



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

ASOCIACIÓN PROFESIONAL PARA LA CAPACITACIÓN CONTINUA

*Título de la tesina*

**DIFERENCIACIÓN MORFOLÓGICA DE AMEBAS INTESTINALES**

TESINA

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

PRESENTA

SANDRA MARIBEL GÓMEZ LÓPEZ

ASESOR

Q.F.B. ROSA ELENA TORRES RUIZ

Morelia, Michoacán de Ocampo. Enero 2013

LA PRESENTE INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA SE REALIZÓ DURANTE EL DIPLOMADO TEÓRICO PRÁCTICO DE PARASITOLOGÍA CLÍNICA, ORGANIZADO POR LA ASOCIACIÓN PROFESIONAL PARA LA CAPACITACIÓN CONTÍNUA (APCC) Y AVALADO POR LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO A TRAVÉS DE LA FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA, A QUIÉN LE AGRADECEMOS INFINITAMENTE EL APOYO ACADÉMICO Y LOGÍSTICO BRINDADO.

## ÍNDICE

	PÁGINAS
RESUMEN	4
1 INTRODUCCIÓN	5
2 JUSTIFICACIÓN	6
3 OBJETIVOS	6
4 DESARROLLO	7
4.1 <i>Entamoeba histolytica</i>	7
4.2 <i>Entamoeba dispar</i>	12
4.3 <i>Entamoeba coli</i>	15
4.4 <i>Entamoeba hartmanni</i>	17
4.5 <i>Entamoeba polecki</i>	20
4.6 <i>Entamoeba moshkovskii</i>	21
4.7 <i>Endolimax nana</i>	24
4.8 <i>Iodamoeba butschlii</i>	26
5 RESULTADOS	28
6 DISCUSIÓN	30
7 CONCLUSIONES	31
8 BIBLIOGRAFÍA	32
9 GLOSARIO	35
ÍNDICE DE ANEXOS	
ANEXO I TABLA DE DIFERENCIACION MORFOLÓGICA	36
ANEXO II DIAGRAMAS	40

## RESUMEN

La amebiasis puede ser considerada la enfermedad más agresiva del intestino humano, es la cuarta causa de muerte y la tercera causa de morbilidad debido a infecciones por protozoos en todo el mundo, lo que resulta en ~ 70.000 muertes al año.

*Entamoeba histolytica* es la ameba intestinal que se reconoce como patógeno, mientras que otras especies de amebas, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. hartmanni*, *E.coli*, *E. polecki*, *Endolimax nana* y *Iodamoeba butschlii* se considera no patógenos.

La dificultad que se presenta para diferenciar las amebas intestinales, es su variación en forma y tamaño, dentro de cada una de las especies, e incluso tamaños que coinciden dentro de los diferentes rangos. En el caso de *Entamoeba histolytica* su similitud con *Entamoeba dispar* es muy parecida, hay una diferenciación que marca una de la otra, *Entamoeba histolytica* fagocita eritrocitos a diferencia de *Entamoeba dispar*, en ocasiones esto no marca la diferencia, pero la primera es invasiva a diferencia de la segunda que es no invasiva. El examen de las muestras de heces es el más eficaz medio de diagnóstico de la infección intestinal. Una prueba directa examinada, ya sea como una preparación en fresco o fijas y teñidas. Por lo general revelan las infecciones graves. Aun así, exámenes repetidos pueden ser necesarios.

Debido a la gran similitud de estas dos amebas, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la única que evita confusión en la identificación de *E. histolytica*. Lamentablemente esta técnica es muy costosa y actualmente no es accesible para los lugares en donde la enfermedad se presenta con mayor frecuencia. En otras amebas su forma y tamaño marcan una pequeña diferencia tales como *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba moshkovskii*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba bütschlii*. Estas son no patógenas y algunas son comensales.

## 1. INTRODUCCIÓN

La amebiasis puede ser considerada la enfermedad más agresiva del intestino humano, responsable en su forma invasiva de los síndromes clínicos, que van desde el clásico de la disentería colitis aguda a la enfermedad extra-intestinal, con énfasis en la amebiasis hepática, inadecuadamente llamado absceso hepático amebiano (Salles JM, 2003). Es la cuarta causa principal de muerte y la tercera causa de morbilidad debido a infecciones por protozoos en todo el mundo, lo que resulta en ~ 70.000 muertes al año (A Debnath, 2012). Encontrado en todo el mundo, con una alta incidencia en la India, las regiones tropicales de África, México y otras áreas de América Central, se ha informado con frecuencia en la Amazonia (Salles, 2003). Los seres humanos pueden ser parasitados por varias especies de amebas intestinales. *Entamoeba histolytica* es la ameba intestinal que se reconoce como patógeno, mientras que otras especies de amebas, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. hartmanni*, *E.coli*, *E. polecki*, *Endolimax nana* y *Iodamoeba butschlii* se considera no patógenos (Sard *et al.*, 2011).

La dificultad que se presenta para diferenciar las amibas intestinales, es su variación en forma y tamaño, dentro de cada una de las especies, e incluso tamaños que coinciden dentro de los diferentes rangos; por ejemplo, se ha considerado como característica muy importante la presencia de eritrocitos fagocitados, para el diagnóstico de una parasitación por *Entamoeba histolytica*; aunque muchas veces esta no se encuentra, cuando existe es muy sencillo realizar el diagnóstico (de Haro *et al.*, (s.f)).

Las amebas tiene dos fases de desarrollo: una trófica o vegetativa (durante la que se forma el trofozoíto), y otra quística o de resistencia (durante la que aparece el quiste). Los trofozoítos viven en el intestino grueso del huésped, se movilizan por pseudópodos y se multiplican por fisión binaria. En su camino hacia el exterior, se divide en formas más pequeñas, dejan de alimentarse y se rodean de una pared delgada y resistente para transformarse en quistes (Acha *et al.*, 2003).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La amebiasis es un tema de interés en la actualidad, por la frecuencia de estas infecciones surge el deseo de realizar un estudio para diferenciar las amebas intestinales. Aproximadamente 50 millones de personas están infectadas, con 100,000 muertes al año en los países endémicos. La característica morfológica de cada especie en cuanto a su tamaño, núcleo, citoplasma nos llevará a su diagnóstico oportuno y veraz, el cual una vez diagnosticado se le dará un tratamiento. La importancia de esta recopilación bibliográfica es contribuir a la diferenciación de cada especie de ameba intestinal.

## 3. OBJETIVOS

### GENERAL

Sintetizar las principales características morfológicas de las etapas de trofozoíto y quiste de cada ameba como la base para el diagnóstico microscópico preciso para su posterior diferenciación, antecedentes históricos de cada especie.

### PARTICULARES

Comparación de tablas de la morfología de cada una de las especies de las amebas intestinales, las más representativas *Entamoeba histolytica- dispar*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba moshkovskii*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba butschlii*.

Realizar la diferenciación de cada especie con base al tamaño nuclear y estructura.

## 4. DESARROLLO

### 4.1 *Entamoeba histolytica*

El género *Entamoeba* contiene muchas especies, de los cuales seis (*Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba coli* y *Entamoeba hartmanni*) residen en el lumen intestinal humano (Fotedar R *et al.*, 2007).

*Entamoeba histolytica*, abarca desde los tiempos remotos cuando no fue reconocido como una causa de enfermedad humana hasta los avances moleculares recientes. Feder Losch (1875) en San Petersburgo, encuentra las amebas en muestras fecales, pero sólo se considera como responsable de mantener el proceso inflamatorio, no como una causa de la disentería.

Fritz Schaudinn (1903) estableció la diferenciación entre *Entamoeba histolytica* y *E. dispar*, Schaudinn decidió llamarlo *E. histolytica* debido a su capacidad de causar la lisis del tejido. Emile Brumpt (1925) sobre la base de estudios experimentales, señaló la existencia de *E. histolytica* como un complejo de especies, que comprende dos especies morfológicamente indistinguibles, *E. disentería*, que es la causa de la infección sintomática, y *Entamoeba dispar* se encuentra sólo en los portadores asintomáticos.

Sargeant y Williams (1978) distinguieron por primera vez las cepas de *E. histolytica* mediante electroforesis de isoenzimas, lo que confirma que la *E. histolytica* era en realidad un complejo de especies que comprende tanto especies patógenas y no patógenas. Guillermo Petri (1987) demostró que la proteína de 170 kDa con mayor antigenicidad fue el Gal / lectina GalNac específico. Diamond y Clark (1993) describen una vez más originales la hipótesis, concluyendo que no había suficientes pruebas para apoyar la existencia de dos especies morfológicamente indistinguibles, una patógena y no patógena, correspondiente a

la *E. histolytica* y *Entamoeba dispar*, respectivamente. La Organización Mundial de la Salud aceptó esta hipótesis en 1997.

Las especies de *Entamoeba* poseen un núcleo vesicular que tiene un endosoma pequeño en o cerca del centro. Los gránulos de cromatina están dispuestos alrededor de la periferia del núcleo y, en algunas especies, también en todo el endosoma. El citoplasma contiene una variedad de vacuolas alimentarias, a menudo con partículas de alimento que se digieren, por lo general las bacterias o granos de almidón. En el nivel ultra estructural, la membrana externa posee una “capa difusa”, y contiene en su citoplasma numerosas vesículas. Curioso, pequeños cuerpos cilíndricos se pueden ver ampliamente distribuidos en el citoplasma de algunos trofozoítos. Estos órganos son de 0.3 a 10 micras de longitud, contienen hasta 40 ribonucleoproteínas distintas, y se cristalizó en cuerpos cromáticos o barras (Roberts *et al.*, 2009).

El intestino grueso humano puede albergar dos amebas morfológicamente similares; la invasiva *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* no invasiva.

Considerando que la *Entamoeba histolytica* puede producir lesiones intestinales y extra-intestinales, *Entamoeba dispar* está presente en portadores no sintomáticos.

Aunque los estudios bioquímicos, genéticos y proteómicos han identificado claras diferencias entre estas *Entamoebas*, ha quedado claro que varias moléculas, una vez asumidas a estar involucradas en la destrucción de tejidos, existen tanto en la virulencia y la especie no virulenta. Como moléculas de la superficie pueden jugar un papel en la invasión y por lo tanto podrían determinar que las amebas son invasivas, se analizó la composición glicoconjugado de *E. histolytica* y *E. dispar* utilizando lectinas.

Hubo una diferencia significativa entre *E. histolytica* y *E. dispar* en la expresión de glicoconjugado que contienen residuos de D-manosa y N-acetil-alfa-D-galactosamina, pero no entre cepas virulentas y no virulentas de *E. histolytica*. N-terminal de glicoconjugado con alfa (1-3) residuos de manosa participa en la adhesión y citotoxicidad posterior de *E. histolytica* a los hepatocitos de hámster cultivadas. Uno de ellos es probablemente la lectina Gal / GalNAc (Pacheco-Yépez *et al.*, 2009).

*Entamoeba histolytica* tiene un ciclo de vida de dos etapas: una etapa de un quiste infeccioso, y una etapa de trofozoítos invasivo (Ali lk *et al.*, 2012).

El protozoario intestinal *Entamoeba histolytica* es la causa de la colitis amebiana potencialmente fatal y abscesos hepáticos. Trofozoítos de *E. histolytica* colonizan el colon, donde inducen la inflamación, penetran en la mucosa, y altera el sistema inmune del huésped (Cobo ER *et al.*, 2012).

## ASPECTOS MORFOLÓGICOS

### TROFOZOÍTOS NO TEÑIDOS

Cuando se observa esta forma del parásito en preparaciones hechas con materias fecales recientemente emitidas (frescas), sin teñir, se verá que es una célula de dimensiones variables cuyas medidas fluctúan entre 10 y 60  $\mu\text{m}$  de diámetro, con forma irregular y movimiento característico, mediante la emisión de pseudópodos rápidos y explosivos, digitiformes, largos y anchos. En su citoplasma se observa marcada diferencia entre el ectoplasma que es hialino y transparente y el endoplasma que tiene que tiene gran cantidad de inclusiones, por lo que es granuloso con aspecto de vidrio molido, característica que se acentúa más si se usa contraste de fases en el microscopio.

## PREQUISTE

Cuando las condiciones del medio ambiente en que se mueve el trofozoíto (intestino grueso) son poco favorables para su vida, u otras causas no bien determinadas aun, éste empieza a inmovilizarse, elimina todo el material intracitoplásmico que no ha digerido, se redondea, se reviste de una doble membrana gruesa y refrigerante, la cual le confiere resistencia al parasito cuando se expone a las condiciones del medio ambiente externo al ser expulsado con las materias fecales, en este momento el prequiste presenta un solo núcleo con las características morfológicas ya descritas, además de presentar una masa de glucógeno en una vacuola y barras cromatoidales.

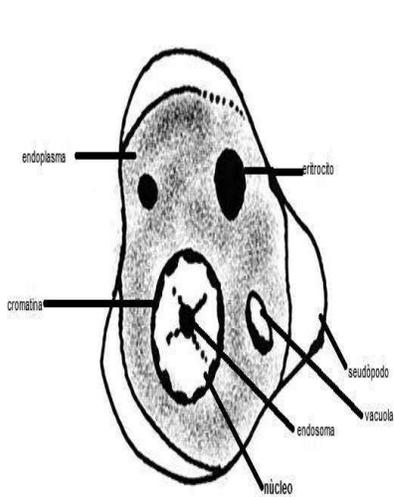
## QUISTE

Es la forma infectante de *Entamoeba histolytica*. A medida que el tiempo transcurre, en el interior del prequiste habrá gran actividad, el núcleo se divide en dos y luego en cuatro, quedando al final del proceso de maduración el quiste maduro que tiene cuatro núcleos pequeños con características morfológicas iguales a las del trofozoíto recubre de un pared quística resistente y miden de 2 a 20  $\mu\text{m}$ .

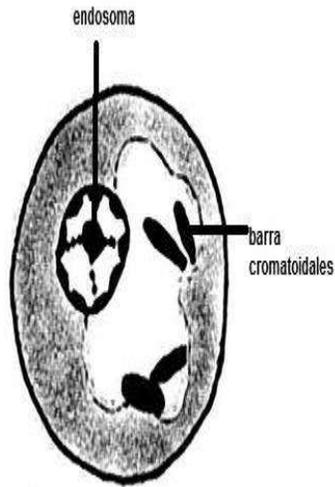
Durante la maduración del quiste, desaparece el glucógeno y las barras cromatoidales se hacen poco visibles o desaparecen. Cuando los quistes maduros se tiñen con lugol (solución yodo-yodurada) que comúnmente se emplea en la observación microscópica de materia fecal en los exámenes coproparasitológicos (CPS), el glucógeno se colorea de amarillo oscuro y si no se sobretiñen por el lugol, se podrá ver con claridad los núcleos cada uno con su endosoma central y cromatina periférica regularmente distribuidas, la que aparecerá como puntos brillantes de la luz contra el fondo amarillo del nucleoplasma (Lara., 2002).

*Entamoeba histolytica*

Trofozoíto



Prequiste



Quiste

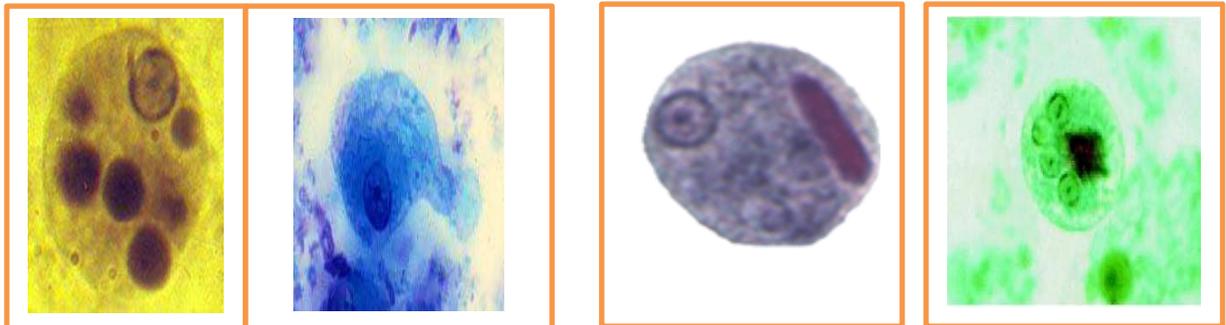
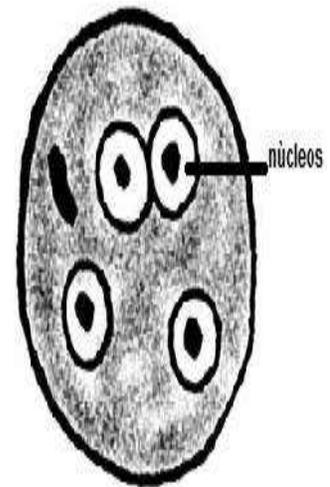


FIG.-1.1 *Entamoeba histolytica*, trofozoíto, prequiste y quiste (forma infectante).

## 4.2 *Entamoeba dispar*

*Entamoeba dispar* varía en su impacto clínico y es un caso especial entre varias especies de *Entamoeba* que puede resultar en una colonización inofensiva del intestino o puede progresar a una invasión de la pared del colon y el daño a los tejidos del huésped tales como el hígado, pulmón y cerebro (amebiasis).

A menudo un diagnóstico clínico de la amebiasis por *Entamoeba* puede ser confirmado y por lo general depende de la visualización de los parásitos mediante microscopía de luz, ya sea para una prueba de un frotis húmedo o manchado. *E. coli*, *E. dispar*, *E. histolytica* y *E. hartmanni* se pueden diferenciar por el tamaño de comparativas y menores diferencias registradas morfológicas.

### ASPECTOS MORFOLÓGICOS

#### TROFOZOÍTO

La morfología de los trofozoítos de *E. dispar* es similar a la de *E. histolytica* va desde aproximadamente 10 a 60  $\mu\text{m}$  y es indistinguible de *E. histolytica* en preparaciones frescas. El citoplasma es finamente granular y pueden contener bacterias ingeridas. Un solo núcleo tiene un patrón que consiste en cromatina nuclear similar a perlas de un collar. El cariosoma es pequeño y es la motilidad ubicada en el centro y se demuestra por el movimiento direccional y progresivo.

#### QUISTE

El quiste oscila entre 10 a 20  $\mu\text{m}$  y el quiste maduro contiene cuatro núcleos, mientras que en quistes inmaduros contiene menos que cuatro núcleos, del género *Entamoeba* se caracteriza por la cromatina periférica organizada de manera uniforme alrededor del núcleo, y esto no es cierto de cualquier otro género de las amebas.

El cariosoma es extremadamente pequeño situado en el centro. Vacuolas de glucógeno puede verse en los quistes inmaduros, pero no son propensos a ser observados en los quistes maduros. Una barra alargada cromatoide suavemente redondeada y de extremos romos que a veces da lugar a cierta confusión con *E. histolytica* (Ridley, 2012).

El examen de las muestras de heces es el más eficaz medio de diagnóstico de la infección intestinal. Una prueba directa examinada, ya sea como una preparación en fresco o fijadas y teñidas. Por lo general revelan las infecciones graves. Aun así, exámenes repetidos pueden ser necesarios (Roberts *et al.*, 2009).

Debido a la gran experiencia que debe tener el laboratorista clínico para identificar entre todas a *E. histolytica*, y a la gran similitud morfológica que existe entre *E. histolytica* y *E. dispar*, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la única que evita confusión en la identificación de *E. histolytica*. Desafortunadamente, esta tecnología es costosa y actualmente no es accesible para los lugares en donde la enfermedad se presenta con mayor frecuencia. Por lo anterior, es necesario el desarrollo de pruebas diagnósticas de bajo costo que identifiquen al parásito de manera específica; para esto, la disponibilidad actual de la secuencia del genoma completo de *E. histolytica* será de gran ayuda (Olivos *et al.*, 2011).

El examen de las muestras de heces es el más eficaz medio de diagnóstico de la infección intestinal. Una prueba directa examinada, ya sea como una preparación en fresco o fijadas y teñidas. Por lo general revelan las infecciones graves. Aun así, exámenes repetidos pueden ser necesarios (Roberts *et al.*, 2009)

*Entamoeba dispar*

Trofozoíto

prequiste

quiste

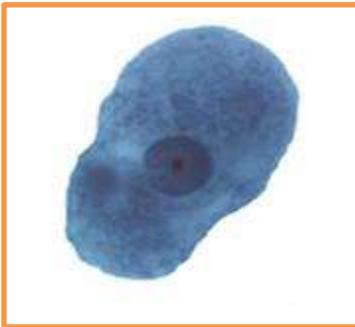
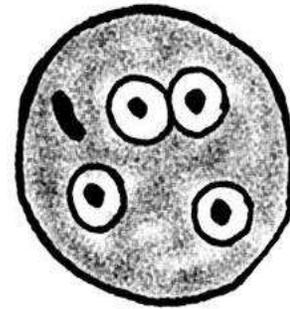
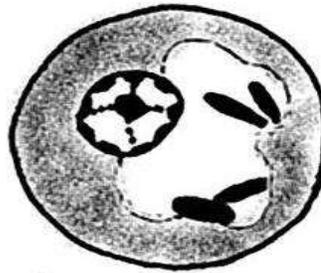
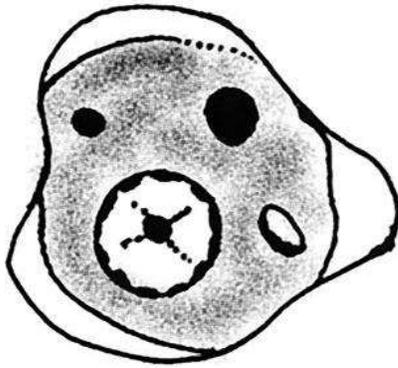


FIG.-1.2. *Entamoeba dispar*, trofozoíto, prequiste y quiste.

### 4.3 *Entamoeba coli*

Es el comensal más frecuente del intestino grueso del hombre, y su forma trofozoítica generalmente se confunde con *Entamoeba histolytica*.

Ameba no patógena, el promedio del tamaño es un poco mayor que *Entamoeba histolytica*, y el quiste generalmente posee más núcleos, es necesario considerar todas las demás características morfológicas para hacer un diagnóstico correcto. Este comensal se encuentra distribuido en todo el mundo. En México parece ser más abundante que *Entamoeba histolytica*, tiene forma de trofozoíto y forma quística.

#### ASPECTOS MORFOLÓGICOS

##### TROFOZOÍTO

En preparaciones al fresco se le observa de 15 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro, se aprecia como una masa ameboidea incolora, con citoplasma viscoso y granuloso, no se distingue el ectoplasma del endoplasma, difícilmente se ve el núcleo, la emisión de pseudópodos es lenta y estos son anchos y cortos, sin que se observe desplazamiento del rizópodo. Cuando se tiñe con hematoxilina férrica, se puede observar un delgado ectoplasma hialino y el resto del parasito formado por endoplasma granuloso conteniendo muchas vacuolas digestivas con bacterias dentro. El núcleo es redondeado y presenta por dentro en su membrana gránulos de cromatina irregulares en tamaño y disposición, observándose un cariosoma granular de situación excéntrica; este detalle nos permite identificar con rapidez este protozoario.

##### PREQUISTE

El prequiste, forma que aparece en el momento en que el medio ambiente se le hace adverso, presenta en su interior una gran vacuola glucogénica y dos núcleos en la periferia del ectoplasma (Atias.,2001).

Es redondeado u oval, tiene un solo núcleo y membrana refringente que llega a alcanzar hasta 0.5  $\mu\text{m}$  de grosor. Los quistes inmaduros pueden tener de uno a cuatro núcleos y los maduros ordinariamente ocho pequeños núcleos con las características señaladas, pudiéndose observar quistes con 16 y hasta 32 núcleos. Las barras cromatóides tienen extremidades desgarradas.

### QUISTE

Generalmente posee ocho núcleos y es de mayor tamaño que el de *Entamoeba histolytica* (25  $\mu\text{m}$ ) con gran cantidad de inclusiones citoplasmáticas. Las características nucleares son similares a las del trofozoíto (Atias., 2001).

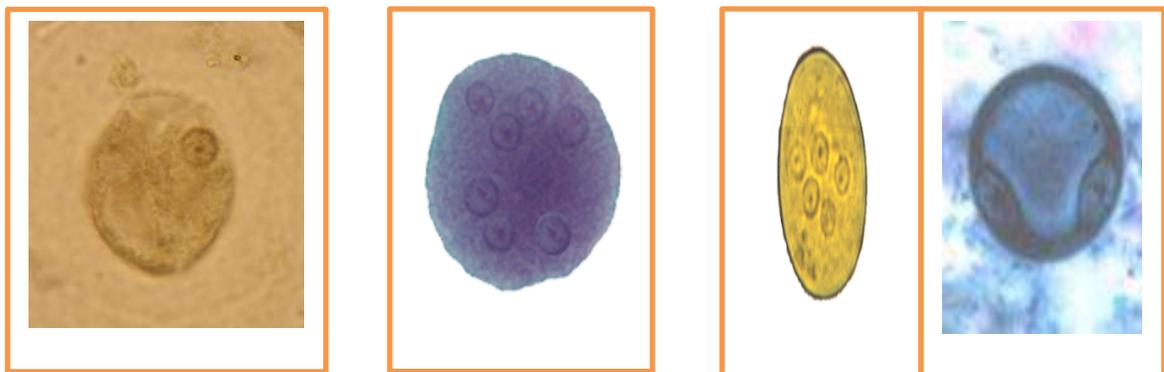
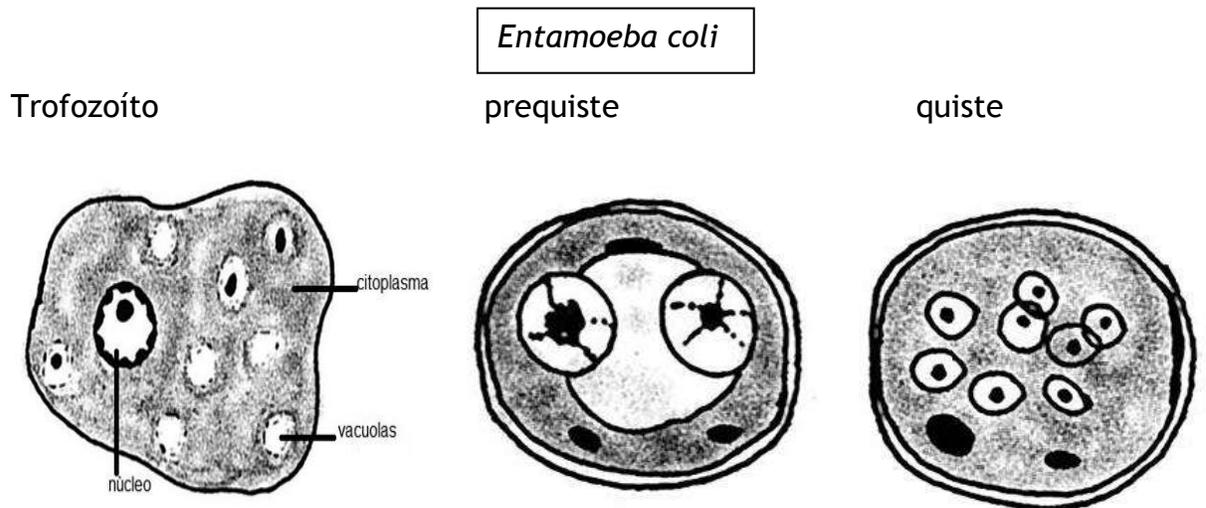


FIG.-1.3. *Entamoeba coli*, trofozoíto, prequiste y quiste.

#### 4.4 *Entamoeba hartmanni*

Otras de las ideas que crearon incertidumbre en el conocimiento de *E. histolytica* fue el concepto de raza pequeña y grande. Von Prowazek, en 1912, descubrió una ameba intestinal con quistes de 6 a 8  $\mu\text{m}$  de diámetro a la cual denominó *E. hartmanni*; Kuenen y Swellengrebel en 1917 y Brugg en 1918, describieron las especies *E. tenuis* y *E. minutissima*, respectivamente, las cuales fueron consideradas posteriormente como sinónimos de *E. hartmanni* por los mismos autores.

Smith, en 1918, construyó una curva de distribución del tamaño de 1000 quistes obtenidos de 30 casos y obtuvo una curva bimodal con picos en 7,1  $\mu\text{m}$  y 12,2  $\mu\text{m}$  y concluyó que los quistes de esta especie la dividían en dos razas que diferían sólo en tamaño. Dobell, en 1919, concluyó que el tamaño de los quistes de *E. histolytica* variaba de 5 a 20  $\mu\text{m}$ , dependiendo de la raza, y relegó a *E. hartmanni* como sinónimo de *E. histolytica*; lo mismo hizo Wenyon en 1926. Este concepto, conocido como la teoría “unicista”, promulgado por estos dos últimos eminentes autores facilitó que el mundo de habla inglesa se adhiriera a esta idea.

Los “pluralistas” quedaron prácticamente confinados al continente europeo. Brumpt, en 1949, reafirmó el rango de especie de *E. hartmanni*, la cual fue aceptada por otros autores. Los estudios estadísticos de Saperó y col. en 1942, demostraron la existencia de dos poblaciones de quistes de tamaños diferentes. Burrows, en 1957 y 1959, realizó estudios morfológicos de la ameba y consideró que se puede diferenciar de *E. histolytica* por el menor tamaño de sus trofozoítos y quistes. A pesar de la clara demostración de la existencia de dos poblaciones de quistes con diferentes tamaños, no fue sino hasta la publicación de estudios morfológicos por Burrows, estudios de cultivo por Freedman y Elsdon-Dew y los resultados de inmunofluorescencia de Goldman y col. que demostraron diferencias entre las dos especies que *E. hartmanni*, originalmente descrita por von Prowazek en 1912, fue aceptada (Chacin-Bonilla, 2010).

Faust (1958) informó detalladamente acerca de las diferencias morfológicas observadas entre las “razas” grande y pequeña de *E. histolytica* y afirmó que los dos tipos de amebas eran claramente distintos y fácilmente reconocibles por determinados aspectos morfológicos que permanecían constantes. Sin embargo, este autor les dio el rango de subespecie en vez de especie y las denominó *E. histolytica* y *E. histolytica hartmanni*, respectivamente.

*E. hartmanni* recuerda *E. histolytica* en todas sus fases de su ciclo vital, salvo por su tamaño, e incluso a este respecto existe cierto solapamiento de ambas.

## ASPECTOS MOROLÓGICOS

### TROFOZOÍTO

En cuanto a su tamaño se parece más a *Endolimax nana*, y cuando se ve en preparaciones frescas no teñidas o teñidas con contrastes yodados sus quistes pueden ser indistinguibles de los de las formas esféricas de *Endolimax nana*. El diámetro de los trofozoítos va desde aproximadamente 4 hasta 12  $\mu\text{m}$  y el de los quistes, de 5 a 10  $\mu\text{m}$ .

Los trofozoítos no ingieren hematíes, su movilidad suele ser menos intensa que la de *E. histolytica*. El núcleo, similar al de *E. coli* por el carácter de su cromatina y su cariosoma, no es evidente a veces en las preparaciones teñidas con yodo pero se ve claramente en los frotis fecales teñidos con contrastes permanentes.

### QUISTE

Los quistes tiene un citoplasma bastante grumoso similar al de *E. coli*. Los quistes inmaduros, con 1 o 2 núcleos, suelen tener una masa de glucógeno bien delimitada y de varias a numerosas barras cromatoidales cortas y con extremos adelgazados (en forma de grano de arroz) o finos y en forma de barra. Los quistes son

esféricos, diminutos, incluso en los quites maduros con 4 núcleos (Chester *et al.*, 2003).

*Entamoeba hartmanni*

Trofozoíto

Prequiste

Quiste

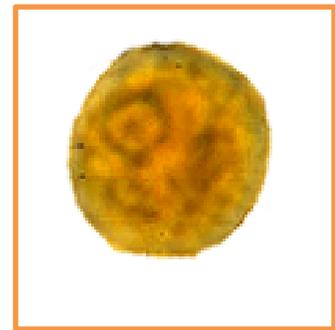
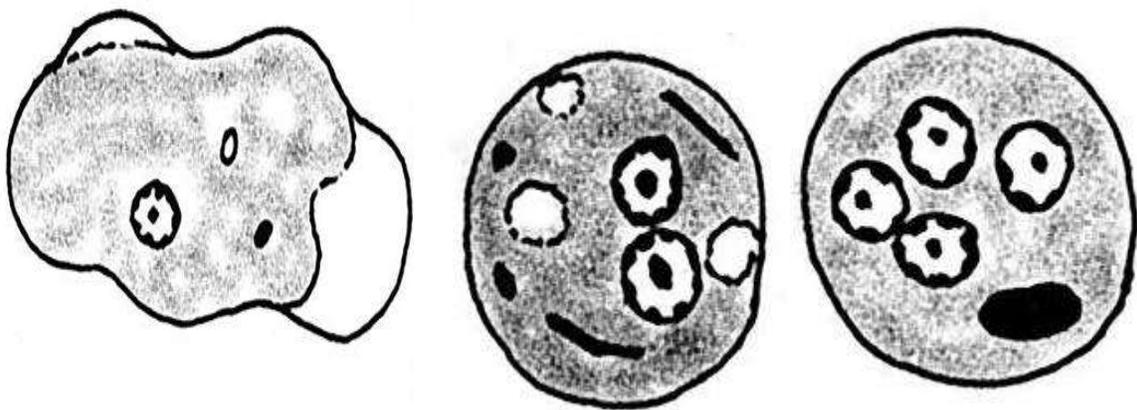


FIG.-1.4. *Entamoeba hartmanni*, trofozoíto, prequiste y quiste.

#### 4.5 *Entamoeba polecki*

La especie *Entamoeba polecki* fue aislada en 1912 de cerdos y cabras, y fue identificada ocasionalmente en el hombre (Acha *et al.*, 2003). Este parásito protozoario es esencialmente no patógeno para el ser humano, pero es morfológicamente similar a la ya menudo confundida con *E. histolytica*, una especie patógena. Por lo tanto, es muy importante en el diagnóstico de laboratorio para diferenciar la primera de la segunda (Kuroki *et al.*, 1989).

La identificación de *Entamoeba polecki* se hace en preparaciones coloreadas de hematoxilina férrica o coloración tricrómica (Botero *et al.*, 2012).

#### ASPECTOS MORFOLÓGICOS

##### TROFOZOÍTO

En preparaciones frescas el trofozoíto se asemeja al de *E. coli* en su viscosidad y lentitud de movimientos, de 10 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro (Chester *et al.*, 2003).

##### QUISTE

Típicamente unicelular, contiene unos corpúsculos ovoides de inclusión, de 5 a 11  $\mu\text{m}$  (Chester *et al.*, 2003). No hay indicios de que sea patógeno en los huéspedes reservorios ni en el hombre.



FIG.-1.5. *Entamoeba polecki*, trofozoíto y quiste.

#### 4.6 *Entamoeba moshkovskii*

*Entamoeba moshkovskii* es frecuente en los países en desarrollo y morfológicamente indistinguibles de los patógenos *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* no patógena. No se sabe si es patógeno (shimokawac *et al.*, 2012).

Estudios recientes han reportado la presencia de *E. moshkovskii* en humanos de diferentes naciones, tales como Estados Unidos, Italia, Irán, Turquía, Bangladesh, India y Australia.

La posición taxonómica de *E. moshkovskii* todavía no se conoce con exactitud; parece ser un complejo de por lo menos dos especies. Este parásito ha sido considerado como un comensal. Sin embargo, estudios recientes en India y Bangladesh lo han identificado como el único probable enteropatógeno potencial en pacientes con manifestaciones gastrointestinales, incluyendo la disentería. Sin embargo, no se sabe si estos pacientes tenían otros agentes bacterianos o virales que fueran patógenos. Se necesitan más estudios para determinar si esta ameba es patógeno potencial (Chacin-Bonilla, 2010).

Durante la última década se ha convertido a *Entamoeba moshkovskii* en relevante, dada su capacidad de infectar a los humanos, especialmente cuando se considera que es morfológicamente indistinguible de *E. histolytica*.

Durante mucho tiempo, *E. moshkovskii* fue considerada como una ameba de vida libre, pero en la última década se ha demostrado que *E. moshkovskii* puede infectar a los humanos y se pueden encontrar con mayor frecuencia en regiones donde la amebiasis muestra valores de alta prevalencia, convirtiéndose en un reto para diferenciarla de *E. histolytica* / *E. complejo dispar*.

Recientemente se han realizado estudios que plantean la posibilidad de que *E. moshkovskii* podría ser una especie patógena, ya que hay informes de diferentes países que asociados a esta infección con síntomas gastrointestinales, aunque otros lo han descrito como una especie no patógena. Por estas razones, los estudios clínicos y epidemiológicos son necesarios (Heredia *et al.*, 2012).

*Entamoeba moshkovskii*

Trofozoíto

Prequiste

Quiste

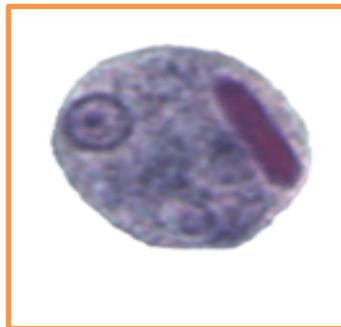
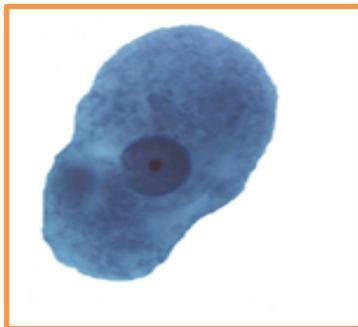
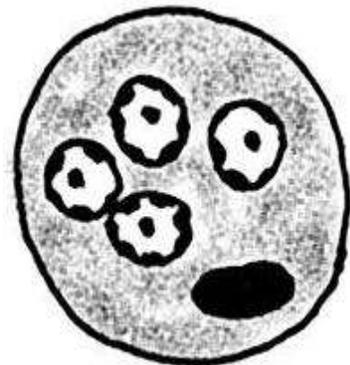
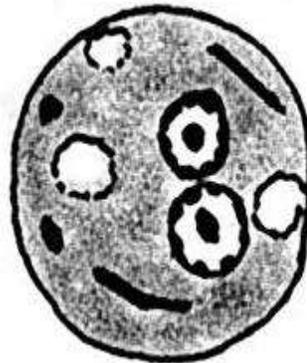
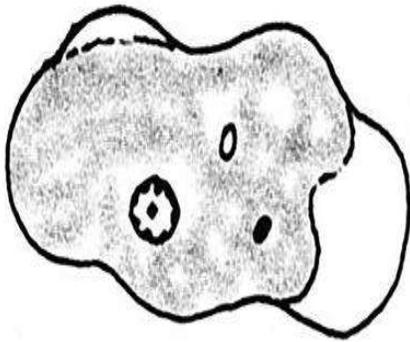


FIG.-1.6. *Entamoeba moshkovskii*, trofozoíto, prequiste y quiste.

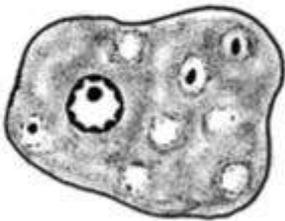
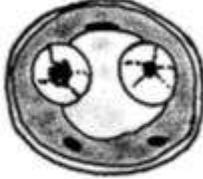
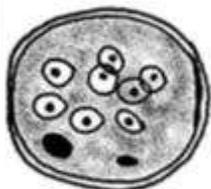
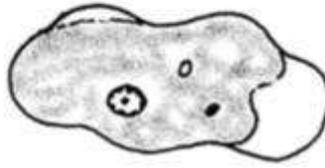
ORGANISMO	TROFOZOITO	PREQUISTE	QUISTE
<i>E. histolytica</i> <i>E. dispar</i> <i>E. moshkovskii</i>			
<i>E. coli</i>			
<i>E. hartmanni</i>			

Tabla 1. Dibujo intestinal *Entamoeba* spp. Que muestra las características morfológicas.

Mehmet Tanyuksel, William A. Petri, Jr., 2003

#### 4.7 *Endolimax nana*

Numerosas especies de este género se han descrito en huéspedes vertebrados e invertebrados. La característica más importante de este grupo es el núcleo vesicular que contiene un gran cariosoma de aspecto irregular (Atias., 2001).

#### ASPECTOS MORFOLÓGICOS

##### TROFOZOÍTO

Es una fina ameba de unos 6 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, aunque casi nunca rebasa los 10  $\mu\text{m}$ ; el ectoplasma lo constituye una delgada capa que rodea al endoplasma granular; en preparaciones en fresco esta fase emite pseudópodos cortos y de movimiento brusco, aunque su desplazamiento es lento, motivo por el cual adopta su nombre (de términos que significan “enano, interno y lento”). Su núcleo es pequeño con un endosoma grande ubicado en el centro o cercano a la periferia de la membrana nuclear; en esta zona la cromatina marginal está dispuesta de manera fina. Es frecuente encontrar vacuolas alimenticias. La forma del prequiste secreta una pared y algunas veces pueden reconocerse pequeñas barras cromatoides curvas.

##### QUISTE

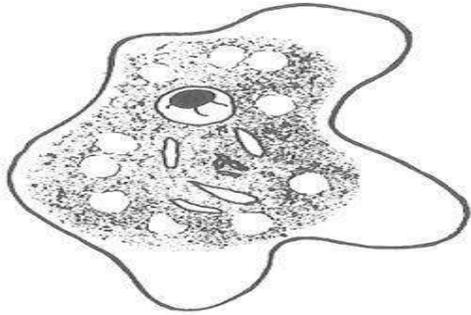
Es ovalado, aunque también los hay esféricos, y miden entre 6 y 12  $\mu\text{m}$ ; teñido de lugol, el citoplasma es finamente granular. Sus núcleos refringentes son evidentes, cuatro son las frecuentes, aunque es posible encontrar menos.

En preparaciones sin teñir se pueden confundir con *E.hartmanii*, si se considera el tamaño, y por ello se requiera una tinción permanente para establecer la diferencia y el diagnóstico (flores *et al.*, 2004).

La tinción tricrómica es una tinción sencilla, rápida que diferencia claramente los organelos celulares. Es un método de elección para amibas y flagelados.

*Endolimax nana*

TROFOZOÍTO



QUISTE

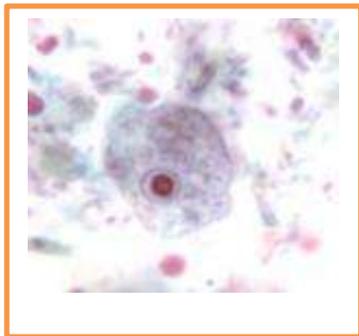
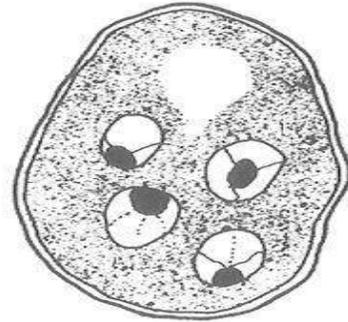


FIG.-1.7. *Endolimax nana*, trofozoíto y quiste.

#### 4.8 *Iodamoeba butschlii*

Su nombre genérico deriva de la constante presencia tanto en el trofozoíto como en el quiste, de una vacuola de glicógeno altamente yodofílica. Su distribución es mundial, pero la prevalencia es menor que *Entamoeba coli* (Atias., 2001).

#### ASPECTOS MORFOLÓGICOS

##### TROFOZOÍTO

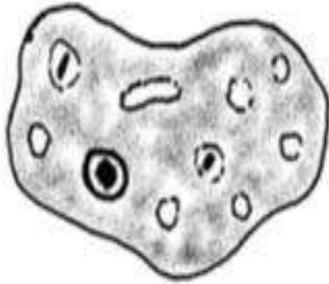
Son generalmente de 9  $\mu\text{m}$  hasta 14  $\mu\text{m}$  de largo, pero puede variar de 4  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$ . Se mueven lentamente a través de cortos pseudópodos. El ectoplasma no está claramente delimitado del endoplasma granular. El núcleo es relativamente grande y vesicular, que contiene un gran endosoma que está rodeado por la ligera tinción de gránulos a medio camino y entre la membrana nuclear. Hebras acromáticas se extienden entre la membrana del endosoma nuclear, que no contiene gránulos periféricos. Las vacuolas generalmente contienen bacterias y levaduras.

##### QUISTE

El prequiste suele ser oblongo y no contiene alimentos sin digerir. Se segrega la pared del quiste, que también suele ser oblonga, midiendo 6  $\mu\text{m}$  a 15  $\mu\text{m}$  de largo. El quiste maduro casi siempre tiene un solo núcleo. Una gran vacuola de glucógeno conspicuo mancha profundamente con yodo, de ahí el nombre genérico (Roberts' *et al.*, 2009).

*Iodamoeba butschlii*

TROFOZOÍTO



QUISTE

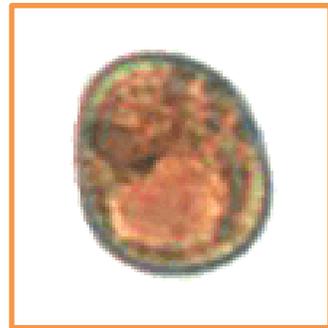
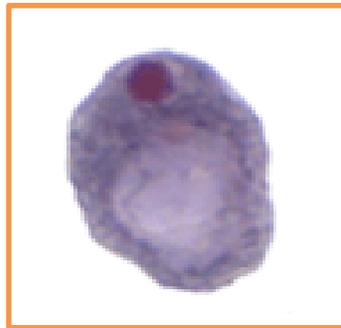
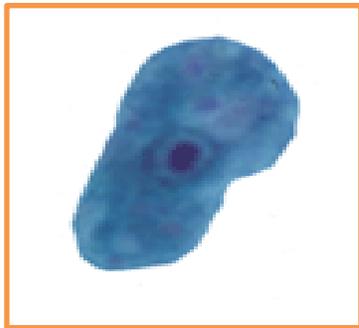
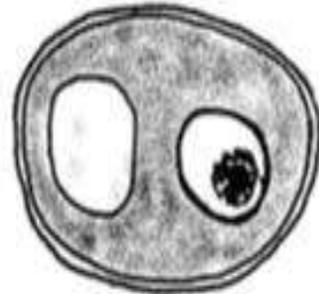


FIG.-1.8. *Iodamoeba butschlii*, trofozoíto y quiste. Mehmet Tanyuksel, William A. Petri, Jr., 2003

## 5. RESULTADOS

Se obtuvo la diferenciación de ocho parásitos de las cuales son: *Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. hartmanni*, *E. coli*, *E. polecki*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba butschlii*.

De acuerdo a diferentes literaturas consultadas se obtuvieron resultados significativos para la diferenciación de cada parasito antes mencionado.

Tay Lara describe a *Entamoeba histolytica*, su trofozoíto como una célula de dimensiones variables cuyas medidas fluctúan entre 10 y 60  $\mu\text{m}$  de diámetro, con forma irregular y movimiento característico, mediante la emisión de seudópodos rápidos y explosivos, digitiformes, largos y anchos. El quiste mide de 2 a 20  $\mu\text{m}$ . Su característica principal es la de fagocitar eritrocitos.

Este es el mismo caso morfológicamente hablando de *Entamoeba dispar* tiene gran similitud con *E. histolytica*, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la única que evita confusión en la identificación descrito en el estudio realizado por olivos en su artículo.

Antonio Atias en su libro diferencia a *Entamoeba coli* con un trofozoíto de 15 a 50  $\mu\text{m}$  y al quiste con un mayor tamaño que *Entamoeba histolytica* (25  $\mu\text{m}$ ) que posee ocho núcleos.

Leonor Chacin Bonilla en su artículo sobre amibiasis describe a *Entamoeba hartmanni* como un trofozoíto con poca movilidad, similar a *E. coli* por el carácter de su cromatina. Chester describe al quiste inmaduro con 1 o 2 núcleos y los maduros con 4 núcleos.

*Entamoeba polecki* tiene similitudes con *E. coli* su trofozoíto oscila entre 10 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro, el quiste de 5 a 11  $\mu\text{m}$ .

*Entamoeba moshkovskii* es indistinguible de los patógenos *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* no patógena, no se encontraron diferencia alguna por la cual no hay datos.

Becerril flores y Romero Cabello describen a *Endolimax nana* con un trofozoíto de 6 a 15  $\mu\text{m}$ , aunque casi nunca rebasa los 10  $\mu\text{m}$  con un quiste de 6 a 12  $\mu\text{m}$ . En preparaciones sin teñir se puede confundir con *E. hartmanni*, si se considera el tamaño, y por ello se requiera de una tinción permanente para establecer la diferencia y el diagnóstico.

*Iodamoeba butschlii* es diferenciado de las demás amebas por Larry S. Roberts describiendo así al trofozoíto de 9 a 14  $\mu\text{m}$  de largo puede variar de 4  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$ , el quiste mide de 6 a 15 pero puede variar de 4  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$  de largo. Esta contiene una gran vacuola de glucógeno el cual es una de sus características de ahí su nombre genérico.

En tamaño y forma quística no influyo la técnica de diferenciación se obtienen los mismos resultados de acuerdo a las tablas anexadas, las técnicas de diferenciación en cuanto a su citoplasma, núcleo y barras cromatoidales afectan a la morfología de cada parásito ya sea teñido con yodo o hematoxilina férrica, encontrado en la literatura de Paul Chester.

## 6. DISCUSIÓN

Este reporte describe la diferenciación de amebas intestinales morfológicamente de acuerdo a su forma vegetativa trofozoíto y quistes y a sus formas teñidas.

En primera instancia Paul Chester en su libro describe a las amebas en su forma vegetativa trofozoíto sin teñir y en su forma quística teñida con yodo y hematoxilina férrica.

Paul Chester describe a *Entamoeba histolytica* en su fase de trofozoíto con una longitud de 8 a 30  $\mu\text{m}$  y la Organización Mundial de la Salud con una longitud mayor a 20  $\mu\text{m}$ , en la literatura encontrada en artículos maneja que hay un rango de 10 a 60  $\mu\text{m}$ , cada autor tiene una diferencia mínima la cual está permitido.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud hay una pequeña diferencia entre la literatura de Paul Chester, entre *Endolimax nana* ya que la describe con una longitud de 6 a 15  $\mu\text{m}$  y la OMS la describe con una longitud de 6-12  $\mu\text{m}$ .

En las amebas *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba coli*, e *Iodamoeba butschlii* no se encuentra diferencia en sus trofozoítos.

En fase quística de acuerdo a cada autor, no hay diferencia en su tamaño, en la tabla representada por Paul Chester se encuentra diferencia entre la forma de teñir, ya sea con yodo o con hematoxilina férrica.

## 7. CONCLUSION

Se obtuvo la diferenciación de ocho protozoos intestinales, cada una diferenciada por su tamaño y forma de trofozoíto y quiste, cabe mencionar que existen similitudes entre ellas por eso es importante conocer su morfología para un buen diagnóstico para su posterior tratamiento, se realizó la diferenciación con base a su tamaño nuclear y estructura.

En el caso de *Entamoeba histolytica* su diferenciación con *Entamoeba dispar* es necesaria la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Aunque este tipo de técnica sea costosa esto es para prevenir una medicación innecesaria.

Las tablas anexadas de las técnicas de diferenciación para cada una de ellas muestran una significativa diferencia ya sea teñida con yodo o con hematoxilina férrica, esto para un mejor diagnóstico.

## 8. BIBLIOGRAFÍAS

1. Acha Pedro N, Boris Szytres. (2003). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Washington, DC, EUA. Organización Panamericana de la Salud, *volumen III* página 3.
2. Ali LK, Haque R, A siddique, Kabir M, Sherman NE, SA Gray *et al* (2012). El análisis proteómicos de la etapa de quiste de *Entamoeba histolytica*. Dlos NEGL Trops Dis 6(5):e1643.
3. Atias Antonio (2001). Parasitología Médica, México D.F, Mediterráneo, página 218.
4. Chacín-Bonilla Leonor (2010). Amibiasis: Implicaciones del reconocimiento de *Entamoeba dispar* e identificación de *Entamoeba moshkovskii* en humanos. Invest clin v.51 n.2 Maracaibo Jun 2010.
5. Chester Beaver, Clifton Jung Rodney, Wayne Cupp Eddie (2003). Parasitología clínica de Craig Faust, México D.F, Mason doyma México S.A, pagina 130-131.
6. Cobo ER, ELC, K Hirata, Hwang G, Utram, L Eckmann *et al* (2012). *Entamoeba histolytica* induce catelicidinas intestinales, pero es resistente a la destrucción mediada por catelicidinas. Infect inmun Jan: 80(1):143-9.
7. Debnath A, D Parsonage, RM Andrade, EL C, Cobo ER, Hirata K, *et al* (2012). Un examen de drogas de alto rendimiento para *Entamoeba histolytica* identifica una nueva pista y de destino. Nat Med Jun; 18 (6): 956-60.
8. De Haro Irene, Salazar Schettino Paz María, Cabrera bravo margarita, (s.f). Diagnostico morfológico de las parasitosis.
9. Flores becerril, Romero Cabello (2004). Parasitología Medica De las moléculas a la enfermedad, México D.F, Mc Graw Hill, primera edición, pagina 44.

10. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J (2007). Laboratorio de técnicas de diagnóstico para las especies de *Entamoeba*. Clin microbiol Rev. Jul; 20(3):511-32.
11. Heredia RD, Fonseca JA, López MC (2012). *Entamoeba moshkovskii* perspectivas de un nuevo agente para ser considerado en el diagnóstico de las amebiasis. Acta trop sep; 123(3):139-45.
12. Kuroki T, Yamai S, T Koyama (1989). *Entamoeba polecki* infección en refugiados del sudeste asiático en Japón. Jpn J Med Sci Biol Feb; 42(1):25-9.
13. Olivos- García Alfonso, Saavedra Emma, Nequiz Avendaño Mario, Pérez-Tamayo Ruy (2011). Amibiasis: Mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*. Revista de la facultad de medicina de la UNAM.
14. Pacheco-Yépez J, Campos Rodríguez R, Hernández Rojas S, Serrano-luna JJ, Rivera- Aguilar V, Villa-Treviño et al (2009). Expresión diferencial de la superficie de glicoconjugado en *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*.
15. Ridley John W (2012). Parasitology for medical and clinical laboratory professionals. Clifton Park, NY, DELMAR Cengage learning, paginas 61-62.
16. Roberts' Larry S, Janovy Jr John (2009). Foundations of Parasitology, New York, NY, Mc Graw Hill Companies, Eighth edition, paginas 107.
17. Salles JM, LA Moraes, Salles mc, (2003). Amebiasis hepática. Braz J Infect Dis; Apr; 7(2):96-110.
18. Sard B. G., Navarro R. T., Esteban Sanchis J. G., 2011. No es un patógeno ameba intestinal: un panorama clínico-analítico. Enferm Infecc Microbiol Clin. Mar; 29 Suppl 3:20-8.

19. Shimokawac C, Kabir M, Taniuchi M, Mondal D, Kobayashi S, Ali LK, *et al* (2012). *Entamoeba moshkovskii* se asocia con diarrea en bebés y causa diarrea y colitis en ratones. J Infect Dis Sep., 1,206(5): 744-51.

20. Tanyuksel Mehmet, A Petri William, (2003). Diagnóstico de laboratorio de la amibiasis. Clinical Microbiology Reviews, oct 2003; p713-729.

21. Tay Lara, Velasco-Gutierrez (2012). Parasitología Médica, México, D.F, Méndez editores, S.A. de C.V. Séptima edición.

## 9. GLOSARIO

Absceso hepático: Se define como una colección localizada de pus en el hígado, resultante de cualquier proceso infeccioso con destrucción del parénquima y el estroma hepático, siendo en orden de frecuencia: BACTERIANO (piógeno), MICÓTICOS (*Candida albicans*), que muestra una incidencia creciente paralela al SIDA y a la del transplante de la Médula ósea, la quimioterapia y la radioterapia. AMEBIANO (*Entamoeba Histolytica*), como complicación rara de la amebiasis intestinal.

Axénico: Dícese de los animales de laboratorio criados fuera de todo contacto bacteriano y desprovistos de gérmenes.

Disentería: Es un trastorno inflamatorio del intestino, especialmente del colon, que produce diarrea grave que contiene moco y/o sangre en las heces. Si no se trata, la disentería puede ser fatal.

Fisión binaria: Es una forma de reproducción asexual que se lleva a cabo en arqueobacterias, bacterias, levaduras de fisión, algas unicelulares y protozoos

Glicoconjugado: Carbohidratos covalentemente enlazados a Lípidos o Proteínas.

## ANEXO

### ANEXO I TABLA DE DIFERENCIACION MORFOLÓGICA

Tabla 1.1 Diferenciación morfológica de *Entamoeba histolytica* y otras amebas intestinales del hombre (Chester *et al.*, 2003)

Carácter	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Entamoeba hartmanni</i>	<i>Entamoeba coli</i>	<i>Endolimax nana</i>	<i>Iodamoeba butschlii</i>
Trofozoito o forma “vegetativa, sin teñir”					
<b>Tamaño</b>	8-30µm	4-12 µm	15-50 µm	6-15 µm	8-20 µm
<b>Movilidad</b>	Activa, progresiva y direccional	Activa y direccional	Perezosa, rara vez progresiva y direccional	Lentamente progresiva	Lentamente progresiva
<b>Seudópodos</b>	Digitiformes, hialinos y de aspecto vítreo, de formación rápida	Digitiformes, de formación rápida	Más cortos, romos y granuloso; de formación lenta	Romos, hialinos y de formación muy rápida	Romos, hialinos y de formación lenta
<b>Inclusiones</b>	Eritrocitos; no hay bacterias en los ejemplares frescos	Bacterias y otros materiales; no corpúsculos sanguíneos	Bacterias y otros materiales; de ordinario no contienen eritrocitos	Bacterias; no hay eritrocitos	Bacterias; no hay eritrocitos

<b>Núcleos</b>	Generalmente invisibles	Invisibles	Raras veces visibles	Raras veces visibles	Invisibles
<b>Membrana nuclear</b>	Delicada; la cara interior tiene una capa de diminutos gránulos de cromatina	Relativamente gruesa, cubierta con puntos y barras gruesas de cromatina	Gruesa; cara interna tapizada de gruesos granos de cromatina	De grosor intermedio; rara vez con cromatina en la cara interna	Gruesa; puede haber granos de cromatina en la cara interna
<b>Cariosoma</b>	Pequeño y en el centro del núcleo	Por lo general grande; localización variable	Mucho mayor y de situación excéntrica	Grande; situado en el centro del núcleo o a un lado del centro	Grande y granuloso; en el centro del núcleo o algo excéntrico
Forma quística en preparaciones teñidas con yodo					
<b>Tamaño</b>	10-20 $\mu\text{m}$	5-10 $\mu\text{m}$	10-33 $\mu\text{m}$	5-14 $\mu\text{m}$	5-20 $\mu\text{m}$
<b>Forma</b>	De ordinario, esférica	Por lo general esférica	De ordinario esférica	Esférica, ovoide o elipsoidal	Irregular
<b>Citoplasma</b>	Amarillo verdoso brillante	Pardo amarillento	Pardo amarillento	Verde pálido con muchas vacuolas refringentes	Verde amarillento
<b>Glucógeno</b>	Difuso y pardo rojizo	Por lo general, difuso; pardo	Masa central indefinida pardo	De ordinario, ausente, parduzco	De ordinario existe; pardo

Forma quística teñida con hematoxilina férrica					
<b>Núcleos</b>	De 1 a 4; diminuto cariosoma central muy refringente, membrana nuclear perlada y refringente	De 1 a 4; cromatina similar a la de <i>E.coli</i>	De 1 a 8 o más; membrana nuclear refringente y granulosa; cariosoma excéntrico	De 1 a 4; indistintos	oscuro y de contorno definido
<b>Tamaño</b>	10-20 µm	5-10 µm	10-33 µm	5-14 µm	5-20 µm
<b>Forma</b>	De ordinario, esférica	Por lo general, esférica	esférica	Ovoide o helicoidal	Irregular
<b>Citoplasma</b>	Alveolar, con frecuencia vacuolado	Granuloso y vacuolado	Granuloso y vacuolado	Vacuolado con finos gránulos de cromatina	Vacuolado, con gránulos finos y gruesos
<b>Cuerpos cromatoidales</b>	Masas ovales o bastones gruesos de extremos romos	Con frecuencia, numerosos; forma variable	Filamentosos, filiformes o como astillas de extremos puntiagudos	Pequeños, esféricos o baciliformes	Por lo común no los tiene; si existen, son pequeños, redondos y

					granulares
<b>Núcleos</b>	De 1 a 4; membrana delicada tapizada de diminutos granos de cromatina; cariosoma central muy pequeño	De 1 a 4; membrana gruesa; recubiertos con cromatina granular; cariosoma de localización central o excéntrica	De 1 a 8 o más; membrana nuclear gruesa, revestida de cromatina en gránulos grandes o en masas irregulares; cariosoma grande y excéntrico	De 1 a 4; membrana nuclear indistinta, cariosoma cerca de la membrana nuclear	Uno, con membrana nuclear poco definida por lo general; cariosoma rodeado de gránulos

## ANEXO II DIAGRAMAS

Diagrama 1. Claves dicotómicas para la identificación de quistes amebianos en preparaciones teñidas. (OMS, 1994).



### Clave para la identificación de trofozoítos amebianos en preparaciones teñidas

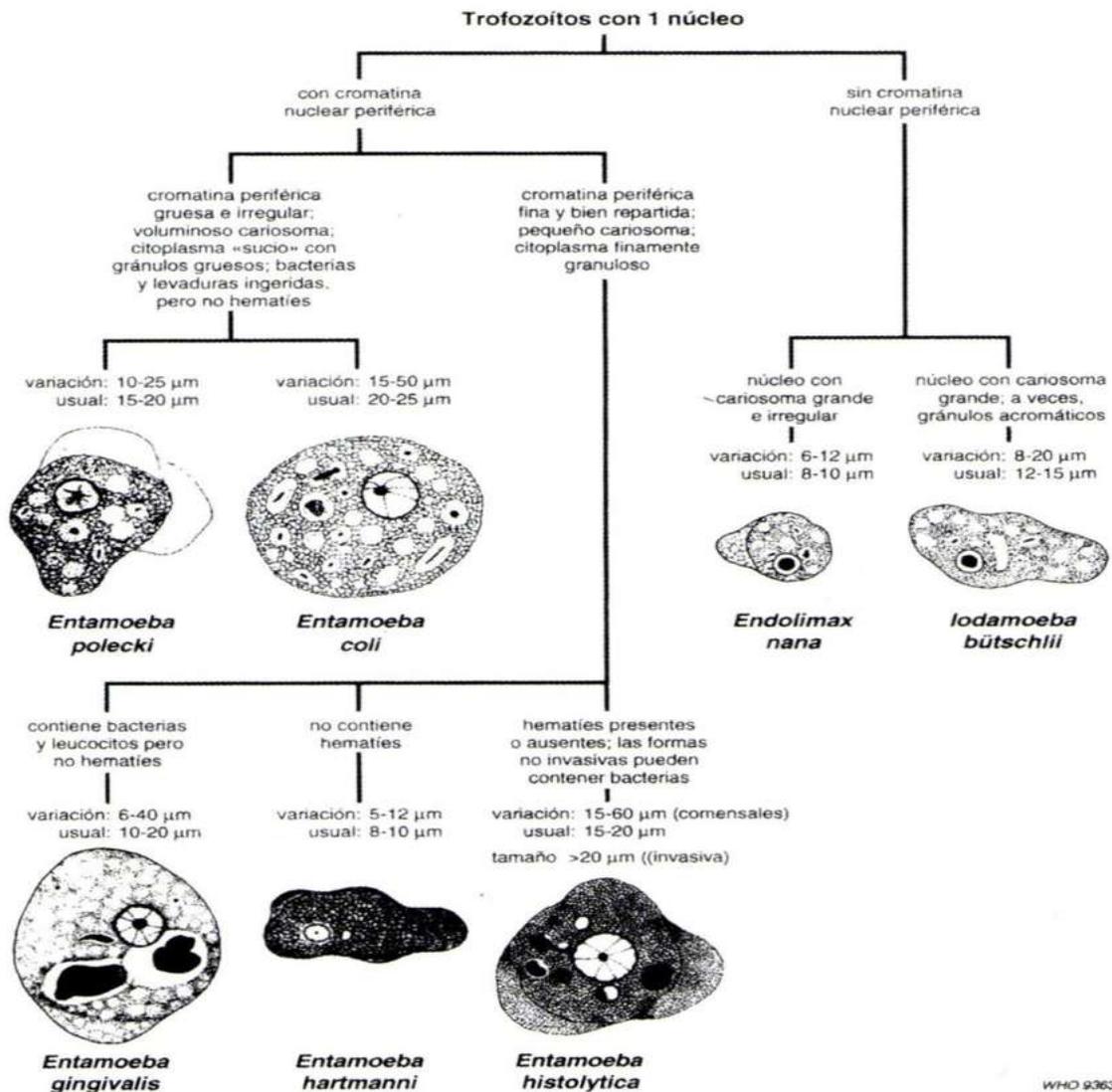


Diagrama 1.1 claves dicotómicas para la identificación de quistes amebianos en preparaciones teñidas. (OMS, 1994)

