

Artículo original

Acción del ozono sobre *Entamoeba histolytica*

Ozone action on *Entamoeba histolytica*

Leslie Elena Sánchez Gallardo

Medica cirujana, UNAM FES Iztacala.México

Daniel Talamás Lara

Doctor en ciencias en infectómica y patogénesis molecular. Unidad de microscopia electrónica (LaNSE) CINVESTAV-IPN, CDMX.México

Palabras clave

Entamoeba histolytica, Ozono, Microscopia confocal, Microscopia electrónica de barrido, Microscopia electrónica de transmisión, Amibiasis, Membrana, Parásito.

Resumen

La amebiasis es un importante problema de salud sobre todo en países tropicales, es considerada la tercera causa de muerte entre las enfermedades parasitarias en todo el mundo. La amebiasis se manifiesta por transmisión de quistes de *Entamoeba histolytica* a través de la vía fecal-oral a partir de agua o alimentos contaminados.

La ozonoterapia, consiste en la aplicación de una mezcla de oxígeno médico con ozono el cual es una molécula formada por tres átomos de oxígeno O₃. Entre los efectos biológicos del ozono, el primer lugar lo ocupa tradicionalmente el efecto germicida. Esta acción del ozono actúa cuando se aplica por una vía externa, siguiendo las diversas modalidades terapéuticas, principalmente en concentraciones elevadas.

El primer objetivo del ozono son las membranas plasmáticas de la célula y las modificaciones inducidas por el ozono en el contenido intracelular, es decir, oxidación de proteínas citoplasmáticas y alteración de las funciones de los órganos.

En este estudio se logró demostrar mediante las diferentes técnicas microscópicas el impacto del ozono sobre la ameba, encontrando el daño a membranas, así como las diferentes reacciones que tiene para llegar al objetivo final que es la muerte de los trofozoítos. Con las diferencias entre cada una de las técnicas y dosis empleadas para dicho experimento, se encontraron resultados significativos para sugerir el uso germicida del ozono, particularmente contra parasitosis por *E. histolytica*.

Keywords

Entamoeba
histolytica, Ozone,
Confocal microscopy,
Scanning electron
microscopy,
Transmission electron
microscopy,
Amebiasis,
Membrane, Parasite,
Parasite

Abstract

Amebiasis is a major health problem, especially in tropical countries, and is considered the third leading cause of death among parasitic diseases worldwide. Amebiasis is manifested by the transmission of Entamoeba histolytica cysts through the fecal-oral route from contaminated water or food. Ozone therapy consists of the application of a mixture of medical oxygen with ozone, which is a molecule formed by three atoms of oxygen O₃. Among the biological effects of ozone, the first place is traditionally occupied by the germicidal effect. This action of ozone acts when applied externally, following the various therapeutic modalities, mainly in high concentrations. The first target of ozone is the plasma membranes of the cell and the modifications induced by ozone in the intracellular content, i.e., oxidation of cytoplasmic proteins and alteration of the functions of the organs.

In this study it was possible to demonstrate by means of different microscopic techniques the impact of ozone on amoeba, finding the damage to membranes, as well as the different reactions that it has to reach the final objective which is the death of the trophozoites. With the differences between each of the techniques and doses used for this experiment, significant results were found to suggest the germicidal use of ozone, particularly against E. histolytica parasitosis.

Sugerencia sobre cómo citar este artículo:

Sánchez Gallardo, Leslie Elena et Al. (2024). Acción del ozono sobre Entamoeba histolytica. *Ozone Therapy Global Journal* Vol. 14, nº 1, pp 15-30

1. Introducción

La amibiasis es causada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica*. Este parásito invade la pared del colon originando disentería aguda o diarrea crónica de gravedad variable. Los trofozoítos también pueden ser transportados por la sangre hacia el hígado en donde forman abscesos hepáticos. Rara vez se diseminan a los pulmones, cerebro u otros órganos, o invaden la piel perianal. (J.Gallego, 2007).

Actualmente se estima que la incidencia de esta enfermedad es de aproximadamente 50 millones de personas con infecciones sintomáticas y causa 100.000 muertes al año.

El hombre es el único huésped establecido y es universalmente susceptible. Sólo los quistes son infecciosos ya que sobreviven a la acidez gástrica cuando se ingieren en tanto que los trofozoítos son destruidos.

E. histolytica existe en dos formas en la luz y en las criptas mucosas del intestino grueso: Quiste (10 a 14µm) y trofozoítos móviles (12 a 50 µm). Cuando no hay diarrea, los trofozoítos se enquistan en el intestino grueso; los trofozoítos que se eliminan al ambiente mueren con rapidez, pero los quistes, permanecen viables en el suelo y el agua durante meses bajo condiciones apropiadas de temperatura y humedad.

La transmisión regularmente ocurre por la ingestión de quistes en alimentos o agua contaminados con heces. Las moscas y otros artrópodos también sirven como vectores mecánicos. La transmisión resulta de la contaminación de alimentos por las manos de quienes los manejan. En donde se utiliza excremento como fertilizante, es con frecuencia una fuente de contaminación de alimentos y agua. El contacto de persona a persona es importante en la transmisión; en consecuencia, hay que examinar las heces de todos los miembros de la familia de la persona infectada. (M, 1994)

Existe una especie muy similar llamada *E. dispar* cuyos quistes y trofozoítos tienen el mismo aspecto que los de *E. histolytica* sin embargo, esta especie está considerada como no patógena. Existen factores de riesgo conocidos para presentar un absceso amebiano hepático como por ejemplo el sexo, alcoholismo, padecimientos oncológicos, prácticas homosexuales, inmunosupresión y habitar o viajar a zonas endémicas. (J.Gallego, 2007)

Esta enfermedad puede producir múltiples manifestaciones, desde estado de portador asintomático (la situación más frecuente) a cuadros de diarrea poco importantes o de disentería grave, con ocasional ulceración colónica (Rodríguez, 2014). Por vía hematogena desde el colon puede llegar al hígado, provocando la formación de un absceso amebiano hepático con típico contenido achocolatado. Otra complicación es la presencia de masas pseudo tumorales en el ciego llamadas amebomas. Cuando se presenta el absceso hepático amebiano suele existir una clínica de presentación aguda consistente en fiebre de una o dos semanas de evolución y con temperatura de entre 38,5 °C y 39,5 °C, así como dolor en hipocondrio derecho y hepatomegalia. Para viajeros que regresan de una zona endémica la presentación por lo general ocurre dentro de un periodo comprendido entre las 8 a 20 semanas.

Ocasionalmente la enfermedad puede ser más crónica con meses de fiebre pérdida de peso y dolor abdominal.

Para el diagnóstico serán útiles tanto la microscopía fecal del patógeno como la eco abdominal. El diagnóstico de la amebiasis intestinal se realiza mediante el examen directo de heces, mientras que el absceso amebiano debe diagnosticarse por serología, con una sensibilidad del 90% a partir de la primera semana. Característicamente y a diferencia de la disentería bacteriana, no cursa con presencia de leucocitos en las heces debido a la destrucción de estas células por el parásito.

El tratamiento habitual tanto en infección intestinal como en la hepática debe incluir un amebicida tisular (metronidazol tinidazol o cloroquina), seguido de un amebicida luminal para erradicar el estado de portador asintomático, dentro de estos últimos se puede utilizar paramomicina siendo de segunda elección el iodoquinol o el furuato de diloxanida.

El metronidazol es el medicamento más utilizado para combatir la amebiasis luminal y hepática, pero es tóxico y puede ser mutagénico para los pacientes cuando se usen dosis altas, o como tratamiento a largo plazo. Generalmente se tolera bien, pero puede causar náuseas, vómitos y calambres abdominales. Aunque las amebas resistentes a los medicamentos no se describen con tanta frecuencia como lo son los parásitos de la malaria resistentes a los medicamentos, se han informado diferencias en la susceptibilidad a los medicamentos entre las cepas de amebas. Los informes sobre el fracaso del tratamiento también indican que la resistencia a los medicamentos puede adquirir importancia clínica en un futuro próximo proporcionando entonces un impulso a los esfuerzos para identificar y explotar terapias antiamebianas y alternativas y/o complementarias.

Presentacion

El alto grado de patogenicidad del protozoario parásito *Entamoeba histolytica* se debe a su capacidad invasiva basada en los fenómenos de adhesión citólisis y fagocitosis. La adhesión como mecanismo de patogenicidad es un factor clave para entender el carácter invasivo de esta amiba. En el proceso de adhesión se involucran distintas etapas; la identificación de la célula blanco, interacción ligando-receptor y posteriormente la compleja estructuración del citoesqueleto de actina.

Efectos del ozono

La eliminación de las bacterias y la inactivación vírica se relaciona con la concentración del ozono y el tiempo de contacto con los microorganismos las bacterias son las que se destruyen con mayor rapidez.

Las propiedades germicidas del ozono no se limitan al ozono en sí, sino que se presentan también en los productos de la reacción de este gas con determinadas sustancias. Se han utilizado aceites de origen vegetal, por ejemplo, aceite de oliva como medio adecuado para la ozonoterapia. Los aceites ozonizados estabilizados, poseen un carácter germicida y parasitocida muy intenso, que los hace útiles para el tratamiento de un gran número de enfermedades. Hay que destacar que frente a estos agentes no es posible el fenómeno de resistencia microbiana, ya que actúan básicamente oxidando las paredes microbianas. La hidrosolubilidad del ozono es 10 veces superior a la del oxígeno. 49,0 mL de ozono por cada 100 mL de agua comparado con 4,89 ml de oxígeno por cada 100 ml de agua. El agua ozonizada se prepara haciendo pasar el ozono por un burbujeador de vidrio aglomerado y burbujeador el agua durante al menos 5 minutos hasta lograr la saturación. La estabilidad del ozono en solución acuosa es escasa unos 5 a 6 minutos después de obtenida el agua ozonizada la concentración de ozono desciende un 25% con respecto a la concentración inicial.

Los principios activos resultantes son hidroperóxidos y otros productos de la peroxidación lipídica que poseen propiedades germicidas inespecíficas y además inciden en un modo satisfactorio sobre los procesos de cicatrización y regeneración de los tejidos por todo ello son de gran utilidad en el tratamiento de infecciones locales. La relativa estabilidad de los aceites con respecto al ozono gaseoso proporciona ventajas a este método terapéutico.

Dentro de los aceites vegetales más empleados son el de girasol, y el aceite de oliva. Con el uso de derivados ozonizados de estos aceites se ha desarrollado numerosos estudios clínicos en los que han demostrado sus propiedades bactericidas, así como su capacidad para estimular la regeneración de tejido epitelial.

Acción germicida del ozono

Entre los efectos biológicos del ozono el primer lugar, lo ocupa tradicionalmente el efecto bactericida, viricida y fungicida. Esta acción directa del ozono se manifiesta de forma general cuando se aplica por una vía externa. Siguiendo las diversas modalidades terapéuticas principalmente a concentraciones elevadas.

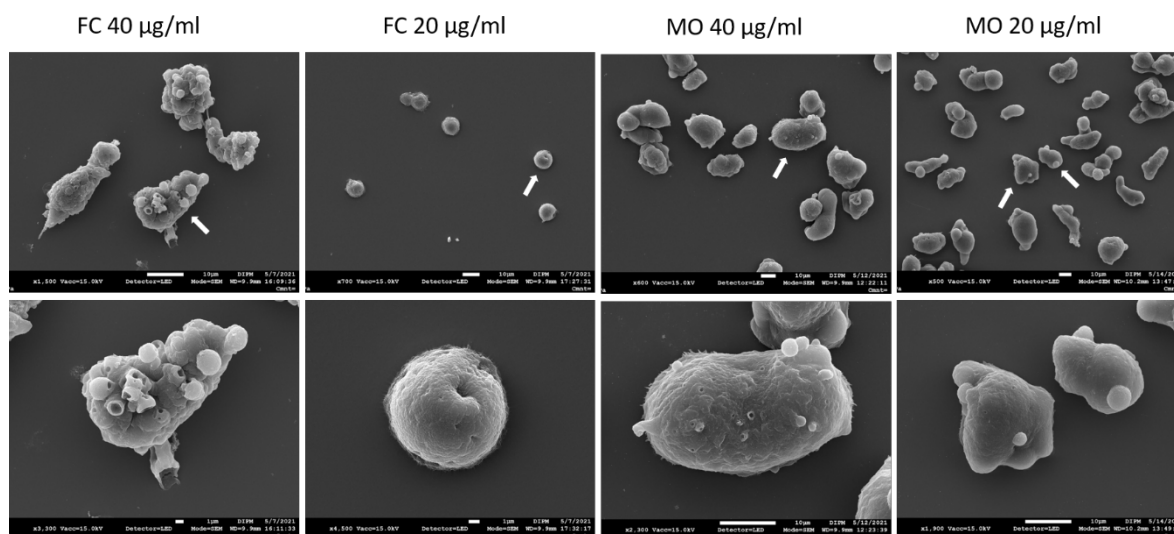
A diferencia de muchos antisépticos conocidos, el ozono no irrita ni destruye los tejidos protectores de la persona, debido a que, a diferencia de los microorganismos, el organismo multicelular del ser humano posee un potente sistema antioxidante de defensa.

El primer objetivo del ozono son las membranas plasmáticas de la célula y las modificaciones inducidas por el ozono en el contenido intracelular, es decir, oxidación de proteínas citoplasmáticas y alteración de las funciones de los órganos. Esto se produce probablemente por la acción de los oxidantes secundarios productos de la ozonólisis de los lípidos de las membranas.

La acción del ozono en las membranas se dirige en primer lugar a las partes más polares, con su mayor accesibilidad desde el lado de la fase acuosa en el exterior de la célula. La causa directa de la destrucción de las bacterias por la acción del ozono es el deterioro local de las membranas plasmáticas lo que hace que las células bacterianas pierdan la capacidad de mantenerse funcionales, reproducirse o ambas.

Bajo estas premisas, se realizaron pruebas sobre *E. histolytica* con aceite de oliva ozonizado y ozono gaseoso para cuantificar la viabilidad del parásito; posteriormente se utilizaron técnicas microscópicas para observar los cambios morfológicos y de estructuración de citoesqueleto de actina una vez que se aplicaron diferentes concentraciones de ozono al parásito.

Materiales y Métodos



Cultivo celular. Los trofozoítos de *E. histolytica* (cepa HM-1: IMSS) fueron cultivados en tubos de borosilicato por 72 horas a 36 °C en condiciones axénicas en medio TYI-S-33. El medio contenía 10% de suero bovino y vitaminas. (Louis S. Diamond, 1978); (L. S. Diamond, 1995). Los parásitos fueron recolectados enfriando los tubos a 4°C por 10 minutos para posteriormente centrifugarlos a 900 x g por 5 minutos. Una vez cuantificado el número de células, se procedió a hacer el inóculo en medio en condiciones normales y en medio ozonizado.

Ozonización de medio. En medio TYI-S-33 se ozonizó a flujo continuo a una concentración de 40 µg/mL y 20 µg/mL respectivamente por 1 min previa inoculación de trofozoítos. El otro método fue ozonización del medio con los trofozoítos crecidos en su etapa logarítmica. El medio se ozonizó con generador de ozono Biozon OXY con bomba de vacío, BIOZON®. Aceite ozonizado a 600mEq SAN-O₃® colocando 1mL, 5mL, 10 mL respectivamente y un control de aceite de oliva extra virgen 500µl.

Cuantificación de viabilidad. A los tubos con amibas, después de los diferentes tratamientos antes mencionados se tomó una alícuota de 10µl del medio y 10µl de azul tripano. Se colocó la mezcla en cámara de Neubauer para contabilizar las células muertas y posteriormente porcentualizar la viabilidad.

Microscopía electrónica de barrido. Los trofozoítos previamente tratados en las diferentes condiciones de ozonización se colocaron en cubreobjetos recubiertos de gelatina para ser fijados una hora después con glutaraldehído al 2.5% (v/v) en cacodilato de sodio al 0.1M (pH 7.2), las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, secadas a punto crítico con CO₂ 31°C y 1100psi usando el aparato Samdri 780 (Tousimis Corp., Rockville, MD), y finalmente cubiertas con partículas de oro con un equipo de dispersión iónica (JEOL JFC-1100). Las muestras fueron examinadas con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo JEOL-JSM 7100F (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

Microscopia confocal. Los trofozoítos para este análisis fueron fijados con paraformaldehído al 4% durante 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con Buffer de fosfatos (PBS) y bloqueado por una hora con suero fetal bovino al 10% diluido en PBS. Las muestras fueron marcadas con faloidina rodamina (1:50) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) por 30 minutos a 37°C, se lavaron, y finalmente montadas con DAPI-Vectashield (Vector laboratories; Ontario, Canada) en cubreobjetos, para ser observadas en el microscopio confocal LSM700 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Germany).

Microscopia electrónica de transmisión. Las amibas previamente tratadas con las diferentes condiciones, se centrifugaron para obtener un conglomerado de trofozoítos, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% (v/v) en cacodilato de sodio al 0.1M (pH 7.2), después se postfijaron con tetroxido de osmio al 1% (w/v) y posteriormente deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol, las muestras fueron transferidas a una mezcla de resina epoxica/etanol (1/1) y finalmente embebida en la resina pura para ser llevados a polimerización en un horno a 60°C. Con ayuda de un ultra micrótopo se obtuvieron cortes ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Estos cortes se observaron en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM- 1011 (JEOL Ltd. Tokyo, Japan).

Análisis estadístico. Los datos obtenidos del estudio del porcentaje de viabilidad fueron analizados utilizando la prueba *Student's t-test* usando el software GraphPad Prism 8. Para determinar la significancia estadística sobre la viabilidad se utilizaron los datos no pareados usando la prueba para condiciones paramétricas considerando los valores *P* como **** ($P < 0.0001$), *** ($P < 0.001$).

Resultados

Aceite ozonizado

Se utilizó como primer abordaje el aceite ozonizado a 600 mEq O³, en 5 tubos de ensayo con trofozoítos crecidos en su máxima capacidad por tubo. El primero se tomó como control sin aceite ozonizado, el segundo con 1ml de aceite ozonizado, 5 y 10 mL de aceite respectivamente; sucesivamente un tubo 5 también de control con aceite de oliva extra virgen sin ozonizar.

Encontrando los siguientes resultados:

Del número total de trofozoítos crecidos en cada condición, se realizó una cuantificación de 100 células en cámara de Neubauer para detectar las células no viables por medio de la técnica de azul tripano, arrojando los resultados que se describen en la siguiente tabla.

Tubo	Control	1mL aceite O ³	5mL aceite O ³	10 mL aceite O ³	Aceite de oliva extra virgen
Porcentaje de viabilidad	100 %	100 %	92 %	81 %	97 %

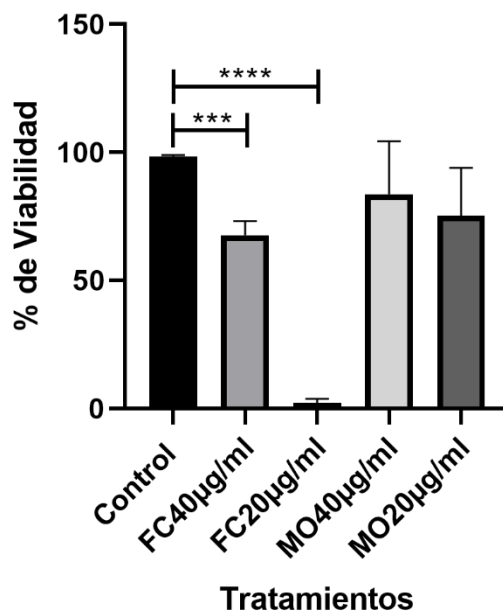
El resultado en esta prueba a pesar de que con el aumento de dosis medido en mililitros mostro una disminución en la viabilidad del trofozoito, no arrojó diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad de las amibas. Esto se demuestra en la tabla 1 mostrada anteriormente.

Medios ozonizados

El segundo abordaje fue medir el porcentaje de viabilidad, la observación morfológica, ultra estructural y la estructuración de actina de los trofozoítos con ozono gaseoso; esto, utilizando flujo constante (FC) y medio ozonizado (MO) a concentraciones de 40 y 20 µg/mL respectivamente.

Porcentaje de viabilidad

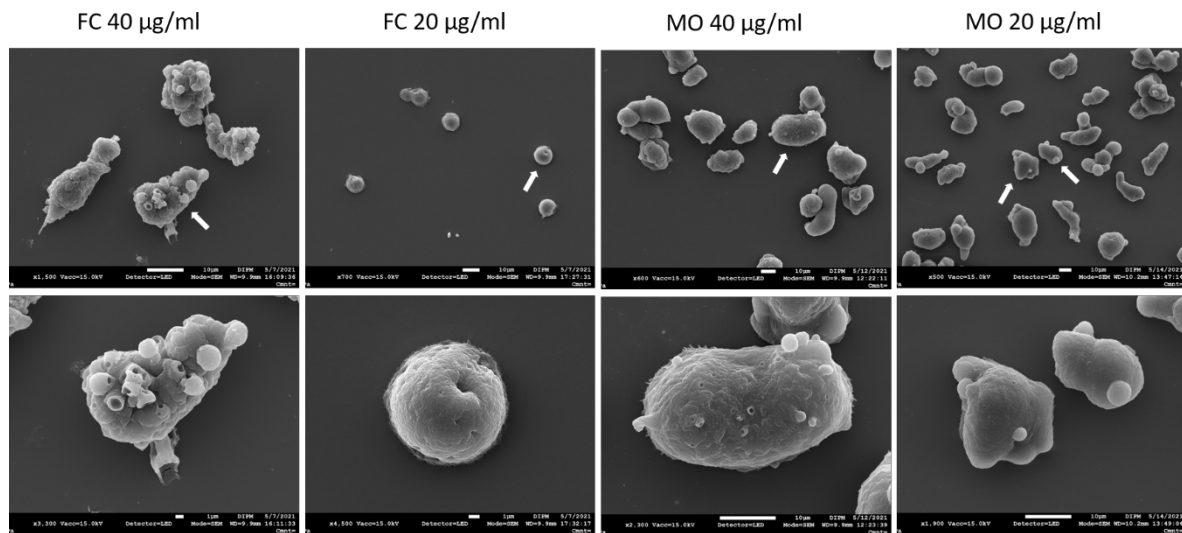
En este análisis se crecieron a los trofozoítos de *E. histolytica* bajo las diferentes concentraciones de tratamiento por triplicado para cuantificar posteriormente su viabilidad. Los resultados se muestran en la gráfica 1. Respecto al control, los tratamientos de FC fueron los que mostraron una diferencia significativa en la viabilidad de las amibas siendo el tratamiento de 20µg/mL el que mostró una mortalidad casi del 100%; para los medios ozonizados a pesar de que se observó una reducción en el porcentaje de viabilidad, estos datos no demostraron significancia estadística.



Gráfica 1: Porcentaje de viabilidad de *E. histolytica* bajo los diferentes tratamientos de ozono. *** $P < 0.001$ para FC 40µg/ml y **** $P < 0.0001$ para FC 20µg/ml

Determinación morfológica por microscopía electrónica de barrido

Posteriormente a estas pruebas, utilizando la técnica de microscopía electrónica de barrido se observó la morfología que adquirieron las amibas después de haber sido aplicado el ozono. Mostrando los siguientes resultados:



La concentración de 40 µg/mL en flujo continuo fue la condición que mostró mayores cambios morfológicos, estos se manifestaron por un cambio notable en la mayoría de los trofozoítos observándose ampollas de gran tamaño en la superficie de los mismos; un cambio notable en la membrana plasmática fue descubierto bajo esta condición. En la condición de 40 µg/mL con medio previamente ozonizado, mostró a las amibas con una superficie regular uniforme y un buen número de trofozoítos adheridos, sin embargo, en esta condición también se observó la formación de ampollas, aunque de menor tamaño. La condición de 26 µg/mL de flujo continuo también fue una de las condiciones que mostró un cambio importante en el comportamiento de las amibas, debido a que en esta condición se observa una disminución significativa de los trofozoítos adheridos y una morfología completamente redondeada; sugiriendo la disfuncionalidad de los trofozoítos que incluso probablemente se encuentren muertos. En la última condición de 26 µg/mL de medio ozonizado se observó a una población más confluyente y adherida con una morfología similar a la condición de 40 µg de medio ozonizado; la membrana muy lisa y uniforme con algunas amibas que mostrabas pequeñas ampollas en la superficie membranosa.

Figura 1. Imágenes de microscopía de barrido electrónico; el panel superior muestra un área a menor aumento donde se observó de manera general la morfología de las amibas con los diferentes tratamientos de ozono. El panel inferior muestra en mayor aumento a las amibas resaltadas con la flecha del panel superior.

Estructuración de actina por microscopía confocal.

Al ver tantas diferencias morfológicas en cada una de las condiciones, se prosiguió a analizar por microscopía confocal la estructuración del citoesqueleto de actina en *E. histolytica* en cada una de las concentraciones seleccionadas obteniendo los siguientes resultados.

En este análisis se incluyó un control de amibas no tratadas para poder hacer la comparación con los tratamientos. El control mostró los resultados característicos del arreglo del citoesqueleto de actina en *E. histolytica* mostrando actina cortical de manera uniforme delimitando la membrana plasmática y formación de estructuras especializadas conocidas como placas de adhesión y bocas fagocíticas (marca fluorescente más roja). En la condición de 40 µg/mL en flujo continuo intensidad de la marca decayó y solo se observó más concentración de actina en las estructuras que parecen ampollas. En la condición de 40 µg/mL de con medio ozonizado la marca decayó notablemente y solamente pocas amibas mostraron una estructuración de actina cortical, sugiriendo una polimerización de actina pobre. En la concentración de 20 µg/mL de flujo continuo fue difícil encontrar amibas adheridas, es por eso que solamente se aprecia en la imagen una sola amiba y en consecuencia la polimerización de actina fue nula. En la condición de 20 µg/mL en medio ozonizado la polimerización de actina también fue menor, aunque fue más distribuida por todo el volumen celular citoplasmático. En todas las condiciones existió una variación en la polimerización, lo que sugiere que el ozono si afecta notablemente en este proceso biológico indispensable de la amiba que le confiere motilidad y patogenicidad.

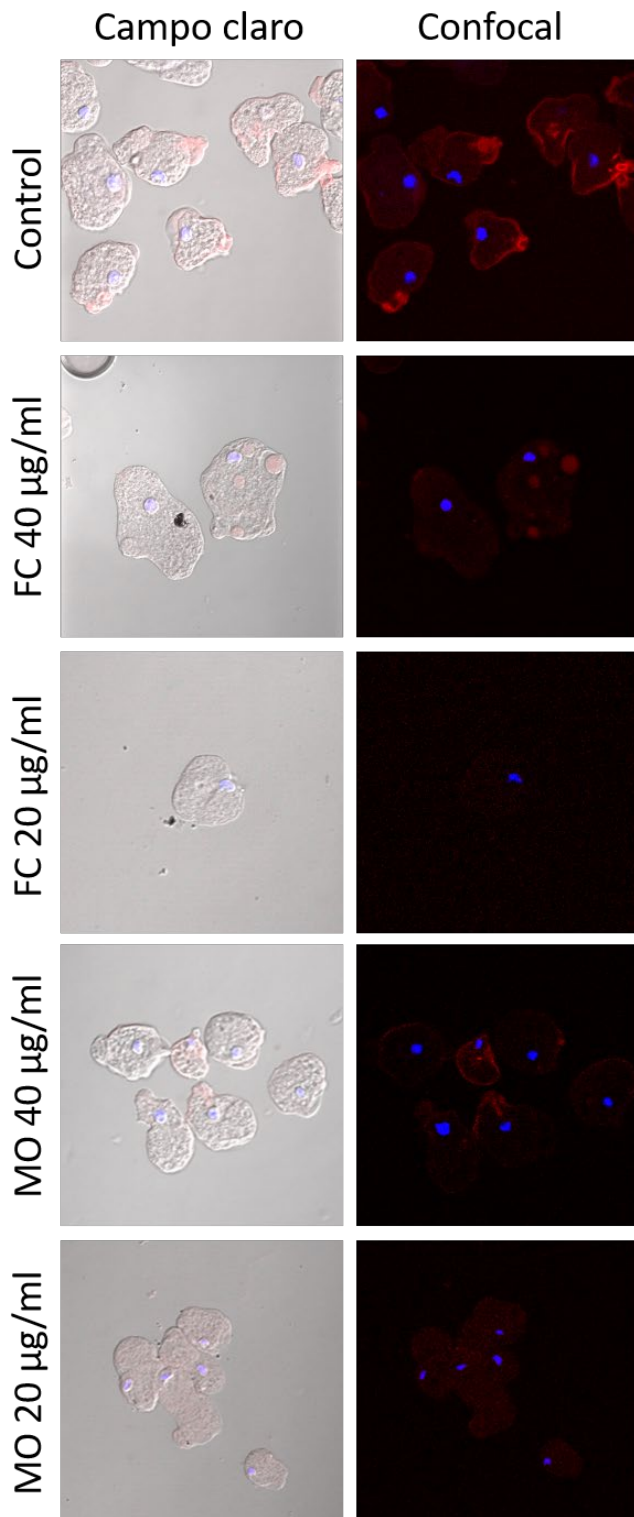


Figura 2. Imágenes de microscopía de luz transmitida (lado izquierdo) y confocal (lado derecho) mostrando la polimerización de actina con cada uno de los diferentes tratamientos con ozono. Marca roja = actina polimerizada; marca azul = núcleos celulares.

Observación ultraestructural por microscopía electrónica de barrido y transmisión de forma integrativa

Un evento que se presentó en repetidas ocasiones por microscopía de barrido y que correlaciona con los efectos producidos por el ozono, es la afectación de la membrana plasmática. En el único tratamiento que se observó un efecto donde el ozono afectó notablemente la membrana de *E. histolytica* fue en la concentración de 40 µg/mL a flujo continuo. Debido a esto, se seleccionó este tratamiento para visualizar la membrana celular de las amibas a nivel ultra estructural por medio de microscopía electrónica de transmisión.

El efecto del daño celular especialmente en la membrana (asteriscos blancos) fue observado por microscopía de barrido. Subsecuentemente las imágenes de los cortes ultra finos que se observaron por microscopía electrónica de transmisión (imágenes centrales) mostraron a los trofozoítos con un daño membranal muy característico. El recuadro punteado de estas imágenes se ve en mayor aumento en las últimas fotografías donde podemos apreciar a nivel ultra estructural el daño y a su vez las imágenes sugieren una degradación intensa de la membrana plasmática.

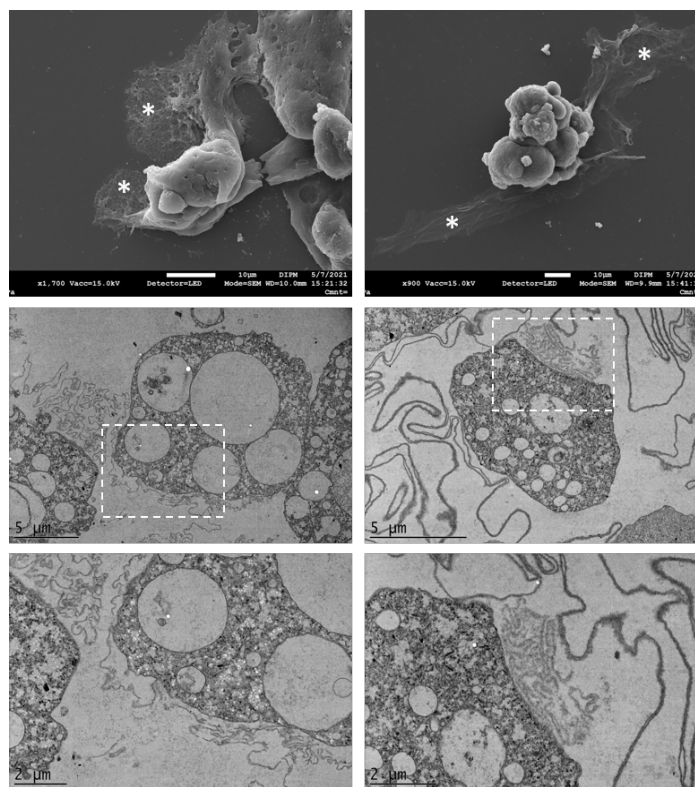


Figura 3. Panel superior muestra las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido donde se aprecia un daño en la membrana celular de los trofozoítos (asteriscos blancos); las imágenes centrales tomadas con microscopía electrónica de transmisión muestran a nivel ultra estructural la morfología de las amibas tratadas con 40 µg/mL de flujo continuo de ozono. El recuadro punteado hace referencia a las imágenes inferiores capturadas con mayor aumento de esa zona.

Discusión y Conclusiones

El primer objetivo del ozono son las membranas plasmáticas de las células, las modificaciones inducidas por el ozono en el contenido intracelular (oxidación de proteínas citoplasmáticas, alteración de las funciones de los orgánulos) se producen por la acción de los oxidantes, productos de la ozonólisis de los lípidos de las membranas, en el estudio con ayuda de la microscopia electrónica de barrido se logro observar claramente dicho daño a la membrana plasmática con las diferentes concentraciones utilizadas, eligiendo las más representativas a una concentración de 40 µg/mL. (Schwartz, Manual de Ozonoterapia clínica , 2017)

El aceite ozonizado clínicamente se utiliza vía oral con favorables resultados en parasitologías (Schwartz, Declaracion de Madrid sobre la Ozonoterpaia, 2015), sin embargo, se observó que de forma directa sobre los trofozoítos no se dieron cambios representativos probablemente por la solubilidad del medio con el aceite debido a que son hidrófobos, y al ser ingerido por el hospedero cursa con un metabolismo diferente.

En este caso con el aceite ozonizado no se observaron resultados favorables, sin embargo, el metabolismo humano pauta la diferencia en su mecanismo de acción, y probablemente tenga una mayor eficacia demostrada utilizarlo como un mecanismo preventivo el consumo de aceite ozonizado más que un tratamiento de la enfermedad.

A pesar que en la bibliografía consultada se reporta la aplicación de ozono en concentraciones elevadas (Schwartz, Manual de Ozonoterapia clínica , 2017), se logró diferenciar que, a una concentración más baja, la cantidad de trofozoítos de *E. histolytica* muertas era del 100% contra la concentración alta que si bien, si nos daba alteraciones morfológicas evidentes e imágenes sugerentes a una próxima apoptosis, se observaban varios trofozoítos de *E. histolytica* aun viables.

La ozonoterapia es una terapia complementaria apta para tratar parasitosis tales como la amebiasis por *E. histolytica*, dado que el estudio se hizo directo sobre el patógeno, se logro demostrar el daño tanto a membranas plasmáticas como a la polimerización de actina, sugiriendo que el ozono afecta de forma notable el proceso biológico que permite a la amiba ser hospedero.

En cuanto a las concentraciones, ambas utilizadas mostraron cambios notables, sin embargo, a una concentración más baja la mortalidad de las amibas era mayor, ya que a concentraciones altas, la amiba reacciona de forma “de defensa” ante el ataque pero no muere de forma inmediata.

Quedando por entendido que si bien, el aceite de ozono en este estudio no dio resultados relevantes, no está excluido como una excelente opción, sin embargo es necesario del huésped para poder metabolizarlo y entonces el ozono actuar directamente sobre el hospedero, y en este caso no fue un estudio de forma clínica en pacientes.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Adolfo Martínez Palomo por su disponibilidad para brindarnos las instalaciones de su laboratorio para el uso de los microscopios en donde se llevaron a cabo estos experimentos. A su vez a la Bióloga Anel Edith Lagunes-Guillen por su valiosa participación en el cultivo celular y apoyo técnico.

Agradecimiento especial a la Dra. Adriana Schwartz por su motivación, aportación y el impulso a hacer un estudio en el que se pudiera comprobar los beneficios del ozono.

Por último y no por eso menos importante, a la familia, en especial mi madre Elena Gallardo por siempre brindarme su apoyo e impulsarme a ser mejor cada día en mi vida personal y profesional en pro de la salud.

Bibliografía

L. S. Diamond, C. G. (1995). YI-S, a casein-free medium for axenic cultivation of Entamoeba histolytica, related Entamoeba, Giardia intestinalis and Trichomonas vaginalis. *J. Eukaryot Microbiol.*, 277-278.

Louis S. Diamond, D. R. (1978). A new medium for the axenic cultivation of entamoeba histolytica and other entamoeba. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 431-432.

Gallego. (s.f.).

J.Gallego. (2007). *Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. Publicacions i Edicions.

M, L. (1994). *Diagnostico clínico y tratamiento*. Manual Moderno.

Rodriguez, E. (2014). *Parasitología Medica* . Manual Moderno.

Schwartz, A. (2015). *Declaracion de Madrid sobre la Ozonoterapia*. Madrid España: ISCO 3.

Schwartz, A. (2017). *Manual de Ozonoterapia clínica* . Madrid, España: MEDIZEUS.