacto con un controlador Nanoscope IIIa.

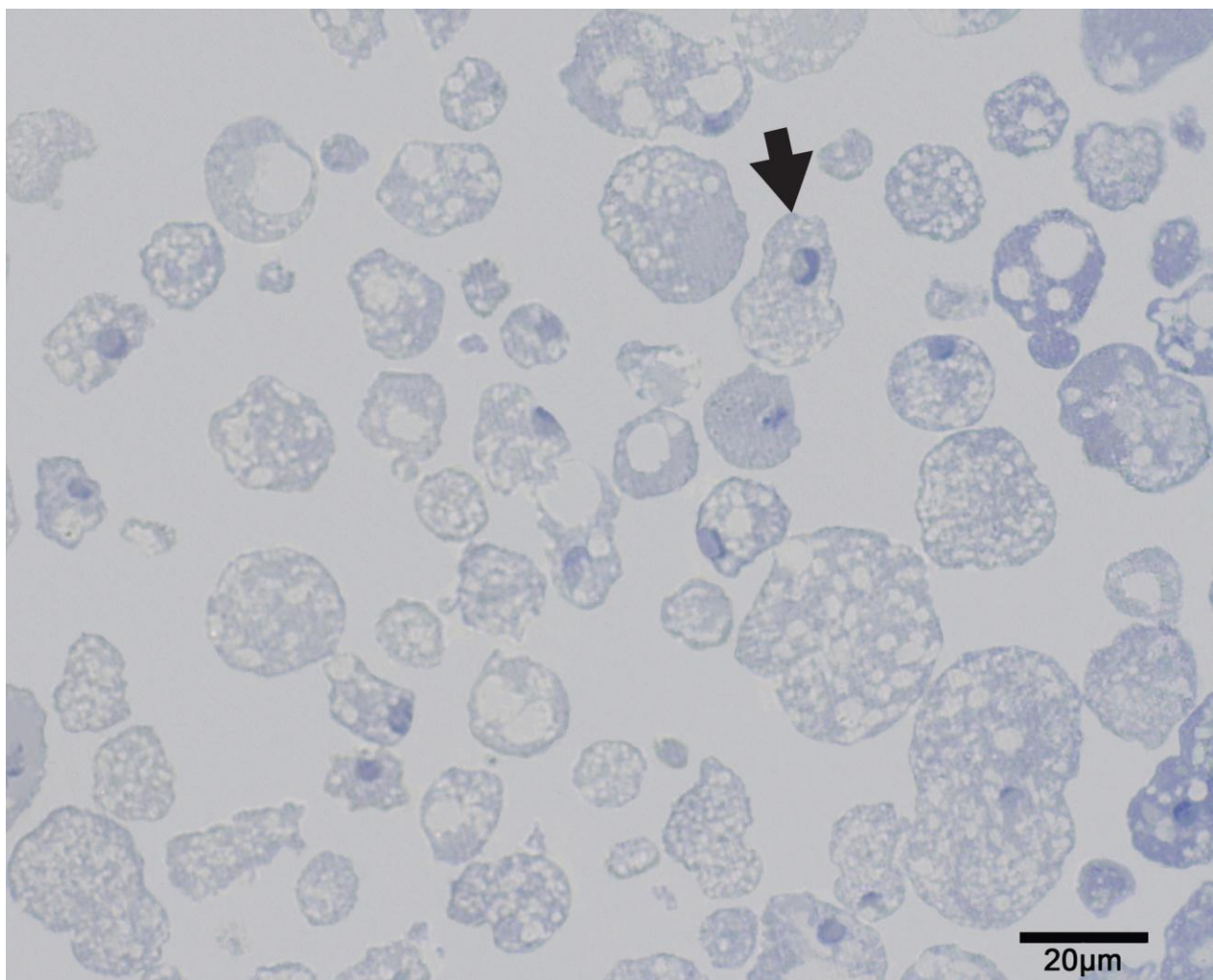
El microscopio de fuerza atómica trabaja sobre un microscopio invertido Diaphot 200 (Nikon). Se utilizó un scanner de 100 $\mu$ m y puntas de nitruro de silicio de 20-50nm de radio de curvatura (modelo NP). Se utilizaron velocidades de barrido de entre 1.285 a 1.969 Hz, una fuerza de 10nN y una ganancia de 0.5 unidades arbitrarias.

Se utilizaron dos intervalos de operación: de contacto y no contacto. Para el primer intervalo de operación, el cantiléver se mantuvo a pocos angstroms de la superficie de la muestra y la fuerza interatómica entre el cantiléver y la muestra es repulsiva. Para el segundo, el cantiléver se mantuvo a decenas de angstroms de la superficie de la muestra y la fuerza interatómica entre la punta y la muestra es atractiva

## V. RESULTADOS

### 5.1 Microscopia Óptica

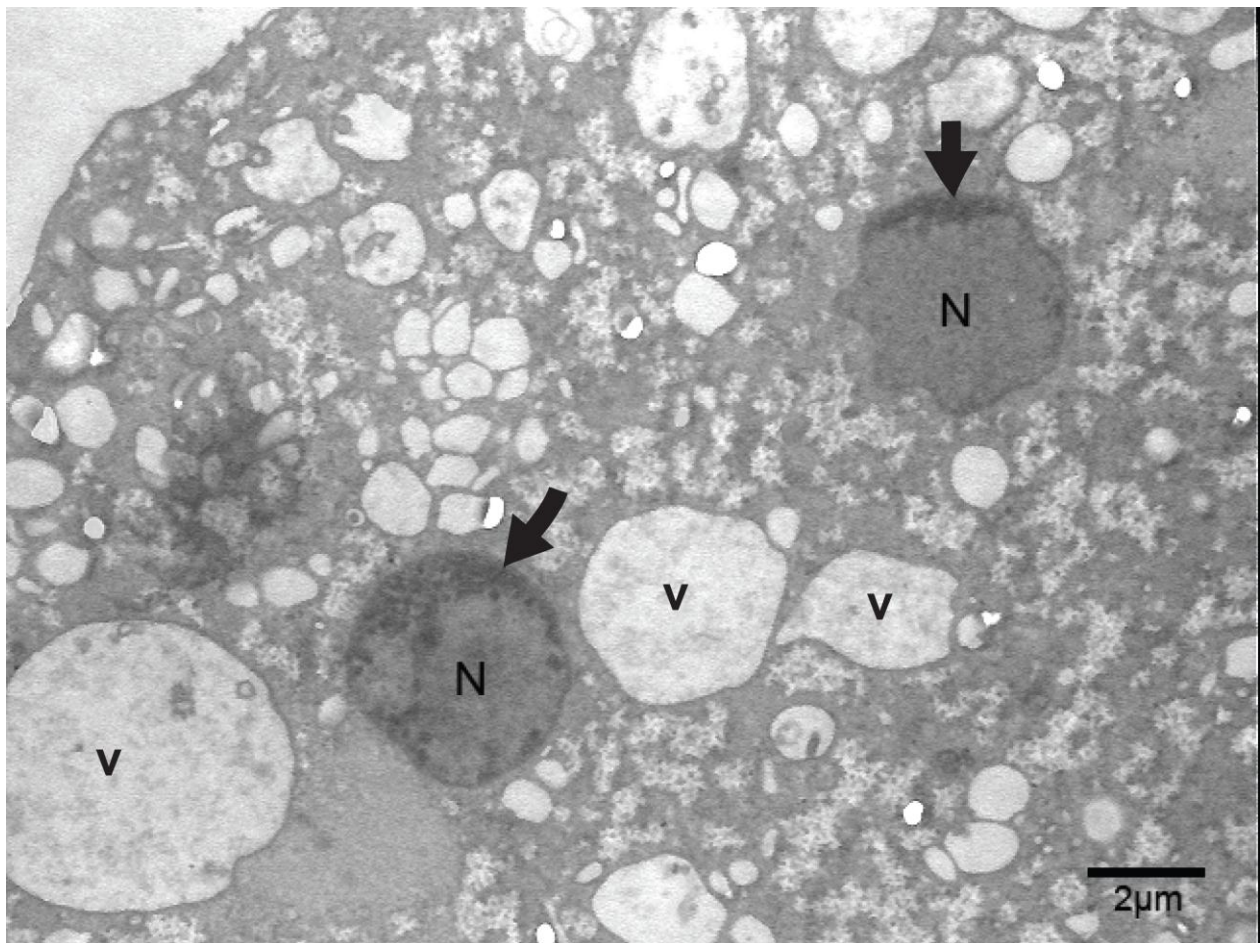
Las imágenes obtenidas con la microscopia de campo claro en cortes semi-finos(200-300nm) tenidos con azul te toluidina la cual se une preferentemente a los grupos de fosfato del RNA muestran el área nucleolar de un color azul más intenso en comparación con el resto de las estructuras internas del trofozoíto (Fig. 1).



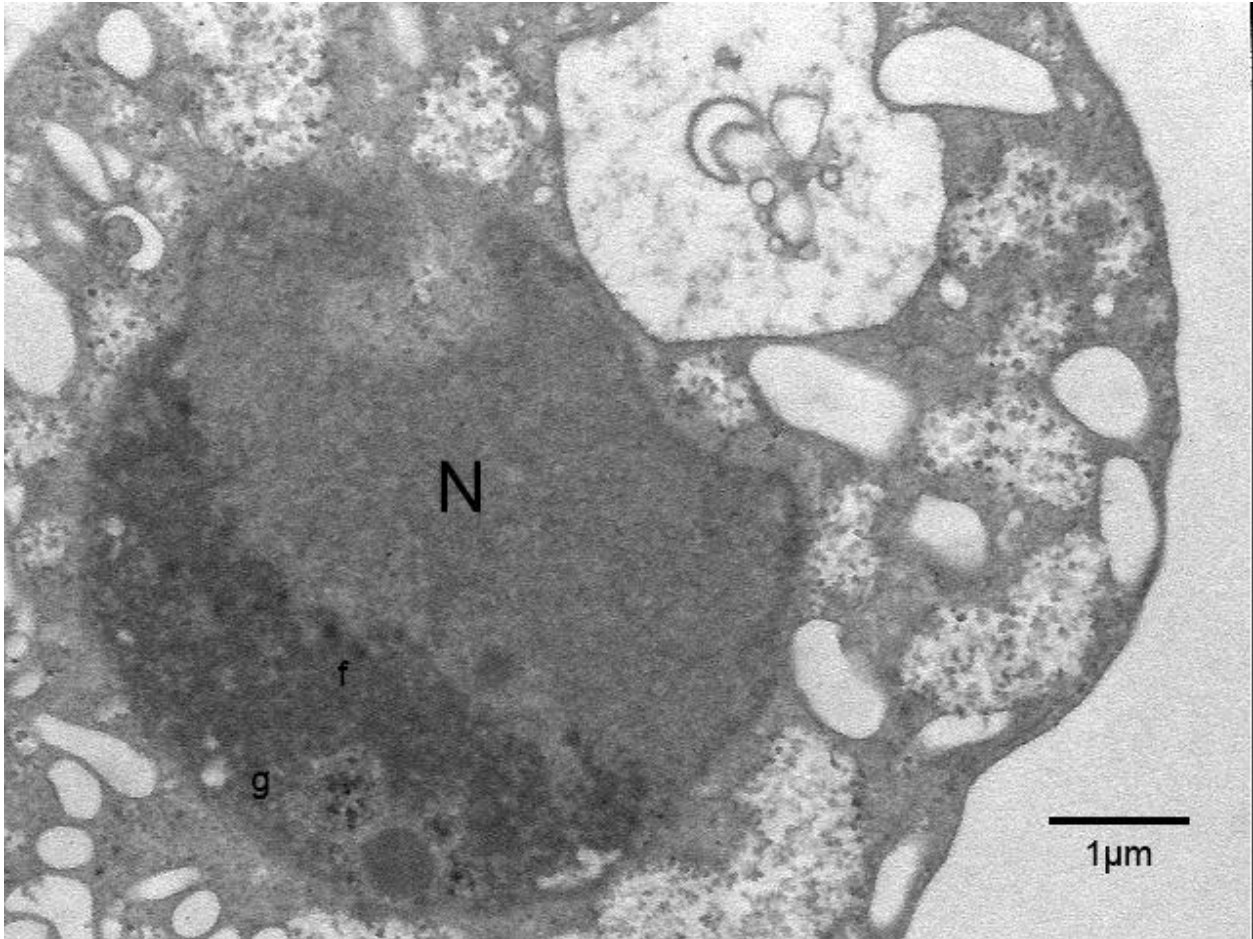
**Fig. 1 : En la imagen se identifica un trofozoíto amoro (flecha) con un núcleo visible y material nucleolar de un color azul más intenso.**

## 5.2 Microscopia Electrónica de Transmisión

Las imágenes de microscopia electrónica de transmisión contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo, muestra al trofozoíto como una célula amorfa rica en vacuolas citoplasmicas y esferulas nucleares de diferentes tamaños. Dentro del núcleo se observa el nucleoplasma de baja densidad electrónica en su periferia se puede apreciar material electro denso y fibrogranular (Figs. 2 y 3).



**Fig. 2 :** La imagen presenta al trofozoíto rico en vacuolas (V) de diferentes tamaños y núcleos (N) en los cuales se puede apreciar el material fibrogranular denso (Flecha).  
no presenta organelos citoplasmicos ni retículo endopasmico



**Fig. 3: el nucléolo es amorfo con esferulas y material electro denso en la periferia, compuesto por regiones fibrilares (f) y granulares (g). El nucleoplasma es uniforme y menos contrastado de material electro denso**

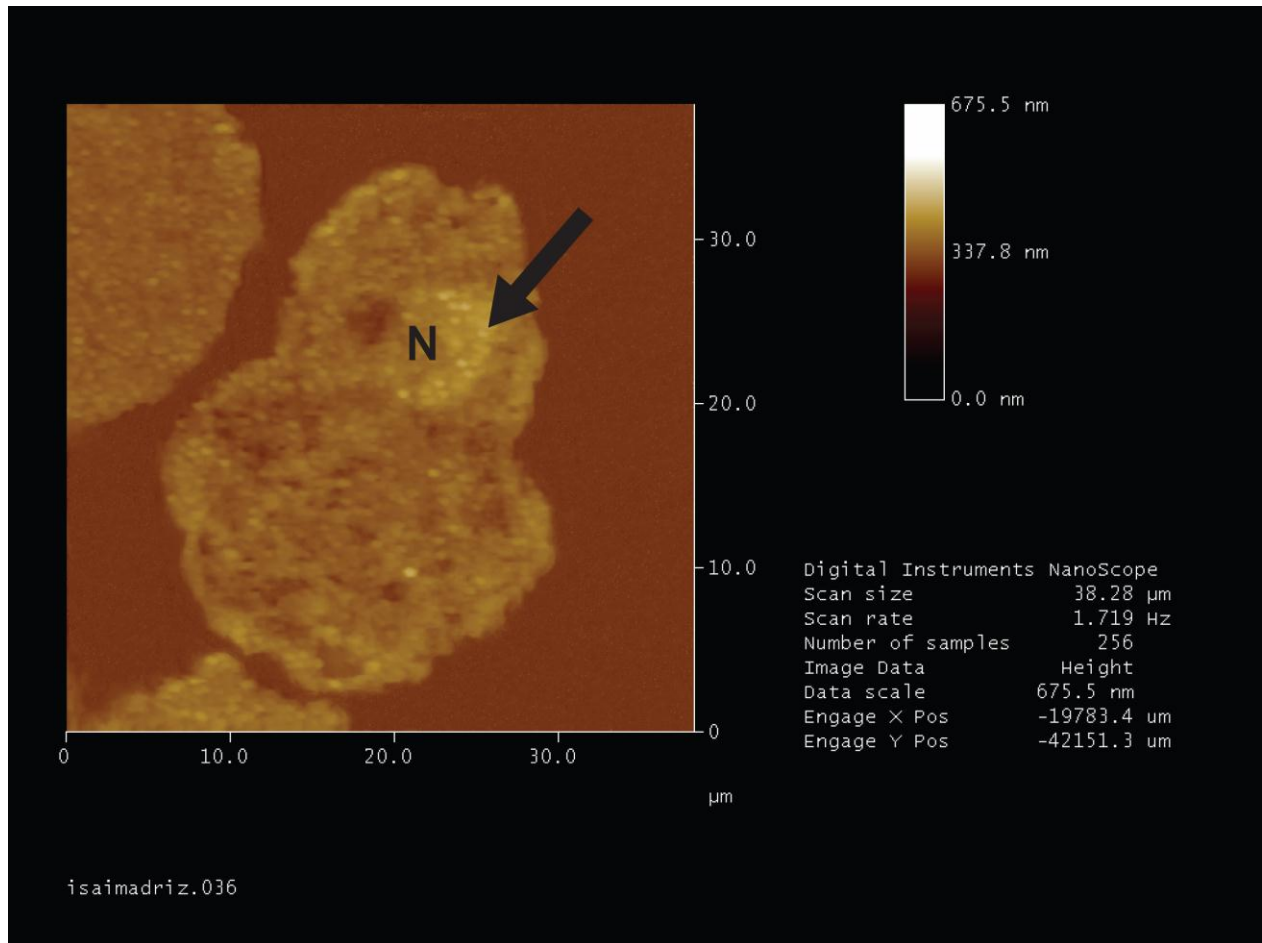
### 5.3 Microscopia de Fuerza Atómica

Las imágenes obtenidas con el microscopio de fuerza atómica trabajando en modo de contacto a partir de cortes semi-finos(200-300nm) preparados para microscopia electrónica de transmisión, muestran cuatro zonas ultra estructurales en el trofozoíto de *E. histolytica*, núcleo, nucléolo, endoplasma y ectoplasma se pueden diferenciar en las siguientes figuras (4.5 y 6).

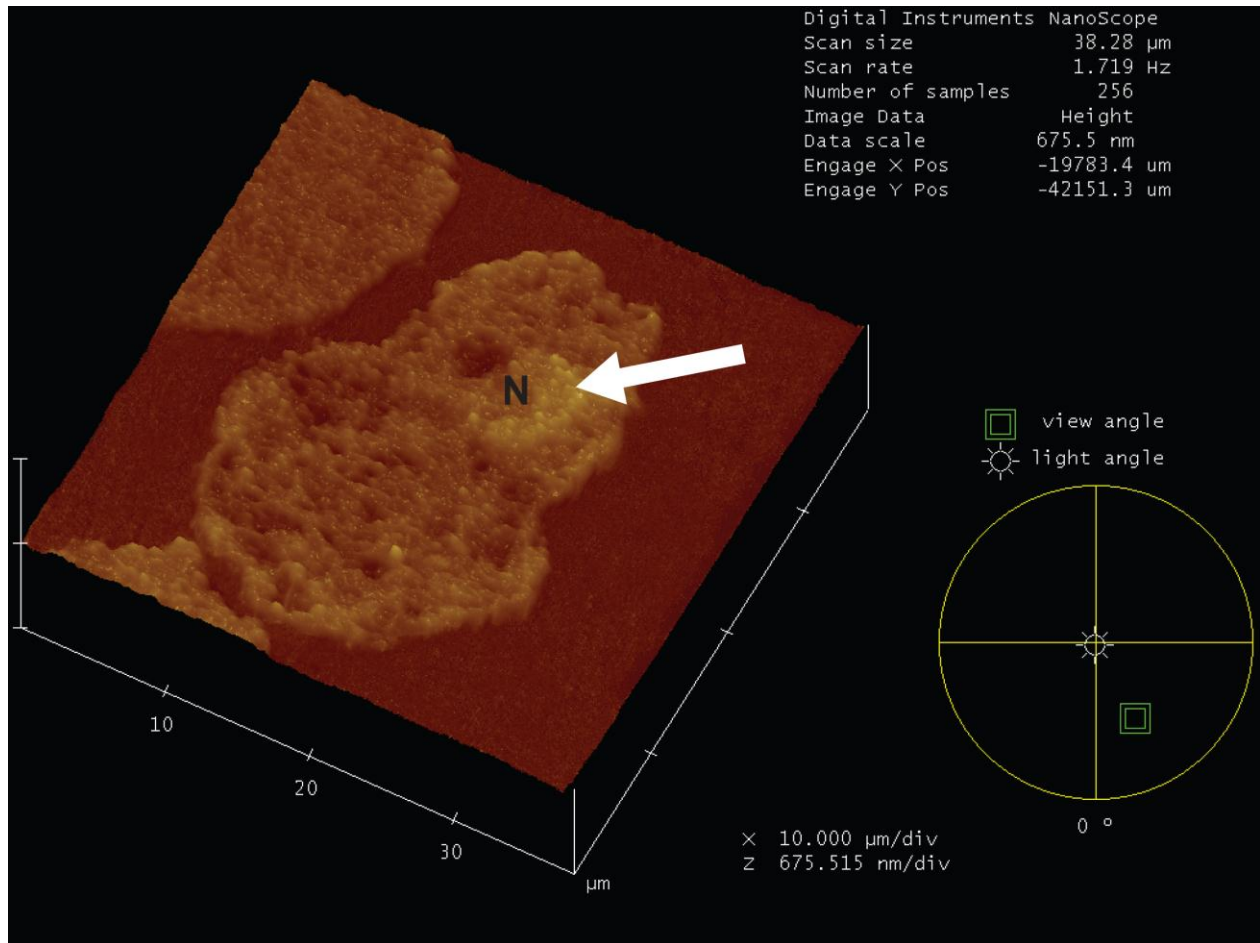
Se investigaron los detalles ultra estructurales en los trofozoítos, llevando a cabo análisis tridimensional con el AFM. Las imágenes presentadas en este trabajo fueron optimizadas para hacer más claros algunos de los detalles característicos de la estructura nucleolar (Figs. 5 y 6).

El estudio topografico (Fig. 6) indico que el nucleo tiene una ligera elevacion de 100nm, mayor a la de los componentes que lo rodean, mientras que el nucléolo o material fibrogranular esta elevado cerca de 50nm con respecto al resto del nucleo.

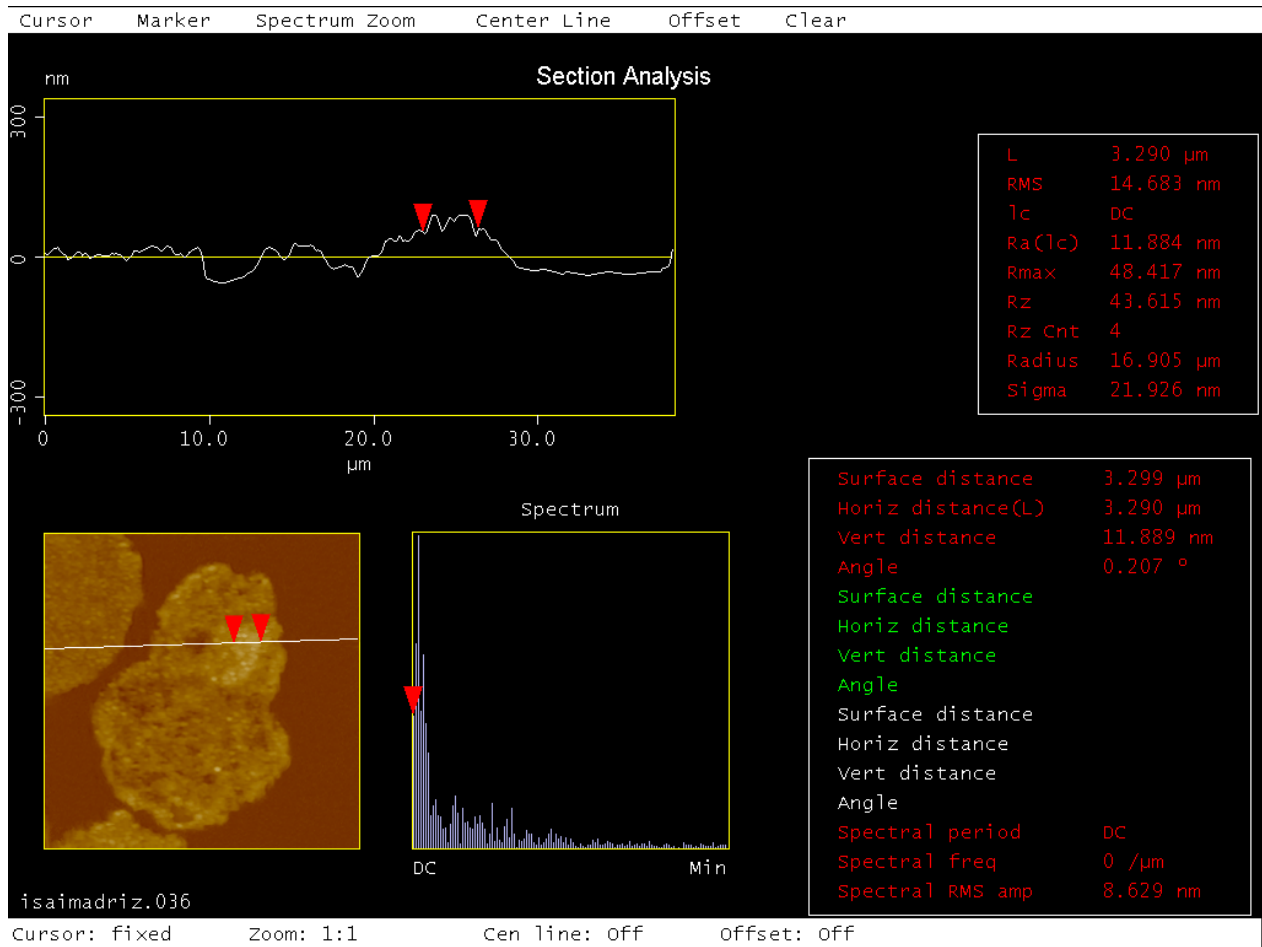




**Fig. 4 : La imagen muestra un trofozoíto amorfo en donde es visible el núcleo (N) y el material fibrogranular o nucléolo (Flecha)**



**Fig. 5 proyección tridimensional en paralelo. Se puede apreciar al trofozoíto amorfo. El núcleo (N) y nucléolo (flecha) se puede apreciar en tonos más claros distribuido dentro de la periferia del núcleo**



**Fig. 6:** La imagen topográfica muestra el núcleo (N) con una ligera elevación con respecto a los componentes que lo rodean. También muestra a la periferia del nucléolo (flechas rojas) siendo esta más elevada que el resto del núcleo. .

## VIII. DISCUSIÓN

Este trabajo corrobora la localización y morfología del nucléolo en el trofozoíto de *Entamoeba histolytica* con diferentes técnicas de microscopía (Figs. 1-6)

Las técnicas utilizadas para identificar el nucléolo de *E. histolytica* fueron basadas en métodos comprobados por diversos autores (López-Velázquez, 2005, Jiménez-García, 2008, Vazquez- Echeverria.2009):

El azul de toluidina se une preferencialmente a los grupos de fosfato del RNA. A pesar de no saber con certeza el porqué de esta preferencia en contraste con los fosfatos del DNA, Smetana (1967) propuso una menor avidéz de esta tinción por el DNA en condiciones no desnaturalizadas.

La técnica de acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo (Bernard, 1969) ocasiona que el acetato de uranilo se una a los ácidos nucleídos, proteínas y otros compuestos. El uranilo es quelado por el EDTA y retirado de la cromatina compacta, quedando unido a las ribonucleoproteínas (RNPs). Subsecuentemente, el acetato de uranilo actúa como mordante para el citrato plomo, el cual reafirma la tinción de los RNPs.

A pesar de que anteriormente se trató de analizar la ultra estructura en vivo de *E. Histolytica* con AFM (Joshi. et al 1999), las características internas del núcleo no pudieron ser descritas con detalle dado a la doble membrana que contiene el núcleo

Cada célula mostró una forma distinta (pleomorfa), dentro de las cuales se observaron abundantes vacuolas de diferentes diámetros (500-900nm). Se encontró que el diámetro del núcleo fue de aproximadamente 10µm lo cual concordó con estudios anteriores (Joshi, et. Al.1999) a comparación de los valores ligeramente más bajos de 4-7µm reportados con anterioridad (Martínez-Palomo 1998).

El estudio topográfico demostró que la longitud del nucléolo fue de un aproximado de 3.20 $\mu$ m. La elevación máxima observada en la muestra fue de 61nm comparado a los elementos aledaños al núcleo lo cual es una cifra muy reducida de acuerdo a los valores previamente reportados de 238nm (Joshi. Et. Al. 1999). El valor vertical se reduce significativamente dado a que el materia fue sometido a cortes longitudinales para la observación de las estructuras internas.

Esta investigación, aunada a estudios anteriores (Jiménez-García, 2008. López-Velázquez, 2005) muestran la presencia del nucléolo en organismos de divergencia temprana en la evolución. Lo que sugiere que el nucléolo es un organelo característico intracelular en donde los genes ribosomales se han compartamentalizado desde etapas muy tempranas de la evolución de los eucariontes.

## IX CONCLUSIONES

La estructura nuclear de *Entamoeba histolytica* fue examinada por primera vez con el AFM.

El trofozoíto de *E. histolytica* muestra la presencia de nucléolo periférico, sin una identificación de centros fibrilares o una clara delimitación entre el material fibroso del granular. Este material se presenta como una región intranuclear periférica con forma de anillo, de morfología fibro-granular

La técnica de análisis ultraestructural con el AFM, podría aportar información valiosa acerca de los mecanismos patogénicos de este y otros parásitos.

Este estudio corrobora y complementa las investigaciones llevadas a cabo con anterioridad en el laboratorio de microscopía electrónica de la facultad de ciencias de la UNAM (Vázquez Echeverría, 2003, Vázquez Echeverría et al. 2009), lo que corresponde a la presencia del nucléolo en el trofozoíto de *E. histolytica*.

## X. LITERATURA CITADA

Albach, R.A., Booden, T., Boonlayangoor, P. & Downing, S. Entamoeba histolytica: autoradiographic analysis of nuclear sites of RNA synthesis. *Exp. Parasitol.* **42**:248-259 (1977).

Alberts, B. et al. *Molecular Biology of The Cell*, 4a ed. Garland Sciences. Nueva York (2002).

Bernard W. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *Journal of Ultrastructural Research.* **27**, 250-265 (1969).

Bonnell d. A, "Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy" 2nd ed. Ed. Wiley-VCH 2001.

Brown H., Neva F., *Parasitología clínica*. Nueva Editorial Interamericana, 5ª ed. Mexico, 1985.

De Robertis H. et al. *Fundamentos de Biología Celular y Molecular*. 4a ed. El Ateneo. Argentina (2004)

El-Hashimi, W. & Pittman, F. Ultrastructure of Entamoeba Histolytica trophozoites obtained from the colon and from in vitro cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **19**:215-226 (1970).

González M.C., Uribe J.C., 2005, *Microscopio de Fuerza Atómica, Encuentro de Investigación en Ingeniería Eléctrica*,

[http://www.uaz.edu.mx/cippublicaciones/eninvie2K5/l\\_1%5CI\\_2MicroscopioFA.pdf](http://www.uaz.edu.mx/cippublicaciones/eninvie2K5/l_1%5CI_2MicroscopioFA.pdf)

<http://co.water.usgs.gov/trace/pubs/wrir-99-4279/> (Abril 26, 2011)

Guerrera C.G A. et. al. Atomic Force Microscopy as a Tool for Biomedical and Biotechnological Studies. *Artificial Organs.* **27**(5):447-451 (2003).

Jackson J.D. "Classical Electrodynamics, John Wiley and sons, New York, 1998.

Jiménez-García, L.F. et al. Electron microscopy localization of ribosomal DNA in rat liver nucleoli by non-isotopic in situ hybridization. *Exp. Cell Res.* **207**, 220-225 (1993).

Jiménez-García, L.F. et al. Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. *Int. J. Parasitol.* **38**:1297-1304 (2008).

Joshi N.V., Medina H., Berrueta, L. *In vivo* nanoimaging and ultrastructure of *Entamoeba histolytica* by using atomic force microscopy. *Experimental parasitology* **93**:95-100 (1999).

Kucik C.J., Martin G.L., Sortor B.V. Common intestinal parasites. *Am Fam Physician.* **69**(5):1161-1168 (2004)

De Robertis H. et al. *Fundamentos de Biología Celular y Molecular*. 4a ed. El Ateneo. Argentina (2004)

López-Velázquez, G. et al. Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc. Microanal.* **11**:293-299 (2005).

Martinez-Palomo, A., Espinosa, C. M. "Intestinal Amoe- bace". *International Amoeba Microbiology and Microbial Infections*: **5**:157–177 (1998)

Miller J.H., Swartzwelder J.C., Deas, J.E. A electron microscopic study of *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol.* **47**:577-587 (1961).

Pinilla A. E., Lopez M. C., Viasus D.F. Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. *Rev Med Chile.* **136**:118-124 (2008).

Petri W., Rashidul Haque R., Kress K., Wood S., Jackson T.F.H.G., Lyerly D., Wilkins T. Diagnosis of Pathogenic *Entamoeba histolytica* Infection using a Stool ELISA Based on Monoclonal Antibodies to the Galactose-Specific Adhesin. *J Infect Dis.* **167**(1):247-249 (1993)



Pumarola A., et. Al. Microbiología y Parasitología Medica. Edicione Cientificas y Tecnicas, 2<sup>a</sup> ed. Bafcelona, Espana, 1991

Raska, I., Shaw, P.J. & Cmarko, D. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. Curr. Opin. Cell Biol. **18**:325-334 (2006).

Romero r. Microbiología y Parasitología Humana. Editorial Medica Panamericana, Mexico D.F., 1993.

Scheer, U., Weisenberger D. The Nucleolus. Current Opinion in Cell Biology, **6**:354-359 (1994).

Size S. M. "Physics of Semiconductor Devices" John Wiley and sons, New York, 1981

Smetana K. Basic histochemical ad cytochemical methods. In: Methods i Cancer Research (Busch H. Ed.). Academic Press Inc. Nueva York. Vol II (1967).

Vazquez- Echeverria, C. El nucleolo de la amiba *Entamoeba histolytica*. Tesis licenciatura. Fac. Ciencias, UNAM. 1-63 (2003)

Vazquez- Echeverria, C. et al. Evidencia ultraestructural del nucléolo de *Entamoeba histolytica*. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, **12**(1):34-37 (2009)

Visitin R., Amond A. The nucleolus: The magician's for cell cycle tricks. Current Opinion in Cell Biology **12**:371-377 (2000).

Zangwill A. "Physics at Surfaces" Cambridge University Prees, Cambridge, UK, 1988