

**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**



**Facultad de Ciencias Químicas  
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo  
Departamento de Análisis Clínicos**



**“Mecanismos de resistencia natural a la infección hepática amebiana por la cepa HM1: IMSS de *Entamoeba histolytica* en ratón Balb/c”**

Tesis presentada como requisito para obtener el título de  
Licenciado en Químico Farmacobiólogo

Presenta:

**pQFB María Azucena Cortes Herrera**

Lugar de realización:

**Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Laboratorio de  
Patología Experimental, Facultad de Medicina, UNAM**

Director de tesis:

**DR. Alfonso Olivos García**

Asesor de tesis:

**MC. José Ángel Francisco Flores Hernández**

**H. Puebla de Zaragoza, 12 de noviembre 2018**

## DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico a las personas más importantes de mi vida:

A mi padres, Maxi y Greg por su sacrificio y esfuerzo, que son un gran pilar y fortaleza en mi vida. Gracias a su amor, enseñanzas y consejos, me he convertido en la persona que soy ahora, y que además han apoyado y contribuido a la realización de los logros a lo largo de mi vida, sabiendo que todos ellos se realizaron gracias a que siempre han creído y confiado en mí. Los amo.

A mis abuelos y tías, quienes sin esperar nada me cuidaron y educaron, por su apoyo, confianza y comprensión. Por brindarme en todo momento cariño y amor. Por toda la confianza que ponen en mí. Especialmente a Ofe y Flor por brindarme tan valiosos consejos sin duda alguna no tengo como pagárselos.

A mis hermanos Sol, Gaby, Vanesa y Luis, gracias por todos los maravillosos momentos compartidos y además por siempre creer en mí, quienes con sus palabras de aliento no me dejan decaer para que siga adelante.

Los amo y agradezco a la vida por darme esta linda familia.

## AGRADECIMIENTOS

De manera especial le agradezco al Dr. Alfonso Olivos por recibirme en su equipo de trabajo, y darme la oportunidad de desarrollar mis habilidades y ampliar mis conocimientos. Gracias por sus grandes enseñanzas, brillantes ideas y útiles consejos, que ayudaron a formarme como profesionista y persona.

Al Q. Ángel por brindarme todo su apoyo en las revisiones del trabajo. Gracias por la dedicación y paciencia. Sin duda sus conocimientos aportaron gran información al trabajo.

A mis sinodales por el tiempo invertido, gracias por sus valiosas sugerencias y comentarios constructivos a este trabajo.

Al grupo de trabajo, Mayito por sus enseñanzas y trucos en las cirugías; Marco por sus recomendaciones y ayuda en todo momento; Edith por tus consejos y ayuda incondicional; al joven Pedro por su ayuda en el procesamiento histológico. Los aprecio mucho.

Al personal del bioterio, especialmente a Don Richard por siempre proporcionarme los animales en tiempo y forma, y por esas largas charlas que me animaban a seguir.

A mis compañeras de laboratorio Scarlet, Miranda, Sol, Fabi por los momentos compartidos.

También quiero agradecer a todos mis amigos que me acompañaron durante el tiempo de la carrera, sin duda fueron parte de esto. Especialmente a todas las Arrechas por todos los momentos de diversión, momentos que sin duda nunca los olvidaré. A Huguito por ayudarme en todo momento, por su amistad incondicional.

A Francisco por ser mi compañero y amigo, por ser la primera persona que estaba apoyándome cuando más lo necesitaba, por escuchar mis enojos, tristezas, estrés. Gracias por apoyar todos mis locos sueños, demostrándome que no son imposibles.

Finalmente agradezco a la a la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, por abrirme sus puertas.

## **AGRADECIMIENTOS**

“Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN214617.

“Investigación realizada gracias al apoyo CONACyT 247430”.

Agradezco al CONACyT la beca recibida”.

*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado, un esfuerzo total es una victoria completa.*

*Mahatma Gandhi*



**BUAP**

Puebla, Pue. a 31 de Julio de 2018

**C. CORTES HERRERA MARÍA AZUCENA  
PRESENTE**

Toda vez que se cuenta con la aprobación del Coordinador del Area de Análisis Clínicos,

DR. ALFONSO OLIVOS GARCÍA, Director de Tesis,

MC. JOSE ANGEL FRANCISCO FLORES HERNANDEZ, Asesor,

se le comunica la autorización de su anteproyecto de tesis denominado:

**"Mecanismos de resistencia natural a la infección hepática amebiana por la cepa HM1: IMSS de Entamoeba histolytica en ratón Balb/c"**

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad, para los fines legales a los que haya lugar

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

**DR. JORGE RAÚL CERNA CORTÉZ  
DIRECTOR**





**BUAP**

**DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ**  
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**  
**P R E S E N T E**

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de la Tesis del alumno de la carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO  
**CORTÉS HERRERA MARÍA AZUCENA**

realizada en el area de Análisis Clínicos, comunican a Ud. la aprobación de la misma con la siguiente redacción:

**"Mecanismos de resistencia natural a la infección hepática amebiana por la cepa HM1: IMSS de Entamoeba histolytica en ratón Balb/c"**

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan, a los 29 días del mes de Octubre de 2018

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

  
\_\_\_\_\_  
MC. MARIA ADRIANA GONZALEZ FLORES

  
\_\_\_\_\_  
DRA. VIOLETA ABURTO LUNA

  
\_\_\_\_\_  
MC ALEJANDRO CESAR RUIZ TAGLE



C.c.p. Archivo

*Vo. Bo.*  




**BUAP**

**MTRA. MARIA ELENA RUIZ VELASCO**  
**DIRECCION DE ADMINISTRACION ESCOLAR**  
**P R E S E N T E**

En relacion al oficio de fecha 30 de Octubre de 2018, signado por el Coordinador del Departamento de Análisis Clínicos de la Facultad de Ciencias Químicas, me permito comunicar a Ud. el nombre de los Catedráticos que integran el Jurado de Examen Profesional de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO que sustentará:

**CORTES HERRERA MARÍA AZUCENA**

**JURADO**

MC. MARIA ADRIANA GONZALEZ FLORES  
DRA. VIOLETA ABURTO LUNA  
MC. ALEJANDRO CESAR RUIZ TAGLE

Examen que se realizará el día 12 de Noviembre de 2018, a las 16:00 horas en el SALON DE USOS MULTIPLES.

Esperando una respuesta favorable al presente, le reitero mi atenta y distinguida consideracion

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

H. Puebla de Z. a 30 de Octubre de dos mil dieciocho

  
**DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ**  
**DIRECTOR**



C.c.p. Archivo

## ÍNDICE

1. Marco teórico.....	12
Amebiasis .....	12
Epidemiología .....	12
Agente etiológico y ciclo biológico.....	12
<i>E. histolytica</i> HM1: IMSS .....	15
Absceso hepático amebiano .....	15
Mecanismos de patogenicidad y virulencia de <i>E. histolytica</i> .....	18
Adherencia.....	18
Trogoctosis .....	18
Fagocitosis.....	19
Motilidad .....	19
Ameboporos .....	19
Proteasas e hidrolasas .....	20
Inmunidad innata.....	21
Componentes celulares de la respuesta inmune innata. ....	21
2. Definición del problema .....	27
3. Justificación .....	28
4. Objetivos.....	29
Objetivo general.....	29
Objetivos específicos .....	29
5. Hipótesis.....	29
Hipótesis nula .....	29
Hipótesis alternativa.....	29
6. Diseño de la investigación .....	30
7. Diagrama de trabajo .....	32
8. Metodología .....	35
Obtención de la cepa y mantenimiento de la virulencia de <i>E. histolytica</i> .....	35
Conteo de trofozoítos.....	35
Inyección intraportal de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en ratones .....	35
Tinción de PAS.....	36
Efecto amebicida del suero de ratón Balb/c <i>in vitro</i> .....	37
Crecimiento amebiano <i>in vitro</i> en suero de ratón Balb/c.....	37
Infección hepática amebiana en ratones inmunizados.....	38
Tratamiento con Apocinina y MEG en ratones inmunizados .....	39

Evaluación de la actividad hipocomplementémica del factor hipocomplementémico de veneno de cobra (CVF).....	39
Infección hepática amebiana en ratones inmunizados e hipocomplementémicos.....	40
Desarrollo del algoritmo informático utilizando el software imageJ para el conteo automático de leucocitos.....	40
Conteo de leucocitos .....	41
Conteo de amebas bien conservadas.....	42
Cuantificación de Malondialdehído .....	42
Cuantificación de aminas carboniladas.....	42
Análisis estadístico.....	43
Control de calidad .....	43
Medidas de seguridad.....	43
9. Organización .....	43
10. Resultados.....	45
Mantenimiento de la virulencia de la cepa HM1: IMSS de <i>E. histolytica</i> .....	45
Proceso infeccioso hepático amebiano en ratones grupo control .....	47
Efecto amebicida <i>in vitro</i> del suero con complemento de hámster, ratón y rata ....	49
Proliferación de la ameba <i>in vitro</i> en suero descomplementado de ratón Balb/c...	50
Actividad quimiotáctica del complemento de hámster Sirio Dorado y ratón Balb/c en la cavidad peritoneal de ratón (6h).....	51
Histología del proceso infeccioso hepático amebiano del ratón inmunizado .....	52
Análisis cuantitativo leucocitario en cortes histológicos de hígados de ratón .....	57
Análisis cualitativo de la integridad de las amebas en cortes histológicos de hígados de ratón Balb/c .....	58
Análisis cuantitativo de la integridad de las amebas en cortes histológicos de hígados de ratón Balb/c .....	59
Evaluación de los niveles de Malondialdehído y aminas carboniladas .....	60
11. Discusión de resultados.....	62
12. Conclusión.....	70
13. Bibliografía.....	71
14. Anexos.....	79

## Lista de abreviaturas

AHA	Absceso hepático amebiano
AHAE	Absceso hepático amebiano experimental
IHA	Infección hepática amebiana
Gal/GalNAc	Lectina galactosa/N-acetilgalactosamina
EhCP	Cisteín peptidasa de <i>E. histolytica</i>
TLR	Receptores tipo Toll
LPPG	Lipopeptidofosfogluano
NK	Natural killer
MO	Mononucleares
PMNs	Polimorfonucleares
NADPH-oxidasa	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato oxidasa
LPS	Lipopolisacárido
MAC	Complejo de ataque a la membrana
NOS	Óxido nítrico sintasa
NO·	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-·</sup>	Radical anión superóxido
SOD	Superóxido dismutasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HOCl	Ácido hipocloroso
MPO	Mieloperoxidasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
CVF	Factor de veneno de cobra
MDA	Malondialdehído
UPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
MEG	Mercaptoetilguanidina
APO	Apocinina
CaBp	Proteínas de unión a calcio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ca <sup>+2</sup>	Calcio

## **1. Marco teórico**

### **1.1. Amebiasis**

La amebiasis es un proceso infeccioso causado por *Entamoeba histolytica*, un parásito protozooario perteneciente al filo *Amoebozoa*. Los individuos infectados pueden ser asintomáticos o sintomáticos los cuales muestran una amplia gama de signos clínicos como diarrea, disentería, fiebre y dolores abdominales. Además, en algunas ocasiones en los individuos infectados también pueden aparecer diversas manifestaciones extraintestinales: por ejemplo, abscesos amebianos en hígado, pulmón o cerebro (Mi-ichi *et al.*, 2016).

### **1.2. Epidemiología**

Según las estimaciones, 480 millones de personas (aproximadamente 12% de la población mundial) están infectadas por *E. histolytica* y de éstos solamente el 10% presentan sintomatología (González Vázquez *et al.*, 2012). Se estima que entre el 5 y el 50 % de los individuos de áreas endémicas portan *E. histolytica* en el intestino. De éstos, el 10% manifestará la enfermedad intestinal disentérica y el 0.5% presentará la enfermedad extraintestinal (Winn *et al.*, 2008). El absceso hepático amebiano (AHA) es la complicación extraintestinal más frecuente. Se ha observado que entre el 2 y 10 % de los pacientes con AHA tiene un desenlace fatal (Winn *et al.*, 2008).

De acuerdo con la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud y de manera similar a los últimos años, en 2016 la amebiasis intestinal estuvo dentro de las veinte primeras causas de enfermedad, ocupando el lugar 15° con 220,205 casos. Además, en el mismo año se registraron 560 casos de absceso hepático amebiano.

### **1.3. Agente etiológico y ciclo biológico**

En 1930 Schaudinn decide llamar *E. histolytica* a la ameba por creer que ésta era responsable de la destrucción tisular que caracteriza a esta enfermedad. *E. histolytica* es un protozooario unicelular de la clase *Rhizopoda* o *Sarcodina*. Se ha considerado a la ameba como un eucarionte ancestral debido a que no tiene citoesqueleto estructurado; no dispone de un sistema membranal equivalente al

complejo de Golgi y al retículo endoplásmico, carece de mitocondrias y de un sistema de lisosomas primarios y secundarios.

En su ciclo biológico, *E. histolytica* adopta dos formas; la resistente y la invasora, que morfológicamente corresponden a los quistes y a los trofozoítos respectivamente. Los quistes son estructuras unicelulares redondas u ovoides (Fig. 1), generalmente tetranucleados, miden de 5 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro y están rodeados por una gruesa capa de quitina. Presentan una pared lisa (p) y refringente. El quiste inmaduro tiene solamente un núcleo y a medida que transcurre el tiempo el núcleo se divide en dos (n) y posteriormente en cuatro (quiste maduro) (Becerril, 2011).

Por otra parte, los trofozoítos (Fig. 2) presentan de uno a seis núcleos (policarición) sin posición fija en el citoplasma. Son estructuras móviles de 10 a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro, además presentan un ectoplasma hialino, ancho y transparente (c), y su endoplasma (d) rodea al núcleo con numerosas vacuolas y otros organelos (Flisser y Pérez, 2006) (Choudhuri y Rangan, 2012).

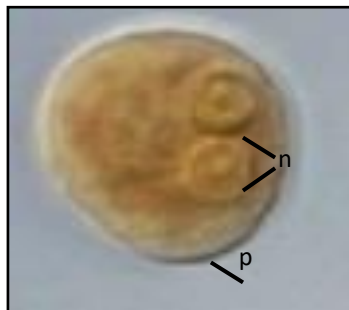


Figura 1. Quiste inmaduro de *Entamoeba histolytica*. Se pueden apreciar dos núcleos y la pared gruesa de quitina (p).



Figura 2. Trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

La infección amebiana inicia cuando el hombre ingiere agua o alimentos contaminados con quistes del parásito, éstos avanzan por el tubo digestivo hasta llegar al estómago. Se sabe que al llegar a este sitio el pH del jugo gástrico junto con las enzimas hidrolíticas destruyen la pared del quiste del parásito sin afectar su citoplasma (Becerril, 2011). La transformación de quistes en trofozoítos se hace después de la ingestión de la capa de quitina y por fragmentación del citoplasma tantas veces como el número de núcleos; estas pequeñas amebas se llaman *metaquistes* que aumentan de tamaño hasta convertirse en trofozoítos. El desenquistamiento ocurre en el íleon terminal y desde ahí los parásitos migran hasta el colon. Por lo general los trofozoítos permanecen en la luz intestinal como comensales, multiplicándose a través de fisión binaria. Pero por razones desconocidas *E. histolytica* puede invadir la mucosa y la submucosa intestinal y así entrar a la circulación portal e invadir órganos blandos como el hígado. (Mortimer y Chadee, 2010).

Después de varias divisiones, en el intestino, disminuye la motilidad de los trofozoítos, se redondean y disminuyen de tamaño tomando la forma de *prequiste*. Después, sintetizan una capa de quitina y luego de dos a tres divisiones del núcleo el quiste queda formado. Finalmente, al salir junto con las heces, los quistes están listos para reiniciar su ciclo biológico (Fig. 3).

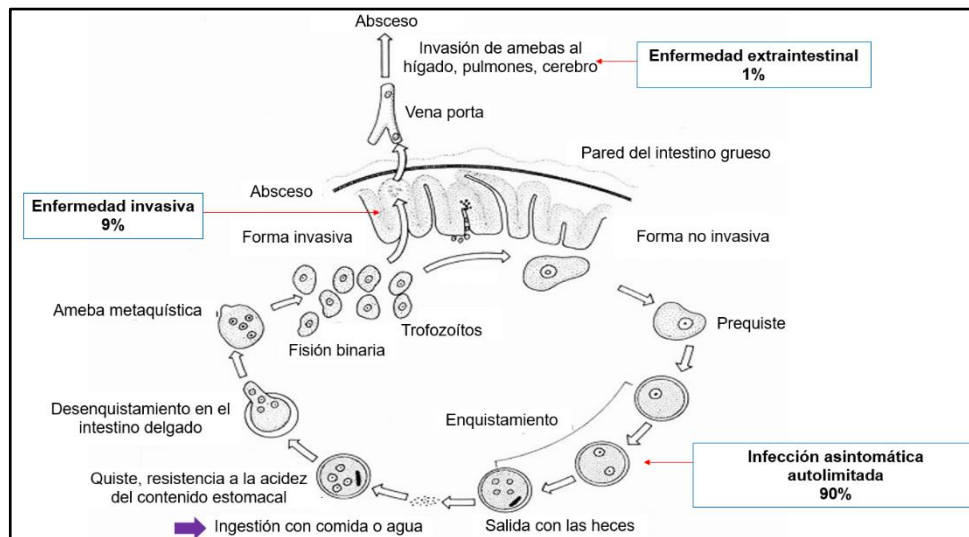


Figura 3. Ciclo biológico de *E. histolytica*. El ser humano es el hospedero definitivo; no hay intermediarios. (➡ Inicio del ciclo). Tomado y modificado de Bogitsh *et al.*, 2005.

Los mecanismos moleculares del proceso de enquistamiento y desenquistamiento del parásito se desconocen, sin embargo, se ha estudiado el mecanismo de enquistamiento en *E. invadens* en donde se ha demostrado que la quitina sintetasa, la lectina Gal/GalNAc y ehRad51 desempeñan importantes funciones en las etapas más avanzadas del enquistamiento (Welter *et al.*, 2017).

### **1.3.1. *E. histolytica* HM1: IMSS**

La cepa de *E. histolytica* inicialmente axenizada y actualmente más utilizada en los laboratorios de investigación de todo el mundo es la HM1: IMSS. Denominada así por ser la primer ameba aislada en forma axénica del intestino de un paciente hospitalizado en el Centro Médico Nacional IMSS en 1967. El doctor Bernardo Sepúlveda y uno de sus colaboradores, Margarita de la Torre, logró cultivar en el laboratorio amebas aisladas de varios pacientes. Las cepas que mostraron diferentes grados de virulencia y características específicas fueron clasificadas como *E. histolytica* HM1: IMSS, HM2: IMSS, HM3: IMSS, etcétera, para denotar su origen en México y en el IMSS.

Estudios previos han demostrado que la cepa HM1: IMSS es extremadamente virulenta, pues al inocular el parásito en el hígado de diferentes hámsteres, todos desarrollaron AHA. Mientras que las cepas H-458: CDC, 200: NIH, HB-301: NIH, HU-21: AMC, Rahman, HU-22: AMC y HK-9 son consideradas de virulencia intermedia (Mattern y Keister, 1977). Otro estudio realizado en condiciones *in vitro* demostró que la cepa HM1: IMSS es capaz de destruir más del 75% de monocapas de tejido, mientras las cepas Rahman, SAW 408, WI: 0385: 191, ocasionaron daño a la monocapa en menos del 40% (Burchard y Mirelman, 1988).

### **1.4. Absceso hepático amebiano**

El absceso hepático amebiano (AHA) es la manifestación más común de la amebiasis extraintestinal y se asocia con fiebre y dolor abdominal. El dolor abdominal derecho o la sensibilidad en la parte superior inicia en la fase aguda, mientras que en la fase subaguda ocurre pérdida de peso, fiebre y dolor abdominal más difuso. El AHA es más frecuente en adultos que en niños (Tanyuksel y Petri, 2003). Además,

en el AHA se afecta principalmente el lóbulo derecho, aunque también puede distribuirse en todos los lóbulos del órgano y su tamaño oscila entre 1 y 40 cm. El AHA se presenta como un área bien delimitada en el que el parénquima hepático está remplazado por una masa de material necrótico de color amarillento y de consistencia cremosa. La diseminación de la infección amebiana a otros órganos (Fig. 4), como cerebro, bazo y huesos, son muy raras y casi nunca ocurren en ausencia de absceso hepático amebiano (Flisser y Pérez, 2006).

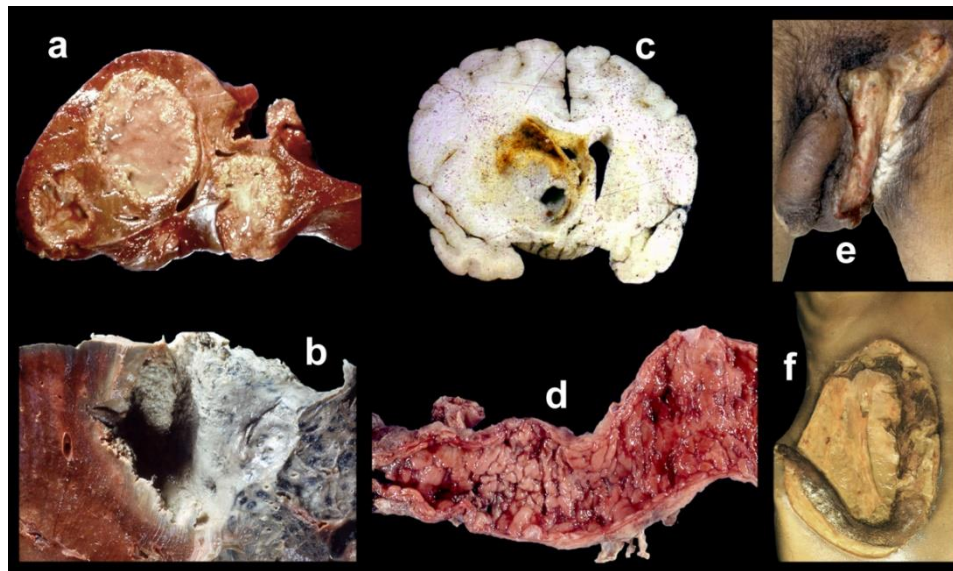


Figura 4. Amebiasis invasiva en diferentes tejidos del ser humano. a) absceso hepático amebiano (AHA) con múltiples lesiones, b) ruptura de AHA e invasión a pulmón, c) lesión amebiana en cerebro, d) megacolon tóxico, e) amebiasis inguinal, f) invasión de la pared anterior del abdomen derecho por un AHA. Las lesiones en piel son causadas por contigüidad.

A nivel microscópico las lesiones del AHA se caracterizan por una zona central de necrosis con parásitos bien conservados en la periferia y rodeados por infiltrado inflamatorio principalmente de tipo linfocitario y mononuclear (Fig. 5a). En algunas ocasiones se pueden observar amebas sin infiltrado inflamatorio en contacto con células hospederas sin aparente daño celular. También se puede observar una zona de fibrosis en la que las fibras son sintetizadas *de novo* (fibrogénesis) en los alrededores inmediatos de los hepatocitos destruidos. A pesar de la síntesis de colágeno, se observa que cuando las fibras ingresan a la zona necrótica, de alguna

manera se someten a lisis (actividad fibrolítica) como lo determino Guerrero *et al.*, en 1982 por medio de micrografías electrónicas (Fig. 5b).

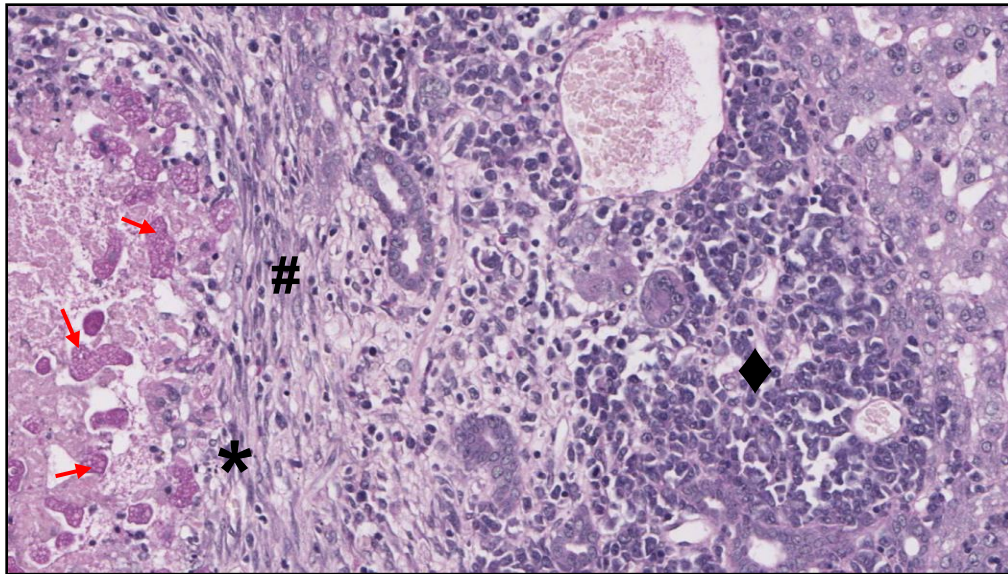


Figura 5a. Aspecto microscópico del absceso hepático amebiano en hámster (7 días). Las flechas señalan algunos trofozoítos bien conservados. Se pueden apreciar 3 zonas; fibrolisis (\*), fibrogénesis (#) y (◆) células inflamatorias. Tinción de PAS, 20X.

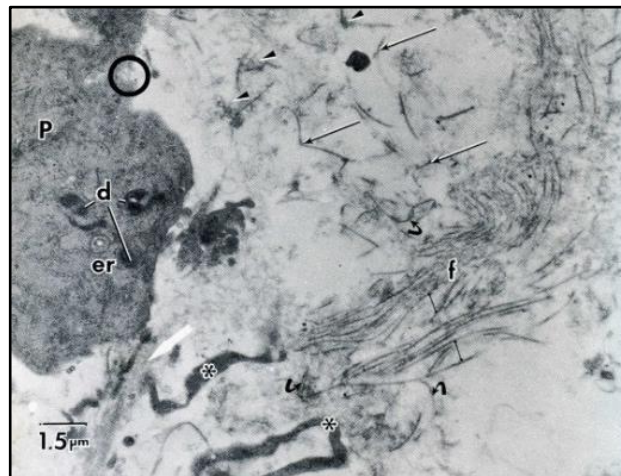


Figura 5b. Micrografías electrónicas donde se muestra la zona de fibrolisis (\*) y de fibrogénesis (f). Tomado de Guerrero *et al.*, 1982.

## **1.5. Mecanismos de patogenicidad y virulencia de *E. histolytica***

La patogenicidad se define como la capacidad de un parásito para producir enfermedad en un hospedero, mientras que la virulencia es el grado de expresión de la patogenicidad.

### **1.5.1. Adherencia**

La infección por *E. histolytica* inicia por la adherencia del parásito a la capa de mucina del colon, por medio de una lectina específica de galactosa y N-acetil-d-galactosamina (lectina Gal/GalNAc) (Petri *et al.*, 2002).

Tras la adhesión, *E. histolytica* induce múltiples efectos citotóxicos sobre las células epiteliales, como aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular, producción de especies reactivas de oxígeno, pérdida de la integridad de la membrana, fragmentación de ADN, exposición a fosfatidilserina en la superficie y la activación de caspasa-3 (Ralston y Petri, 2011). Cabe mencionar que las proteínas de superficie ricas en serina, treonina e isoleucina, que en conjunto se conocen como EhSTIRP probablemente representen un nuevo determinante de la virulencia amebiana, ya que la regulación negativa de estos genes disminuye la citotoxicidad y la adhesión amebiana. (MacFarlane y Singh, 2007).

### **1.5.2. Trogocitosis**

Una vez que la ameba se une a las células, los trofozoítos pueden ingerir material intracelular de células vivas intactas a través de trogocitosis (Ralston *et al.*, 2014). Finalmente, las células blanco mueren por la pérdida de la integridad de la membrana. Una vez que las células del hospedero han muerto, la ingestión cesa y los trofozoítos se desprenden de los cadáveres de las células muertas. Éste es un proceso activo que requiere temperatura fisiológica, reordenamientos de actina, lectina Gal/GalNAc, C2PK (Cinasa) y señalización de fosfatidilinositol 3-fosfato cinasa (Ralston, 2015).

### **1.5.3. Fagocitosis**

Se puede definir a la fagocitosis como la ingestión en la que se internaliza una célula completa (Ralston, 2015). Se sabe que después de la muerte de las células hospederas, *E. histolytica* ingiere las células muertas y los desechos, ayudando a minimizar las respuestas proinflamatorias. Durante este proceso se requiere actina y miosina, para proporcionarle movimiento a la ameba. En el reordenamiento de actina intervienen una familia de proteínas de unión a calcio (CaBP) únicas para *Entamoeba* que también participan en el comienzo de la deformación de la membrana, un evento necesario para iniciar la ingestión (Ralston y Petri, 2011).

### **1.5.4. Motilidad**

Otro factor que interviene en la invasión amebiana al epitelio intestinal es la motilidad, que se inicia después de la activación de células en reposo mediante diversos factores como: quimioattractantes (TNF- $\alpha$ ), citocinas (IL) o requerimientos nutricionales. En primer lugar, la simetría de la célula está rota y aparecen en la parte delantera de ésta protuberancias de membrana como pseudópodos o ampollas hemisféricas. Después, la célula ingresa a través de un ciclo de retracción-relajación por el complejo actina-miosina. Los diversos modos de migración celular difieren en términos de la morfología de la ameba en movimiento, el grado de adhesión de la célula a la matriz extracelular y la interacción molecular en el borde de ataque de la célula (Aguilar-Rojas *et al.*, 2016).

### **1.5.5. Ameboporos**

La familia de los ameboporos comprende tres isomorfos, el ameboporo A, B y C, que se encuentran en una proporción aproximadamente de 35:10:1 (Choudhuri y Rangan, 2012). Los ameboporos son polipéptidos solubles que se insertan en la membrana de la célula blanco por la unión a fosfolípidos aniónicos a pH bajo (5.2), oligomerizan en un proceso mediado por la interacción péptido-péptido, difunden en la membrana y forman un canal a través del cual se produce la salida de iones y otras moléculas pequeñas. En consecuencia, el medio interno celular cambia y esto resulta en muerte por lisis (Leippe, 1997). Aunque estudios recientes han

demostrado que los ameboporos pueden no ser requeridos en la patogénesis de la colitis amebiana (Zhang *et al.*, 2004), sí son necesarios para causar abscesos en hígados de hámster.

#### **1.5.6. Proteasas e hidrolasas**

*E. histolytica* posee 50 genes de proteasas de cisteína (Tillack *et al.*, 2007); sin embargo, solo cuatro proteínas, EhCP-A1, EhCP-A2, EhCP-A5 y EhCP-A7, se expresan altamente en condiciones de cultivo y en conjunto representan más del 90% de la actividad proteolítica total (Irmer *et al.*, 2009). Se ha demostrado, en condiciones *in vitro*, que estas proteasas actúan sobre una variedad de sustratos del hospedero y pueden actuar en la invasión del tejido al degradar las mucoproteínas y algunos componentes de la matriz extracelular. Si estas actividades son relevantes *in vivo*, debieran depender de su concentración, localización (secretada, superficie, fagosoma/lisosoma) y pH del microambiente colónico (Ralston y Petri, 2011).

Las hidrolasas secretadas por los trofozoítos están involucradas en la eliminación y degradación de las células inmunes. También intervienen en la activación de mediadores inmunes solubles, así como la alteración del epitelio intestinal (Thibeaux *et al.*, 2013). La capa de moco entre el lumen y el epitelio forma una barrera física. La degradación de carbohidratos de esta barrera es crucial para el inicio de la colonización por las amebas (Becerril, 2011).

Cuando las amebas invaden el epitelio del colón, se unen a los oligosacáridos de mucina secretados y penetran a través de la capa de la mucosa. En este proceso, las amebas descomponen la barrera de mucina para finalmente alcanzar y posteriormente unirse a las células epiteliales intestinales (Petri *et al.*, 2002). Se ha reportado que *E. histolytica* tiene seis glucosidasas asociadas a la superficie. De estas, la  $\beta$ -Nacetil-d-glucosaminidasa ha mostrado la actividad más alta en la degradación de carbohidratos en la mucina (Biller *et al.*, 2014).

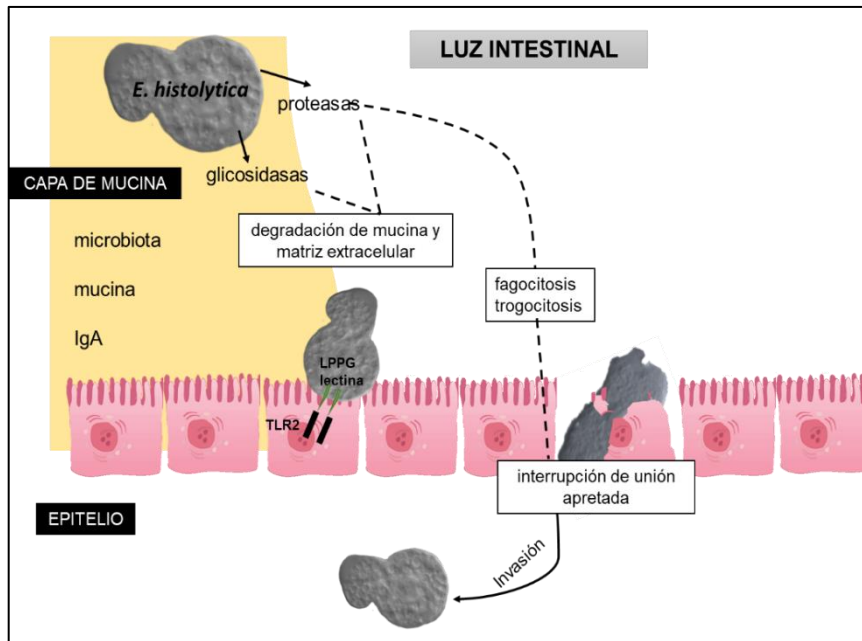


Figura 6. Mecanismos de invasión tisular por trofozoítos de *E. histolytica*. En la luz del intestino grueso, la capa de células epiteliales está cubierta por una capa de moco, que contiene mucina secretada, microbiota e IgA del hospedero. Las proteasas y glucosidasas secretadas por las amebas están implicadas en la degradación de la mucina y la matriz extracelular. La lectina Gal/GalNAc y LPPG en la superficie de la ameba se une a TLR2. La fagocitosis y trogocitosis están implicadas en la eliminación de las células y la invasión del tejido del hospedero. Tomada y modificada de Nakada-Tsukui y Nozaki (2016).

## 1.6. Inmunidad innata

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa contra los microorganismos, restringe la entrada de éstos al organismo y elimina o limita el crecimiento de muchos de ellos, que pueden ser capaces de colonizar los tejidos. La respuesta de esta inmunidad es inmediata y a diferencia de la inmunidad adquirida, para su activación, no se necesita de un contacto previo con el microorganismo (Tortora *et al.*, 2007).

### 1.6.1. Componentes celulares de la respuesta inmune innata.

Entre los componentes de la inmunidad innata están los de la primera línea de defensa: la piel y las mucosas; y los de la segunda línea de defensa: las células Natural Killer (NK), los fagocitos, la inflamación, la fiebre y las sustancias

antimicrobianas (Tortora *et al.*, 2007). La inflamación inicia con la quimiotaxis y activación de los leucocitos, así como con la extravasación de varias proteínas plasmáticas en las zonas de infección o daño. Las principales células efectoras de la inmunidad innata son los neutrófilos, también llamados leucocitos polimorfonucleares (PMNs), los fagocitos mononucleares (MO) y las células NK. Todas estas células detectan y tratan de eliminar a los microorganismos que han alterado las barreras epiteliales y penetrado en los tejidos o en la circulación. Los neutrófilos pueden eliminar a los patógenos utilizando mecanismos dependientes de NADPH oxidasa (especies reactivas de oxígeno) y mieloperoxidasa o proteínas antibacterianas (colagenasa, defensinas, lactoferrina y lisozima). Estas proteínas se liberan de los gránulos de los neutrófilos ya sea en fagosomas o hacia el medio extracelular (Borregaard, 2010).

Los PMNs son la población más abundante de los leucocitos circulantes y actúan en las primeras fases de las reacciones inflamatorias. Los MO circulan en la sangre y cuando son reclutados a los tejidos, se convierten en macrófagos. Éstos, además de fagocitar microorganismos, también ingieren células muertas del hospedero como parte de un proceso de limpieza después de la infección. Días después de este proceso, es decir en los estadios finales de la enfermedad, los macrófagos son las células dominantes (Abbas *et al.*, 2015).

El complemento es un sistema de aproximadamente 30 proteínas y reguladores de proteínas conocidas, algunas de las cuales circulan en la sangre o están unidos a la membrana celular. Dicho sistema puede ser activado por diversos microorganismos a través de tres principales vías (Tortora *et al.*, 2007).

La vía clásica del complemento se activa por la acción de complejos antígeno-anticuerpo. Las superficies microbianas como los polisacáridos de bacterias (LPS), de levaduras (zimosan) y de plantas (inulina) activan la *vía alterna*. La vía de las lectinas es iniciada por la proteína plasmática denominada lectina de unión a manosa o por las ficolinas las cuales reconocen los residuos de manosa terminales situados en las glucoproteínas y glucolípidos microbianos (Merle *et al.*, 2015).

Aunque las vías de activación del complemento difieren en el inicio, todas dan lugar a la proteólisis de la proteína del complemento C3, que genera productos biológicamente activos, denominados C3a y C3b. C3a, estimula la inflamación al actuar como sustancia quimiotáctica para los neutrófilos, mientras que C3b se une de forma covalente a la superficie de los microorganismos y sirve de opsonina para favorecer su fagocitosis. Por otra parte, las C5 convertasas generadas por cualquiera de las tres vías, inician la activación de los componentes finales del sistema del complemento, los cuales culminan en la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC), capaz de destruir a las células. (Abbas *et al.*, 2015).

Las tres principales funciones efectoras del complemento en la defensa del hospedero son: 1) lisis celular, 2) opsonización de partículas, es decir facilitar su ingestión por los fagocitos, y 3) actividad quimiotáctica que promueve la afluencia leucocitaria al sitio de activación (Abbas *et al.*, 2015).

Las anafilatoxinas C3a y C5a se liberan constantemente durante la activación del complemento. Estos pequeños péptidos (10-14 kDa) desempeñan un papel crítico en el inicio de la inflamación y la activación de células que expresan receptores de anafilatoxina. Para mejorar la inflamación, las anafilatoxinas reclutan células inmunitarias en el sitio de activación del complemento e inducen estallido oxidante en macrófagos, eosinófilos y neutrófilos. Además, C3a y C5a inducen la producción de histamina por basófilos y mastocitos que provocan vasodilatación (Merle *et al.*, 2015).

Los trofozoítos de *E. histolytica* están continuamente expuestos al sistema del complemento del suero del hospedero durante la invasión del colon y la diseminación hematogena al hígado. Durante dicha invasión, es posible que los neutrófilos sean atraídos hacia la zona donde se encuentra la ameba por medio de la actividad quimiotáctica de las proteínas de membrana presentes en *E. histolytica*, como las glucoproteínas (Chadee *et al.*, 1987; Salata *et al.*, 1989; Kretschmer *et al.*, 1985) y por los fragmentos C5a y C3a producidos por la activación del complemento en la fase fluida. La activación del complemento por dicho parásito puede ser iniciado por la proteasa de cisteína neutra extracelular de 56 kDa que escinde la cadena  $\alpha$  de C3 (Reed y Gigli, 1990).

La resistencia a la lisis celular mediada por el complemento se considera un factor de virulencia para bacterias y parásitos que invaden el torrente sanguíneo (Norris *et al.*, 1991). Los cultivos de *E. histolytica* provenientes de pacientes con amebiasis invasiva son resistentes a la lisis mediada por el complemento (Reed *et al.*, 1986). Estas amebas pueden resistir la lisis por complemento mediante dos vías: 1) a través de la degradación de C3a y C5a mediante proteasas de cisteína, (Reed y Gigli, 1990) y 2) por la inhibición de la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) mediante un epítipo que se encuentra en la adhesina EhGL, el cual muestra una alta similitud con el CD59 de humanos. CD59 de humanos es una proteína ampliamente distribuida en las membranas celulares que inhibe la inserción de C9 en el complejo C5b-8 (Braga *et al.*, 1992).

#### **1.6.1.1. Óxido nítrico y su actividad amebicida**

El NO $\cdot$  es una molécula de gas inestable que es sintetizado a partir de la oxidación de L-arginina. Esta oxidación es catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) la cual se encuentra en tres isoformas: dos constitutivas (neuronal nNOS y endotelial eNOS) y una inducible (inducible iNOS). El NO $\cdot$  ha mostrado tener potente actividad tumoricida y antimicrobiana tanto *in vitro* como *in vivo* (Nathan, 1992).

La generación de NO $\cdot$  por iNOS es una propiedad de las células activadas del sistema inmune como células dendríticas, NK, mastocitos y células fagocíticas que incluyen monocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos (Bogdan *et al.*, 2000). Estudios *in vitro* han demostrado que el NO $\cdot$  es una de las principales moléculas generadas por el hospedero con actividad amebicida (Lin y Chadee, 1992). Además, durante la infección hepática amebiana (IHA) en el ratón, se ha observado que tanto la expresión de iNOS en los leucocitos que rodean a la ameba, como el NO $\cdot$  circulante aumentan a partir de las 6 h y disminuyen de forma gradual hasta la desaparición de los parásitos (Jarillo-Luna *et al.*, 2002).

#### **1.6.1.2. Especies reactivas de oxígeno y su actividad amebicida**

Los neutrófilos activados experimentan un estallido oxidante, durante el cual el complejo NADPH-oxidasa se ensambla en las membranas fagosómicas y

plasmáticas, transfiriendo electrones al oxígeno molecular y produciendo superóxido ( $O_2^-$ ). A través de la catálisis realizada por la superóxido dismutasa (SOD), el  $O_2^-$  se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Esta molécula es un agente altamente oxidante y es utilizada por la enzima mieloperoxidasa (MPO) para producir ácido hipocloroso que es extremadamente tóxico para bacterias y amebas. Es posible que durante la interacción ameba-neutrófilo, este último produzca grandes cantidades de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  (Tseng y Liu, 2014). Además, es probable que *E. histolytica* resista la acción destructiva de  $NO\cdot$  y ROS por la expresión elevada de sus proteínas antioxidantes como: peroxiredoxina, flavoproteína A, superóxido dismutasa y ruberitina (Choi *et al.*, 2005).

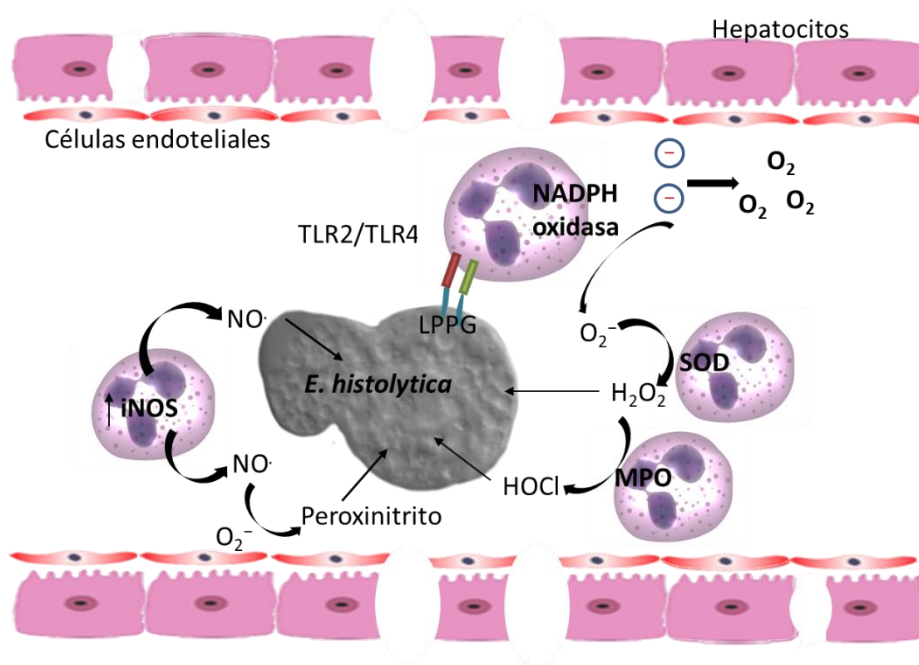


Figura 7. Activación de los neutrófilos. Los neutrófilos son activados debido al reconocimiento del LPPG por TLR-2 y TLR-4. Estos inician un estallido respiratorio que da como resultado un aumento en la producción de ROS y RNS. Tomado y modificado de Campos-Rodríguez *et al.*, 2016.

### 1.6.1.3. Marcadores del estrés oxidante

La actividad de la NADPH-oxidasa fagocítica es una de las principales fuentes endógenas de ROS y RNS en el organismo (Babior, 2000). Un incremento en la actividad de la NADPH oxidasa conlleva a una alta producción de oxidantes, (Cascales, 2005). El desbalance en la producción de ROS y la defensa antioxidante provoca el “estrés oxidante” que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos. La mayoría de los radicales libres son capaces de oxidar carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos, pudiendo producirse la peroxidación de las membranas lipídicas, la hidroxilación de las bases de los ácidos nucleicos y la oxidación de grupos sulfhidrilos.

El daño oxidante puede medirse de forma directa o indirecta (Pérez-Gastell y Pérez-Alejo, 2000):

-Métodos directos: medición de la concentración de agentes oxidantes, aunque ha resultado difícil, pues éstos tienen un tiempo de vida media muy corta, por ejemplo, el radical hidroxilo tiene una vida de  $10^{-10}$  segundos.

-Métodos indirectos: determinación de productos terminales de la acción oxidante y la medición de la concentración de antioxidantes.

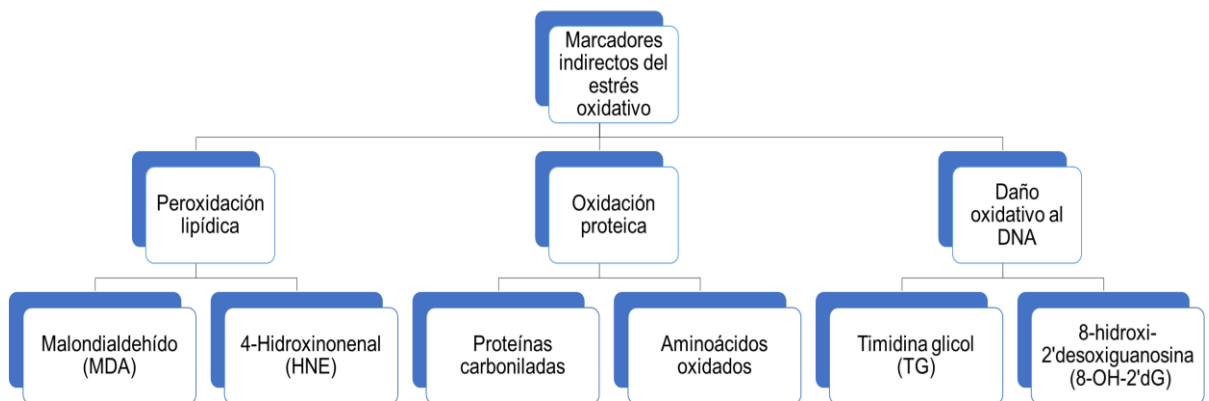


Figura 8. Marcadores moleculares de estrés oxidante.

## 2. Definición del problema

Diferentes cepas de ratón se han utilizado para explorar la patogenicidad amebiana y los mecanismos de resistencia natural a la infección hepática amebiana. La mayoría de ellos han utilizado diferentes vías de infección y diferentes cantidades de inóculo del parásito. Además, en todos ellos el tiempo de supervivencia del parásito es variable desde uno a siete días. Esta variación puede explicarse por las diferentes vías de infección o por la gran cantidad de parásitos inyectados en un área pequeña; la estandarización de la cantidad de inóculo es un requerimiento esencial para explorar los mecanismos de resistencia natural del ratón a la infección hepática amebiana. Estudios previos han sugerido que  $\text{NO}\cdot$  y ROS producidos por los neutrófilos, pudieran estar involucrados en la resistencia natural del ratón a la infección hepática amebiana (Jarillo-Luna *et al.*, 2002) (Seydel *et al.*, 2000). Sin embargo, esta propuesta es poco factible ya que las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (la ROS más tóxica para el parásito) producidas durante el estallido oxidante de los leucocitos ( $<30\mu\text{M}$ ) (Winterbourn y Kettle, 2013) no es tóxica para *E. histolytica* y la resistencia de este parásito al  $\text{NO}\cdot$  es mayor que el que presentan las células del hospedero (Pacheco-Yépez *et al.*, 2001).

Por otra parte, se sabe que el contacto del suero con la superficie externa de trofozoítos de *E. histolytica* conduce a la activación de complemento a través de la vía alterna y clásica (Meri *et al.*, 1985), llevando a la generación de péptidos quimiotácticos, los cuales desempeñan un papel crítico en el inicio de la inflamación y la activación de células que expresan receptores de anafilatoxina. Por otra parte, debido a que la intensidad de la reacción inflamatoria a un determinado estímulo puede presentar variaciones intra- e inter-especie (Jaeschke, 2006), es probable que durante la infección amebiana hepática experimental en diferentes especies animales, la intensidad del infiltrado leucocitario desempeñe un papel importante en la susceptibilidad a la infección. Es por esto que a continuación se plantea la siguiente pregunta científica:

¿La resistencia natural del ratón Balb/c a la infección hepática amebiana está determinada por la actividad amebicida del complemento, ROS y  $\text{NO}\cdot$ ?

### **3. Justificación**

En México la amebiasis constituye un grave problema de salud pública ya que es la parasitosis que presenta los más altos índices de morbilidad. Esta enfermedad impacta de manera negativa el desarrollo nacional debido al ausentismo escolar y laboral y afecta de manera importante la economía de las familias más desprotegidas. Por otra parte, a pesar de que los nitroimidazoles (antiamebianos) presentan alta eficacia terapéutica, su uso indiscriminado causa efectos adversos. Además, ante una eventual resistencia del parásito a estos fármacos, actualmente no se dispone de alternativas terapéuticas. El estudio de los mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica* HM1: IMSS usando el modelo de amebiasis hepática experimental en hámsteres ha revelado algunos potenciales blancos terapéuticos. Además, de manera similar, el conocimiento de los mecanismos de resistencia natural del ratón a la amebiasis hepática puede ayudar al descubrimiento de nuevos factores de patogenicidad del parásito y al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas lo cual favorecerá el control y eventual erradicación de la amebiasis endémica.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo general**

Evaluar la participación de complemento, ROS y NO $\cdot$  como mecanismos de resistencia natural a la amebiasis hepática experimental por la cepa HM1: IMSS de *E. histolytica* en el ratón Balb/c.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Evaluar la presencia de trofozoítos de *E. histolytica* en los cortes histológicos de hígado de los ratones infectados en los diferentes tiempos cohorte.
- Evaluar el tiempo de eliminación de *E. histolytica* en ratones inmunizados.
- Cuantificar el infiltrado leucocitario durante el desarrollo de la infección hepática amebiana en ratones Balb/c.
- Determinar la participación del complemento, NO $\cdot$  y ROS en la eliminación de *E. histolytica* del hígado del ratón Balb/c inmune.

## **5. Hipótesis**

### **5.1. Hipótesis nula**

La resistencia natural del ratón a la infección hepática experimental se debe a una escasa afluencia leucocitaria debido a la falta de activación de complemento.

### **5.2. Hipótesis alternativa**

La resistencia natural del ratón a la infección hepática experimental no se debe a una escasa afluencia leucocitaria debido a la falta de activación de complemento.

## **6. Diseño de la investigación**

### **6.1. Tipo de estudio**

Experimental, analítico, prospectivo y de cohorte.

### **6.2. Definición del universo**

96 ratones macho de la cepa Balb/c con un peso de 25 gr.

### **6.3. Tamaño de la muestra**

96 ratones macho de la cepa Balb/c.

### **6.4. Tipo de muestreo**

Aleatorio.

### **6.5. Criterios de selección**

#### **a) Criterios de inclusión**

Ratones macho sanos de la cepa Balb/c con un peso de 25 g, de 8 a 10 semanas de edad.

#### **b) Criterios de exclusión**

Ratones hembra, ratones machos que pertenezcan a una cepa diferente a la Balb/c y/o que presenten una enfermedad antes de la inyección de los parásitos.

#### **c) Criterios de eliminación**

Ratones machos que presenten alguna malformación física o enfermedad no asociada a lo establecido antes y durante la infección hepática amebiana.

#### **d) Definición del grupo control**

Grupo control conformado por ratones machos de la cepa Balb/c inyectados con  $0.25 \times 10^6$  amebas resuspendidas en 50  $\mu$ L de PBS, éstos se mantendrán con una dieta balanceada a base de pellets y agua a libre consumo (*ad libitum*) hasta el día de la eutanasia.

## **6.6. Variables y definición de variables**

**a) Independientes:** Edad y sexo.

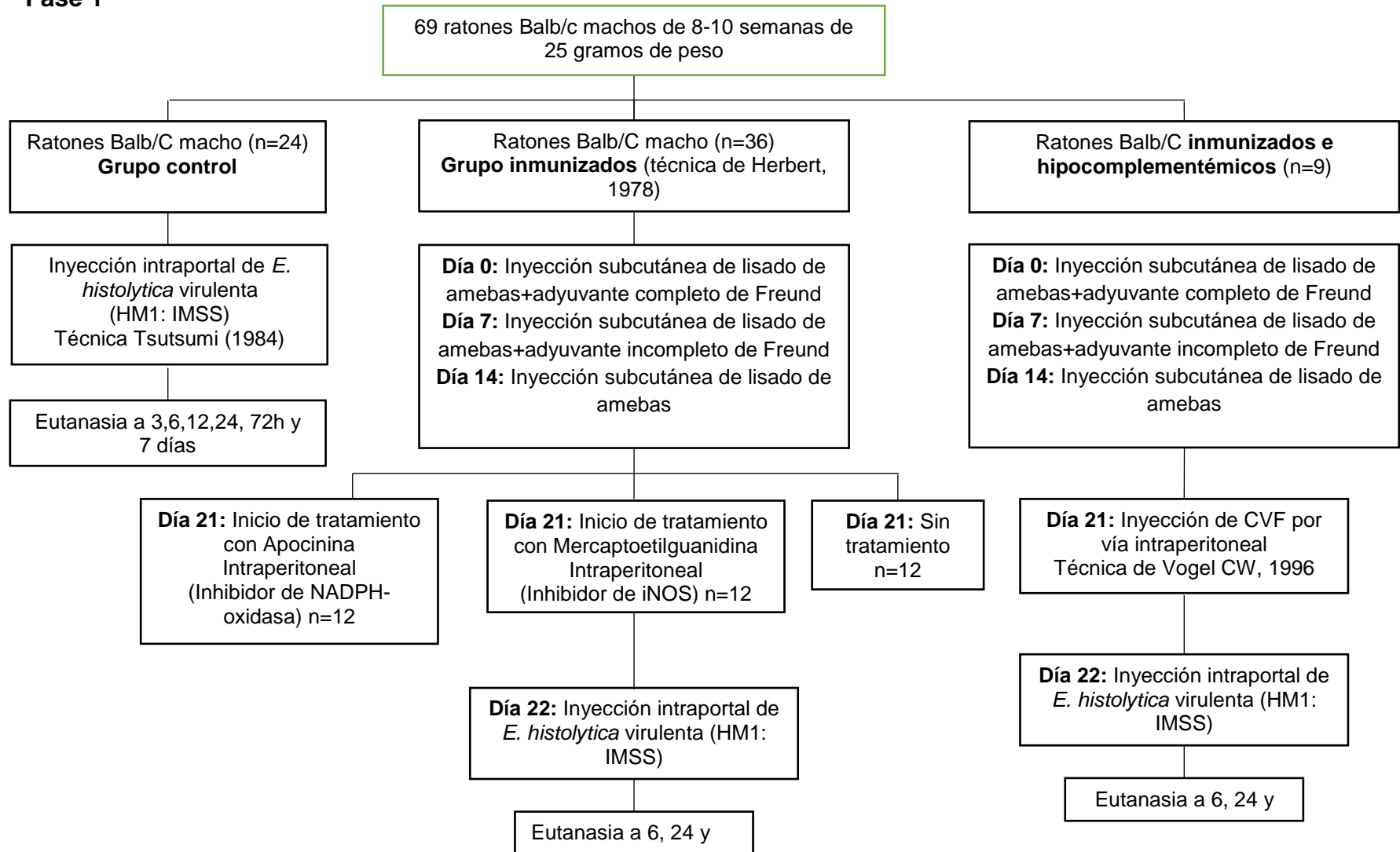
**b) Dependientes:** Número de leucocitos y número de trofozoítos.

## **6.7. Manejo estadístico de los datos y pruebas estadísticas**

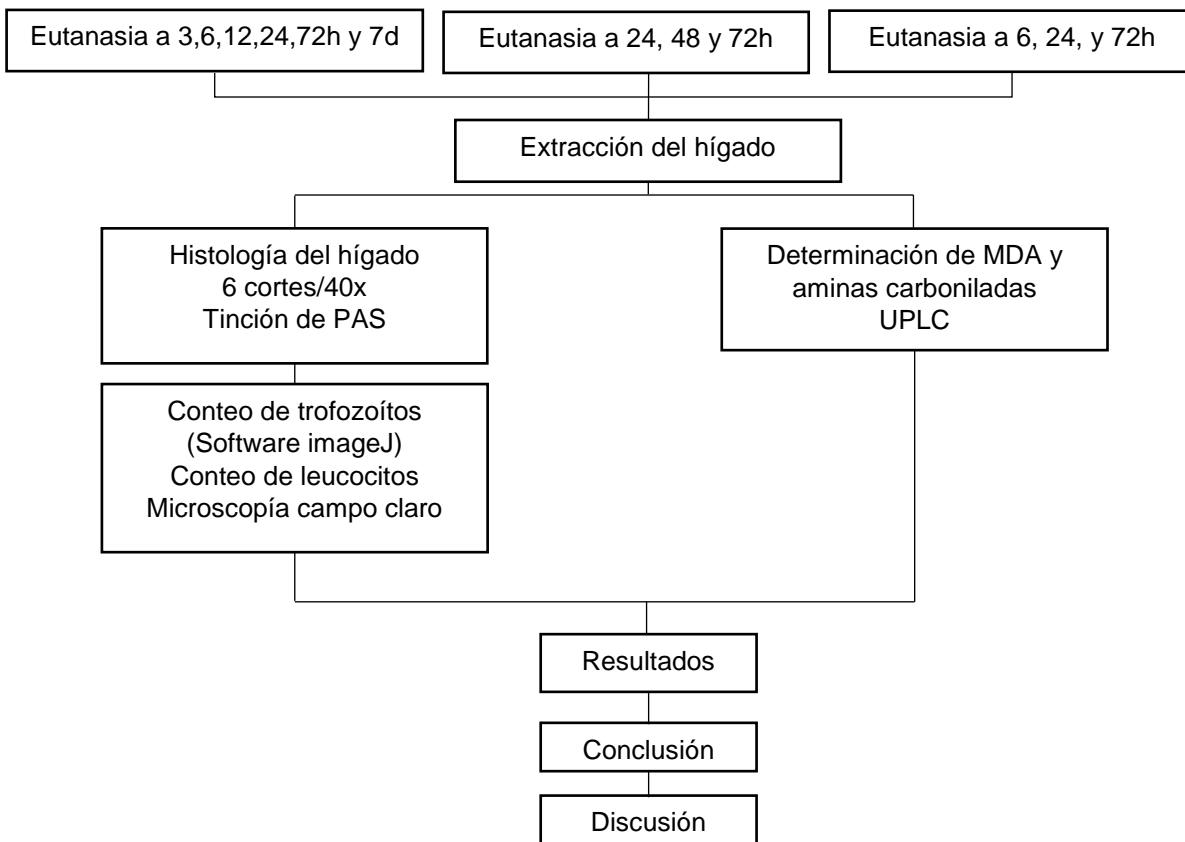
Se utilizará el análisis estadístico de ANOVA.

## 7. Diagrama de trabajo

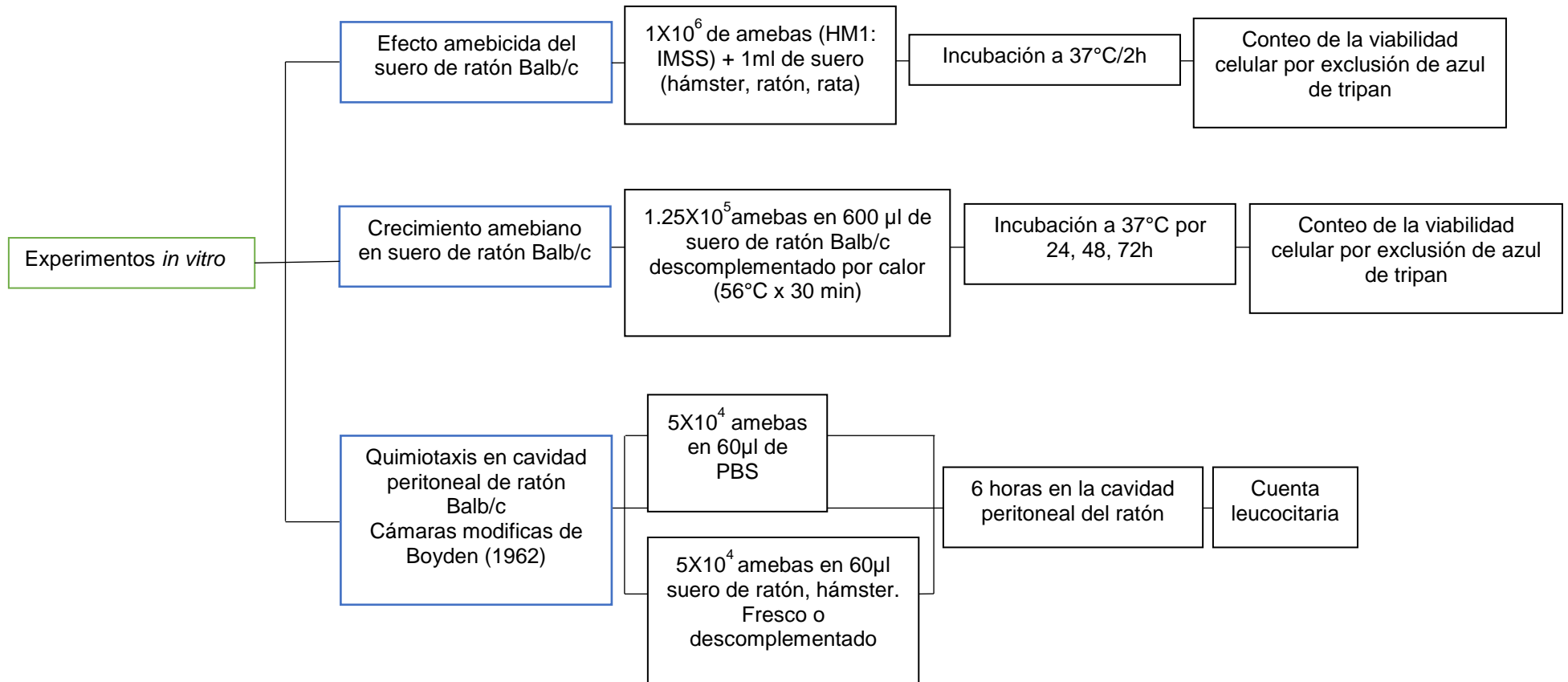
### Fase 1



## Fase 2 (continuación)



### Fase3



## **8. Metodología**

### **8.1. Obtención de la cepa y mantenimiento de la virulencia de *E. histolytica***

Cuatro hámsteres machos Sirio Dorado se anestesian con pentobarbital sódico (2mg/kg) por vía intraperitoneal. Se les realiza una laparotomía descubriendo la vena porta y se inyectan  $1 \times 10^6$  trofozoítos de amebas virulentas HM1: IMSS resuspendidas en 0.2 mL de PBS. Los hámsteres se dejan por 7 días con agua y alimento *ad libitum*. Posteriormente, los animales se eutanasian con sobredosis de anestesia (Pentobarbital sódico 12.6mg/100 gr), se extraen los hígados y se colocan en una caja Petri estéril. Éstos se cortan en pequeños fragmentos los cuales se depositan en tubos estériles de 8 mL que contienen 6 mL de medio TYI-S-33 y 30  $\mu$ L de una mezcla de antibióticos (estreptomocina 1gr, bencilpenicilina 8000UI y cefalexina 30mg/5mL). Enseguida los tubos se incuban a 37°C y después se realizan 4 cambios de medio cada 12 horas, las amebas se colocan en cajas de plástico estériles para su expansión y posterior uso en incubadora a 37°C, las amebas son viables por 72 horas.

### **8.2. Conteo de trofozoítos**

El azul tripán es un colorante aniónico, que permite diferenciar las células vivas de las muertas. La membrana plasmática de las células muertas es permeable a este colorante vital, mostrando un distintivo color azul bajo el microscopio. Mientras que, en las células viables, con membrana intacta, éste no se incorpora.

Los trofozoítos de *E. histolytica* (HM1: IMSS) se cultivan en medio TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1978) a 37°C en condiciones axénicas durante 72 h. Al finalizar este tiempo las amebas se colocan en tubos estériles de 50 mL, se centrifugan durante 5 min y se lavarán dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Después, en la cámara de Neubauer y utilizando azul tripán se determina el número de trofozoítos viables.

### **8.3. Inyección intraportal de trofozoítos de *E. histolytica* en ratones**

Un grupo de 24 ratones Balb/c de 25 gr de peso se anestesian con ketamina (80mg/kg)-Xilacina (5mg/kg). Enseguida, en la cavidad abdominal de los animales se

realiza una incisión, se expone la vena porta y se inyectan las amebas (cepa HM1: IMSS) resuspendidas en PBS ( $0.25 \times 10^6 / 50 \mu\text{L}$ ). Después de 3, 6, 12, 24 y 72 h de infección, 4 animales de cada grupo se eutanasian con sobredosis de anestesia (Pentobarbital sódico 12.6mg/100 gr). Los hígados se extraen, se cortan y se colocan en tubos con 20 mL de formol al 10% vol/vol en PBS. Una vez fijados, los hígados se incluyen en parafina, se obtienen cortes de  $5 \mu\text{m}$  y se les realiza tinción de PAS (Ácido Peryódico de Schiff). Finalmente, se fotografían 20 zonas con amebas e infiltrado inflamatorio de cada una de las laminillas (69) de los diferentes tiempos y grupos. Las fotografías se toman a 40X con microscopia de campo claro.

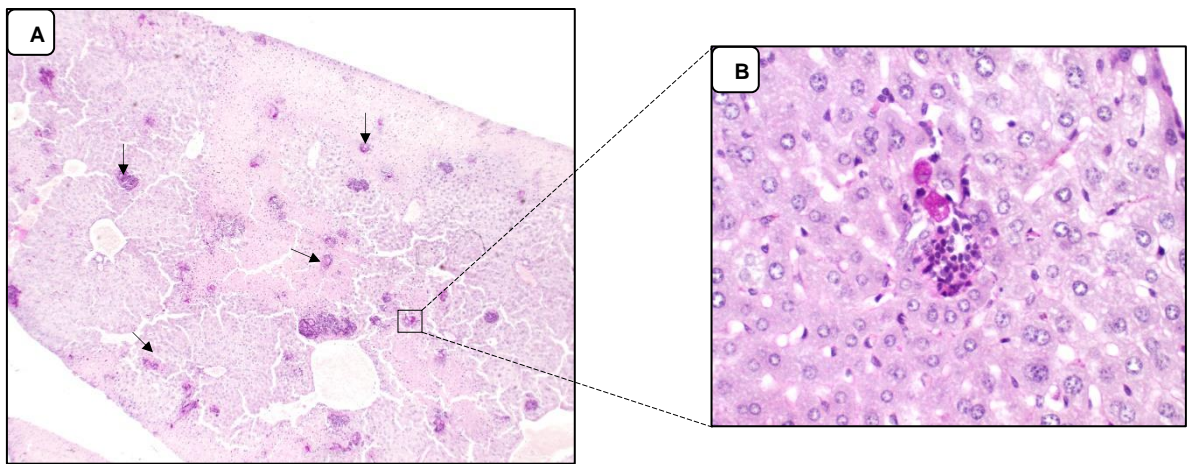


Figura 9. Zonas fotografiadas a 40X en los hígados de ratón con infección hepática amebiana.

### 8.3.1. Tinción de PAS

#### Fundamento:

La tinción de PAS se emplea para determinar la presencia de moléculas como el glucógeno, glucoproteínas y glucosaminoglucanos. También sirve para identificar membranas basales y fibras reticulares. La reacción se debe a que el ácido peryódico oxida las uniones carbono-carbono de los carbohidratos donde hay hidroxilos adyacentes y grupos amino primarios o secundarios, cediendo aldehídos que pueden reaccionar con el reactivo de Schiff, responsable de la coloración roja-púrpura intenso, provocada por la unión de leucofucsina con dialdehído (Carson y Hladik, 2009).

#### **8.4. Efecto amebicida del suero de ratón Balb/c *in vitro***

Los trofozoítos virulentos ( $1 \times 10^6$ ) de la cepa HM1: IMSS obtenidos de cultivos celulares se incuban con 1ml de sueros de ratón (Balb/c), hámster (Sirio Dorado) y rata (Wistar) durante 2h a 37°C en mezclador. Después de este periodo, la viabilidad celular se determina por exclusión de azul de tripan en cámara de Neubauer (Ver 8.2).

#### **8.5. Crecimiento amebiano *in vitro* en suero de ratón Balb/c**

El crecimiento amebiano se realiza en viales de vidrio estériles (12X32 mm) que contienen  $1.25 \times 10^5$  trofozoítos en 600  $\mu$ L de suero de ratón Balb/c, previamente descomplementado por calor (56°C x 30 min) y esterilizado por filtración (tamaño de poro de 0.22  $\mu$ m). Enseguida, los viales se incuban a 37°C y después de 24, 48 y 72h se determina la viabilidad amebiana con azul de tripan.

#### **8.6. Quimiotaxis en cavidad peritoneal de ratones Balb/c inducida por la mezcla de suero fresco y descomplementado de ratón y hámster en presencia de trofozoítos de *E. histolytica***

Fundamento: los ensayos de quimiotaxis miden la capacidad de movimiento de los leucocitos en una dirección determinada, atraídos por un factor quimiotáctico. Se utiliza una modificación de la cámara de Boyden, en la parte inferior de la cámara se sitúan las sustancias quimiotácticas (amebas+sueros) sellados con una membrana (Boyden, 1962), y en la parte superior las células que serán quimioatraídas.

Cuatro grupos de 3 ratones Balb/c cada uno de 8-10 semanas de edad, se anestesiaron con ketamina (80mg/kg)-Xilacina (5mg/kg). En la cavidad peritoneal de cada ratón se les coloca 2 tubos de vidrio cubiertos con una membrana de policarbonato con poros de 3 $\mu$ m Lot #W8220003 Neuro Probe, Inc. enseguida, se aseguran con un anillo elástico. Los tubos de cada grupo contienen  $5 \times 10^4$  trofozoítos resuspendidos en 60  $\mu$ L de 1) suero de ratón descomplementado, 2) suero de hámster descomplementado, 3) suero de ratón fresco y 4) suero de hámster fresco. Las membranas y los tubos fueron previamente lavados y esterilizados (121°C/15min). Después de 6 h, los tubos se extraen de la cavidad peritoneal de los

animales, se enfrían con hielo y se toman 20  $\mu\text{L}$  diluidos en 380  $\mu\text{L}$  de solución de Türk. Finalmente con la cámara de Neubauer se realiza el conteo de leucocitos a 40X.

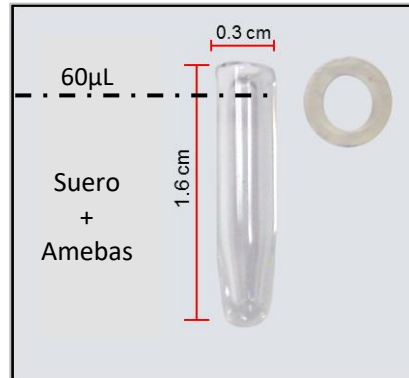


Figura 10. Dispositivo diseñado para la realización de quimiotaxis *in vivo*. Tubos de vidrio cubiertos con una membrana de policarbonato y sellada con un anillo elástico.

### 8.7. Infección hepática amebiana en ratones inmunizados

Fundamento: Los antígenos se administran junto con un adyuvante. Se utiliza el adyuvante completo de Freund en la primera dosis, compuesto por bacilos de *Mycobacterium* muertos, en suspensión. La presencia de las micobacterias activa a los macrófagos e induce la formación de granulomas locales. Mientras que el adyuvante incompleto, que consiste en una mezcla de aceite mineral y un emulsificador, se usa para las dosis de refuerzo. Ambos adyuvantes permanecen en el sitio de inyección y el inmunógeno se libera gradualmente, manteniendo así un estímulo prolongado que es necesario para estimular la producción de anticuerpos de alta afinidad (Herbert, 1978).

Se inmunizan 36 ratones Balb/C durante 3 semanas: 1) en la primera se les inyecta por vía subcutánea 150  $\mu\text{L}$  (distribuido en las piernas y lomo) de lisado de amebas más el adyuvante completo de Freund, 2) en la segunda se les inyecta lisado de amebas más el adyuvante incompleto, y 3) en la tercera solo se les inyecta lisado de amebas. Una semana después, a todos los ratones se les inyectan  $0.25 \times 10^6$  amebas virulentas en la vena porta. Doce ratones corresponden a los controles y los restantes son tratados con Apocinina y con MEG. Después de 6, 24 y 72h, cuatro

animales de cada grupo se eutanasia con sobredosis de anestesia (Pentobarbital sódico 12.6mg/100 gr), y sus hígados se procesan para los cortes histológicos.

### **8.7.1. Tratamiento con Apocinina y MEG en ratones inmunizados**

**Apocinina:** Es un potente inhibidor de NADPH oxidasa.

**Mercaptoetilguanidina:** Es un inhibidor selectivo de la NO<sup>·</sup> sintasa inducible (iNOS) y también es eficaz como un secuestrante de peroxinitrito.

En los ratones previamente inmunizados, el tratamiento con los fármacos inicia 8 h antes de la inyección intraportal de las amebas y continúa cada 8h hasta la eutanasia del animal.

En los ratones de 25 gr de peso la dosis de apocinina es de 0.41mg/8h y la de mercaptoetilguanidina de 0.10mg/8h.

### **8.7.2. Evaluación de la actividad hipocomplementémica del factor hipocomplementémico de veneno de cobra (CVF)**

Mecanismo de acción del CVF: El factor hipocomplementémico del veneno de cobra es un homólogo funcional del componente del complemento C3b, un fragmento activo de C3. Similar a C3b, el CVF se une al factor B del suero en presencia de Mg<sup>2+</sup>. El complejo resultante tiene actividad débil C3-convertasa, pero la posterior escisión del factor B por factor D da lugar a CVFBb, una convertasa C3 eficiente dirigida al mismo enlace escindible de C3 como auténticas convertasas del complemento. A diferencia de C3bBb que su vida media es de 1.5 min a 37°C, CVFBb es muy estable con una vida media de 7 h a temperatura ambiente (Krishnan *et al.*,2009).

El CVF se purifica a partir del veneno de cobra *Naja haje* utilizando cromatografía de filtración molecular e intercambio iónico, como lo describe Krishnan *et al.*, (2009). Debido a que el complemento de la rata es completamente letal para *E. histolytica*, se evalúa la actividad hipocomplementémica del CVF determinando la capacidad amebicida del suero de rata inyectada previamente (24h) con CVF por vía

intraperitoneal. Para esto, se incuban  $0.5 \times 10^6$  amebas en 1mL de suero de rata normal y suero de rata con CVF durante 2h a 37°C. Después la viabilidad amebiana se determina con azul tripán (Ver 8.2).

### **8.7.3. Infección hepática amebiana en ratones inmunizados e hipocomplementémicos**

A 9 ratones previamente inmunizados, se les inyecta CVF por vía intraperitoneal y después de 24h,  $0.25 \times 10^6$  amebas virulentas se inyectan en la vena porta. Enseguida, después de 24, 48 y 72h, cuatro animales de cada grupo se eutanasian con sobredosis de anestesia (Pentobarbital sódico 12.6mg/100 gr), se realizan cortes histológicos de 5mm del hígado y se les realiza tinción de PAS.

### **8.8. Desarrollo del algoritmo informático utilizando el software imageJ para el conteo automático de leucocitos**

Se seleccionan 855 fotomicrografías de 6, 24 y 48 h postinfección. Se utiliza el software *ImageJ 1.47v National Institutes of Health, USA, JAVA 1.6.0\_20 (64-bit)* para desarrollar un algoritmo (método de instrucciones, con un orden lógico, que permite introducir datos, procesarlos y arrojar resultados), primero se seleccionan los focos inflamatorios aislados y luego el programa detecta específicamente los leucocitos, los cuales son contados automáticamente. Los conteos son validados comparándolos con el conteo visual, lo cual muestra una correlación cercana a uno (Anexo 5).

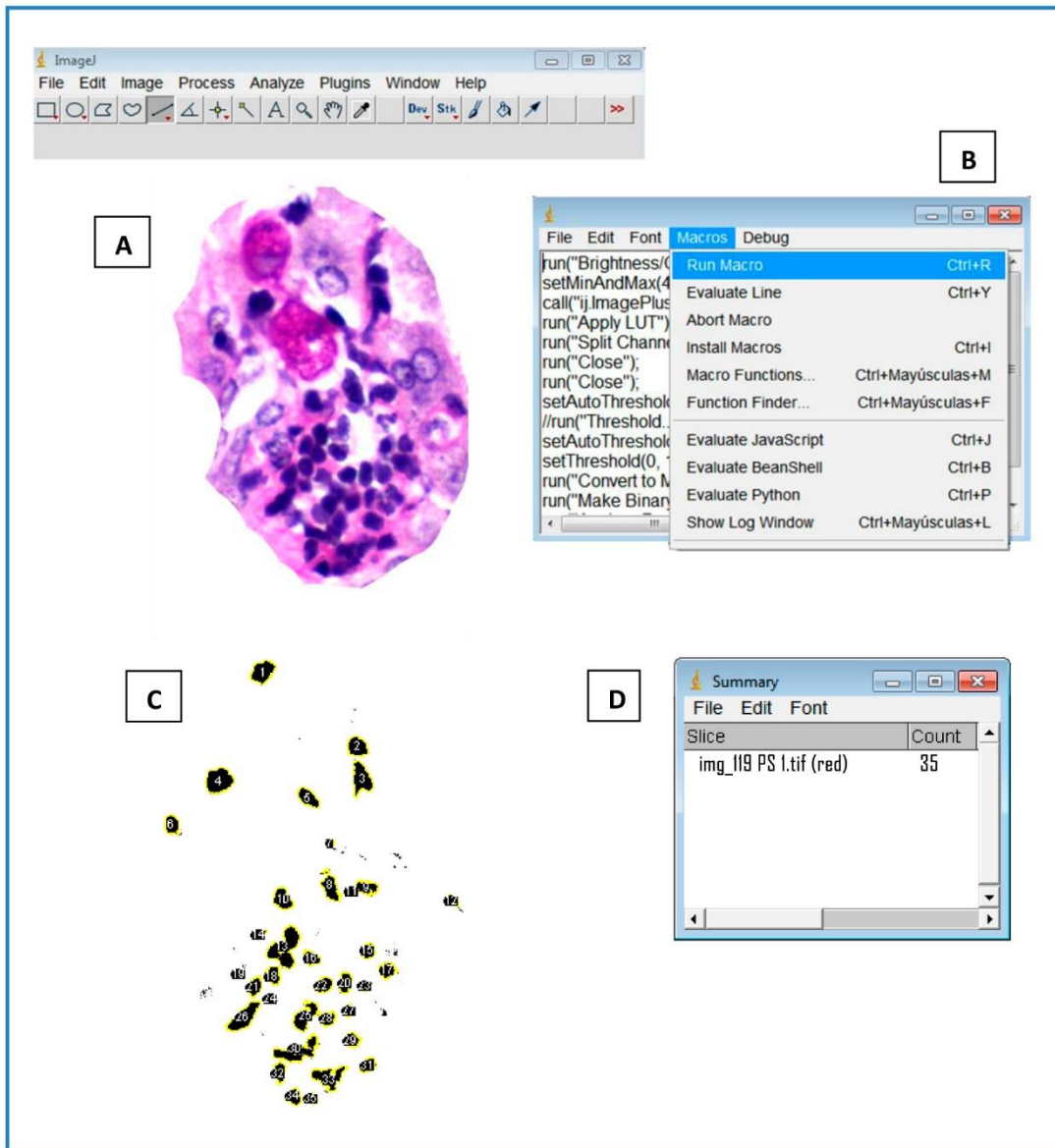


Figura 11. Algoritmo para la cuenta de leucocitos, utilizando el *software Image J*. A) Imagen a analizar. B) Con el comando *Run Macro* se ejecuta el algoritmo. C) Resultado gráfico del análisis de la imagen. D) Resultado cuantitativo del análisis de imagen (cuenta 35).

### 8.8.1. Conteo de leucocitos

A las 450 fotomicrografías tomadas a 40X de los cortes de hígado de los ratones infectados durante los diferentes tiempos cohorte, se les realiza la cuenta automática de los leucocitos que rodean al menos una ameba.

### **8.9. Conteo de amebas bien conservadas**

El conteo de amebas bien conservadas se realiza por microscopía de campo claro, observando los cortes histológicos a 40X (69 laminillas).

### **8.10. Cuantificación de Malondialdehído**

El ácido tiobarbitúrico al reaccionar con algunos productos de la peroxidación de lípidos como el MDA forma un aducto que se detecta por fluorescencia.

Los niveles de MDA se cuantificaron por el método modificado de Sim *et al.*, (2003). A 25µL de muestra se le agregan 175µL de agua y 150 µL de NaOH (2.0mol/L). Se agita y se incuba a 60°C por 20 min. La muestra hidrolizada se acidifica con 200 µL de ácido orto fosfórico (10%), se mezclan y se centrifugan a 15000 g a 4°C por 10 min. Se decanta el sobrenadante en tubo Eppendorf y se le agregan 50 µL de ácido tiobarbitúrico (0.6%), se mezcla y se incuba a 90°C por 30 min. Finalmente el tubo se centrifuga a 20000 g a 4°C por 20 min y se filtra a través de una membrana 0.22 µm de PVDF y 10µL de esta muestra se inyecta en el cromatógrafo UPLC. Se detecta el aducto en fluorescencia a una longitud de excitación de 527 nm y de emisión 551 nm. La concentración de MDA se calcula de acuerdo con una curva estándar preparada a partir de 1,1,3,3-tetrametoxipropano.

### **8.11. Cuantificación de aminas carboniladas**

#### **Fundamento:**

Cada molécula fluorescente tiene un espectro de excitación y emisión característico, que puede usarse para separar e identificar moléculas, así como para diferenciar entre sustituciones y conformaciones de la misma molécula (Andersen y Mortensen, 2008). En el caso de aminas carboniladas, muestran fluorescencia con excitación máxima en 365nm y máximo de emisión a 450nm. La cantidad de proteína en las muestras se determinó detectando la absorbancia en UV a 220 nm. Además, se cuantificaron las aminas carboniladas por el método modificado de Gakamsky *et al.*, (2008). Para esto, se toman 500µL de la muestra homogenizada, se agrega 1 mL de buffer de fosfatos 100mM pH 7.4 y 5 mL de éter etílico y se agita vigorosamente en vortex por 10 seg. Enseguida se centrifuga a 3000 g por 5 min, se separa la fase

acuosa y se desecha la fase orgánica. Después, la fase acuosa se seca a 4°C durante toda la noche y la muestra se centrifuga a 20000 g por 10 min. Finalmente, el sobrenadante se filtra con una membrana de PVDF de 0.22 µm y se inyectan 10 µL en el equipo de cromatografía UPLC.

#### **8.12. Análisis estadístico**

Los resultados son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) y se evalúan e interpretan mediante análisis estadístico de ANOVA.

#### **8.13. Control de calidad**

Se utilizan las técnicas establecidas por el laboratorio de patología de la Unidad de Medicina Experimental de la Universidad Nacional Autónoma de México.

#### **8.14. Medidas de seguridad**

Las medidas de seguridad son acatadas bajo la NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección Ambiental-Salud ambiental- Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos- Clasificación y Especificación de Manejo.

El manejo de los animales de laboratorio se realiza de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”.

### **9. Organización**

#### **9.1. Recursos humanos**

pQFB María Azucena Cortes Herrera

Dr. Alfonso Olivos García

Biol. Mario Nequiz Avendaño

M. en C. Edith Mendoza Tenorio

Técnico Marco Elias Gudiño Zayas

M. en C. José Ángel Francisco Flores Hernández

## **9.2. Recursos materiales**

- Guantes, cubrebocas, jeringas de 1mL, tubos Eppendorf, gradillas
- Tubos estériles de 8, 15, 50 mL
- Pipetas automáticas de 10, 20, 50, 100, 1000  $\mu$ L
- Cajas de cultivo
- Campana de flujo laminar (Clase II)
- Anestesia (Pentobarbital sódico, Ketamina y Xilaxina)
- Material de disección, gelfoam, hilo seda, gasas, algodón
- Tubos de vidrio de 1.6 cm X 0.3 cm
- Incubadora Heraeus
- Centrifuga ST8R
- Agitador Vortex Mixer
- Microscopio de epifluorescencia
- Equipo de cromatografía UHPLC
- Histoquinete
- Microtomo
- Cajas coplin de vidrio
- Portaobjetos y cubreobjetos

## **9.4. Recursos financieros**

Los recursos financieros serán aportados por el proyecto de CONACyT 247430 y PAPIIT IN214617 (R.P.T).

## 10. Resultados

### 10.1. Mantenimiento de la virulencia de la cepa HM1: IMSS de *E. histolytica*

Para mantener la virulencia de las amebas se recuperan cada mes trofozoítos de *E. histolytica* del absceso hepático amebiano del hámster Sirio Dorado (Ver 8.1). La virulencia de las amebas utilizadas en este estudio fue constante, ya que en todos los casos la recuperación de amebas es posible y provino de lesiones macroscópicas hepáticas extensas (Fig. 12).

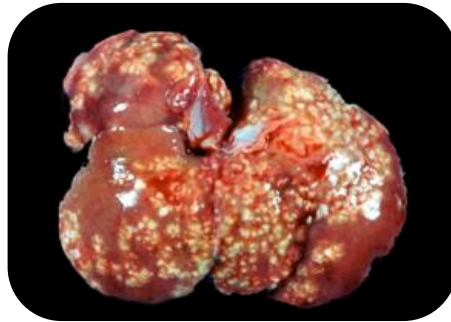


Figura 12. Aspecto macroscópico de un hígado de hámster Sirio Dorado infectado con amebas. Se puede apreciar hepatomegalia y múltiples lesiones puntiformes distribuidas en todos los lóbulos.

Cabe mencionar que cuando se inoculan los ratones de los diferentes grupos con los trofozoítos, se inyectan hámsteres para confirmar la virulencia y como control positivo al absceso hepático amebiano, pues es bien sabido que es un animal susceptible a este proceso infeccioso. El análisis microscópico de los cortes de hígado de hámster se caracteriza por múltiples amebas bien conservadas rodeadas por abundante infiltrado inflamatorio durante todo el desarrollo de la infección (Fig. 13), dicho proceso infeccioso comienza justo después de la inoculación. A las 3h de infección se observa mínima destrucción tisular, la lesión adopta una configuración redondeada con la ameba en el centro, rodeada por algunos leucocitos (Fig. 13A). Después de 6h de infección (Fig. 13B y 13C), la cantidad de infiltrado inflamatorio aumenta; principalmente se observan PMNs, células mononucleares, y algunos restos nucleares y citoplasmáticos. A las 24h se observa un mayor daño en el tejido, las lesiones son irregulares y la limitación con los hepatocitos es poco precisa. El número de trofozoítos en las lesiones aumenta y las amebas se localizan

principalmente en la periferia de la lesión (Fig. 13D, E, F). Después de las 72 horas se observan extensas áreas necróticas (Fig. 13E, F).

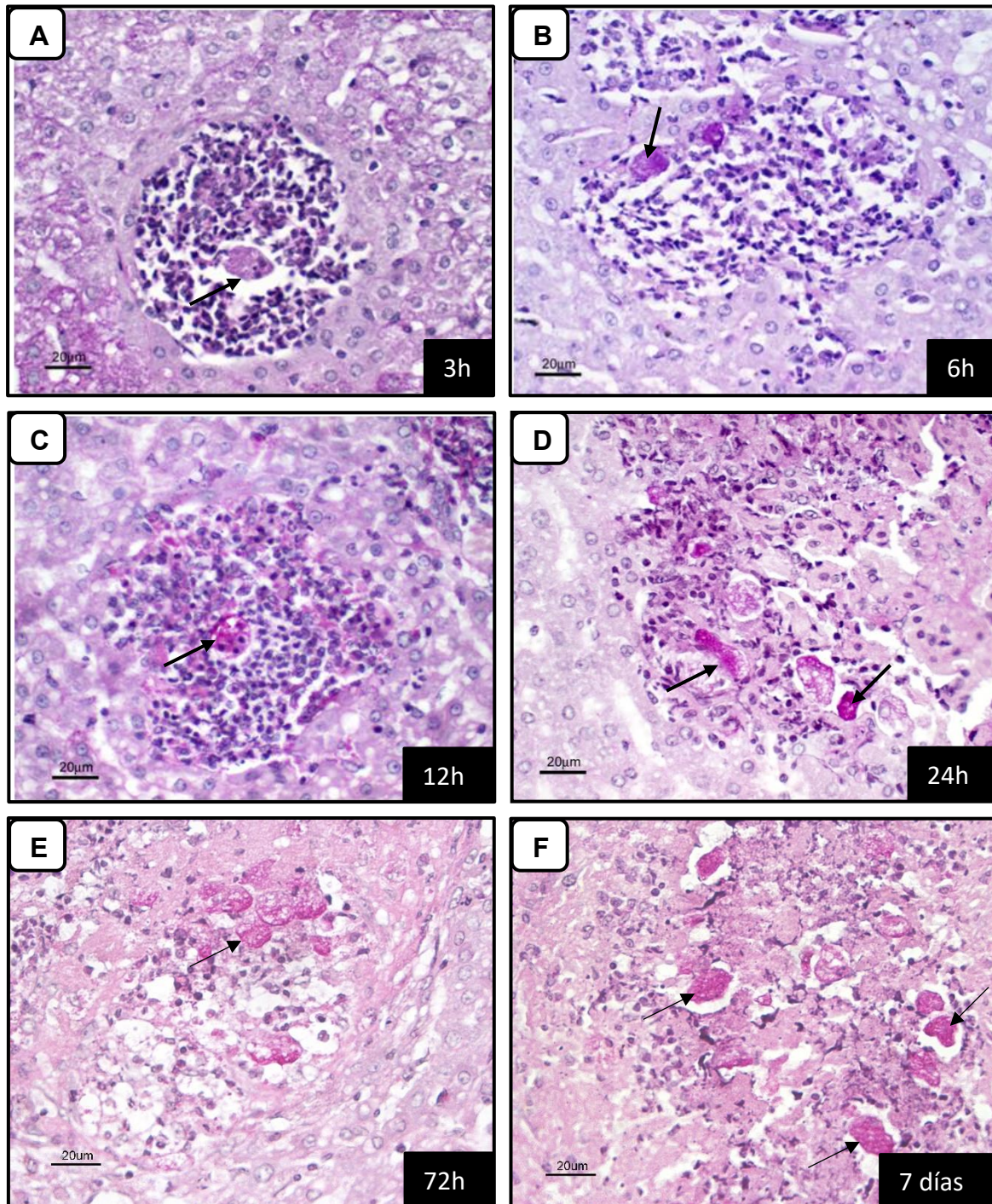


Figura 13. Aspecto microscópico de las etapas del absceso hepático amebiano experimental de hámster. En la etapa aguda se observan amebas rodeadas de abundantes PMNs sin necrosis (A-C). Después de 24h y hasta los 7 días se observan múltiples amebas bien conservadas acompañadas de

inflamación intensa y necrosis (D-F). Las flechas señalan trofozoítos bien conservados. Tinción de PAS, microscopia de campo claro, 40X.

## 10.2. Proceso infeccioso hepático amebiano en ratones grupo control

Macroscópicamente, la infección hepática amebiana en ratones (Balb/c) no muestra grandes cambios durante las etapas iniciales del proceso infeccioso. Durante las etapas tardías (7 días) los hígados de los ratones no presentan hepatomegalia ni daño tisular, y se observa macroscópicamente como un hígado normal (Fig. 14).

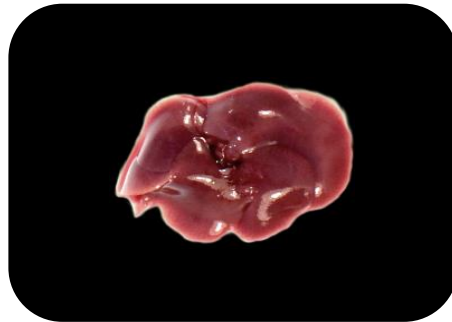


Figura 14. Infección hepática amebiana en ratón Balb/c (7 días). No se observan lesiones ni daño tisular.

Microscópicamente en los cortes histológicos se puede observar en el hígado de ratón a las amebas rodeadas por escasas células inflamatorias (Fig. 15A, B, C, D). Después de 3h (Fig. 15A) de infección y hasta las 72h (Fig. 15C), las amebas son visibles en áreas isquémicas, demostrado por la falta de perfusión de la tinta china (Pérez-Tamayo, 1992); también se observan áreas con necrosis de tipo coagulativa (no se pierde la arquitectura normal del tejido) similar a lo reportado por Velazquez *et al.*, (1998). A las 12, 24, 48, 72h se observan hepatocitos pequeños y pálidos con núcleos picnóticos. Es importante mencionar que, en estas condiciones, la ameba no puede destruir las células isquémicas del hígado, a pesar de estar en contacto directo con estas (Fig. 15 A-E). Además, en el hígado de ratón la ameba se observa hasta los 3 días (Fig. 15E). Finalmente a los 7 días del proceso infeccioso solamente se pueden apreciar lesiones residuales, en donde el tejido dañado muestra características de reparación (Fig.15F).

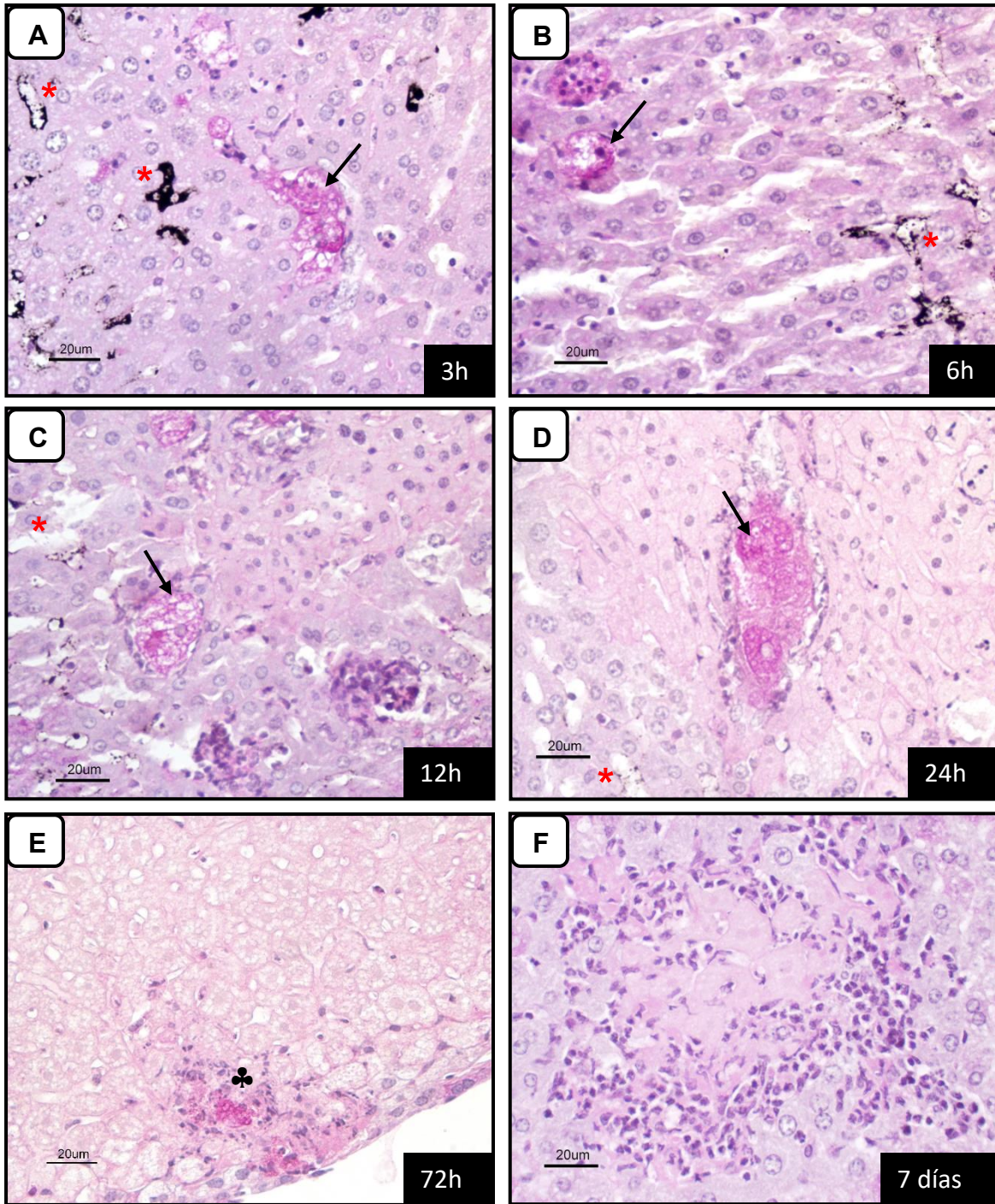
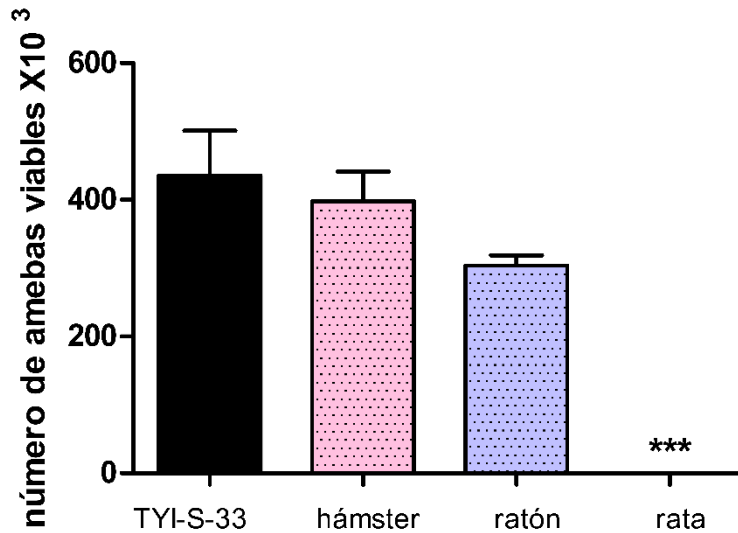


Figura 15. Cambios histológicos de la infección hepática amebiana en ratón. De 3 a 24h se observan amebas bien conservadas (flechas) con escaso o nulo infiltrado inflamatorio (A-E), a las 72h se observan restos de amebas (♣) La isquemia, demostrada por la falta de perfusión de tinta china (\*), está presente desde las 3h. Después de siete días (F), solamente se observan pequeñas áreas de lesión residual sin amebas. Tinción de PAS. Aumento 40X.

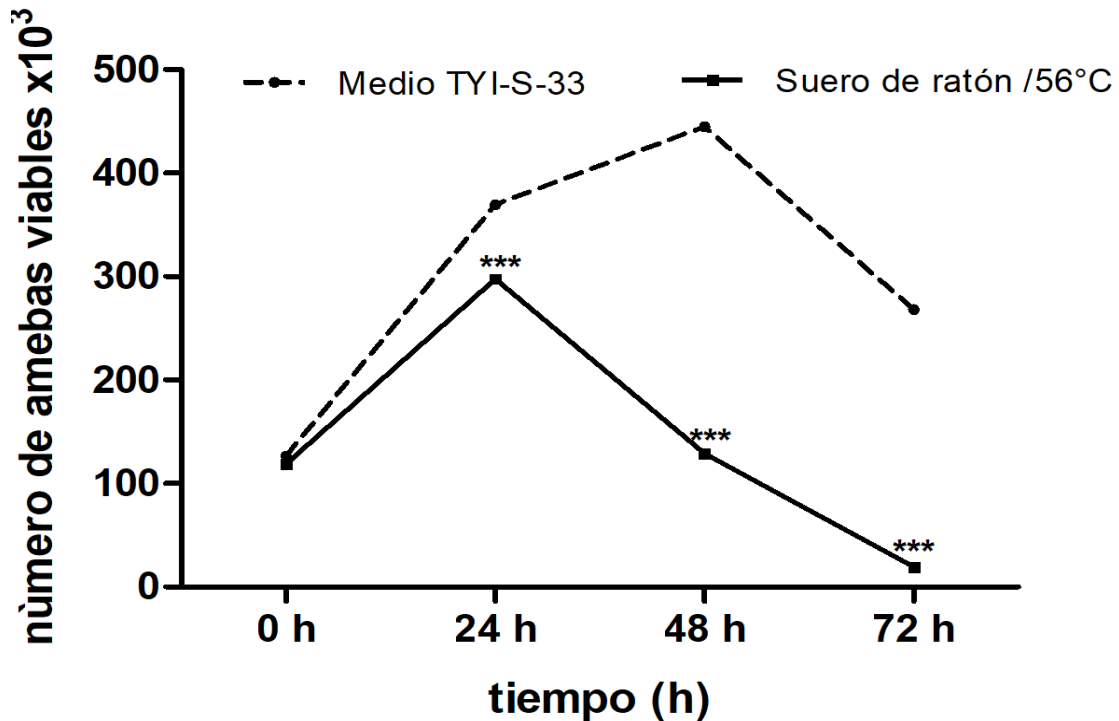
### 10.3. Efecto amebicida *in vitro* del suero con complemento de hámster, ratón y rata



Gráfica 1. Las barras representan la media (n=4) y EEM de la actividad lítica de los sueros frescos de hámster, ratón y rata sobre *E. histolytica*. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con post-prueba estadística Dunnett. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (amebas en medio TYI-S-33) como se indica, \*\*\* $P \leq 0.001$ .

El medio TYI-S-33 representa las condiciones ideales de desarrollo después de 2h de incubación a 37°C. El suero de rata (Wistar) demuestra el efecto amebicida del complemento del 100%. Se observa que el suero de hámster (Sirio Dorado) y de ratón (Balb/c) no tienen diferencias significativas con respecto al grupo control. Aunque se observa una tendencia a la disminución.

#### 10.4. Proliferación de la ameba *in vitro* en suero descomplementado de ratón Balb/c

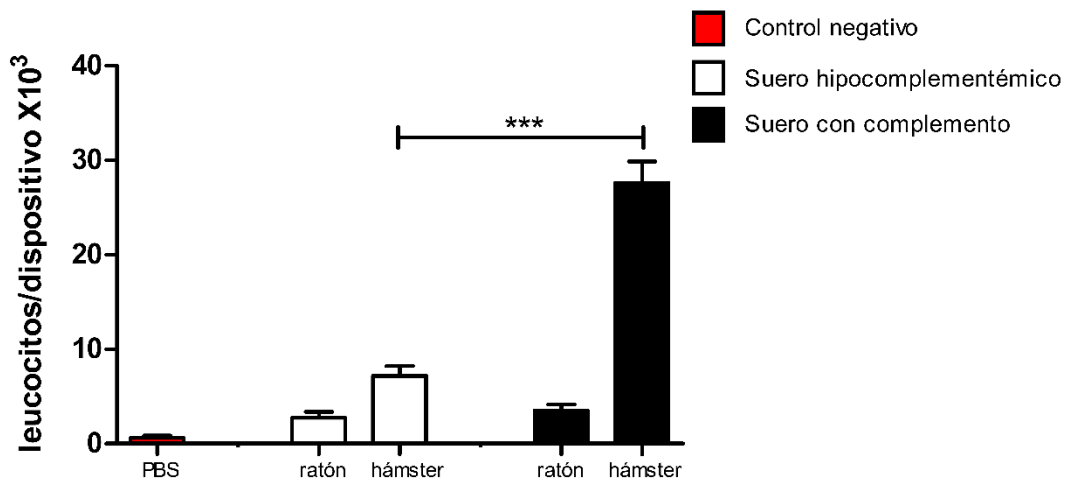


Gráfica 2. Cada punto representa la media de los valores  $\pm$  EEM ( $n=3$ ) del número de amebas viables *in vitro* en suero de ratón. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con una prueba post hoc Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al medio de cultivo (TYI-S-33) como se indica; \*\*\* $P \leq 0.001$ .

Después de 24h de incubación *in vitro*, el suero de ratón permite la replicación amebiana, sin diferencia significativa con respecto al control (Medio TYI-S-33). Sin embargo, a las 48 y 72h, se observa una pérdida gradual en el número de amebas viables con respecto al grupo control. Observando a las 48h una caída en el número de amebas viables en un 71.5% y a las 72h un 93%.

### 10.5. Actividad quimiotáctica del complemento de hámster Sirio Dorado y ratón Balb/c en la cavidad peritoneal de ratón (6h).

Para demostrar la atracción de los leucocitos del ratón por las amebas resuspendidas en suero de ratón y hámster fresco o descomplementado. Se utilizaron cámaras modificadas a partir de las descritas por Boyden (1962). Las pequeñas cámaras de vidrio estériles con amebas-PBS, no estimulan la quimiotaxis de los leucocitos cuando se introducen en la cavidad peritoneal de los ratones (control negativo metodológico).



Gráfica 3. Las barras representan la media de leucocitos quimioatraídos por la presencia de suero de ratón y hámster fresco y descomplementado (n=6) y el EEM. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA una vía con una prueba post hoc Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos como se indica; \*\*\* $P \leq 0.001$ .

En la gráfica 1 se observa la actividad quimiotáctica *in vitro* de los diferentes grupos de trabajo, las amebas en presencia de suero descomplementado de ratones y hámsteres muestran una actividad quimiotáctica baja; pero en presencia de complemento existe una quimiotaxis significativa solamente con suero de hámster. Observando un aumento de 7 veces más con respecto al suero de ratón.

## 10.6. Histología del proceso infeccioso hepático amebiano del ratón inmunizado

Se promueve la activación de la vía clásica del complemento estimulando la producción de anticuerpos anti-ameba mediante previas inyecciones de lisados de amebas más adyuvante, enseguida se inyectan amebas en la vena porta de dichos ratones (Ver 8.7).

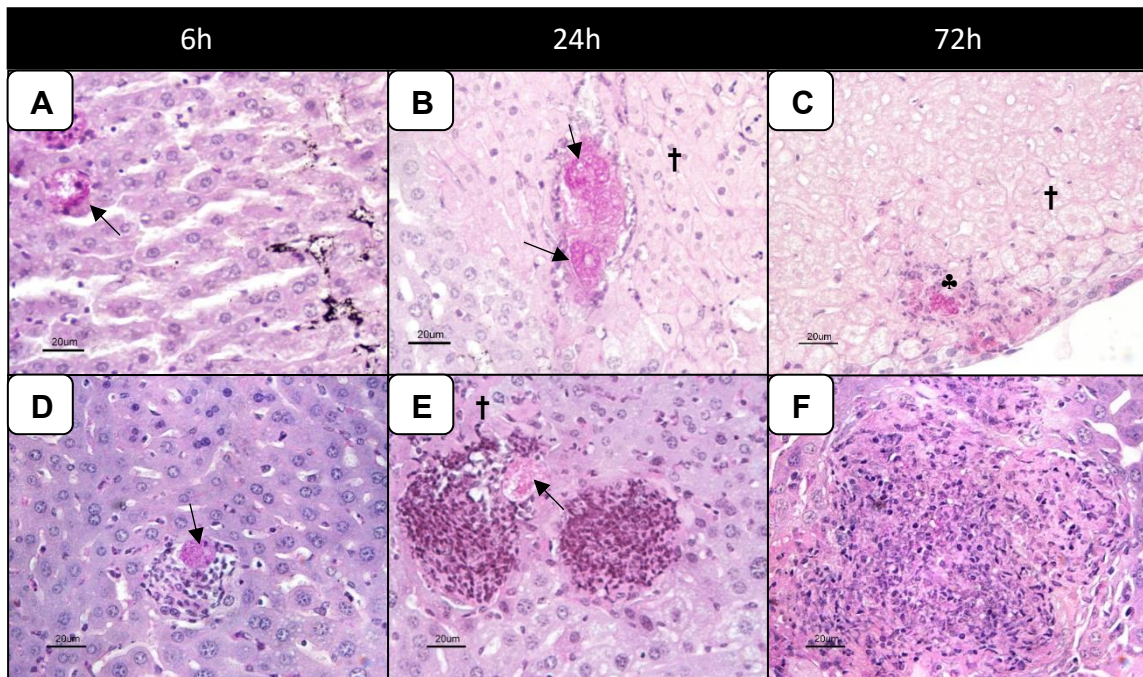


Figura 16. Las imágenes representan la histología del hígado posterior a la infección hepática amebiana del ratón en el grupo control (A-C) y en el grupo inmune (D-E), a los tiempos 6, 24 y 72h. Corte histológico a 5  $\mu\text{m}$ , teñidos con tinción de PAS y observados a 40X en microscopía de campo claro. (→) señalan amebas bien conservadas, (†) la isquemia y (♣) restos de amebas.

Se observa en la figura 16D amebas bien conservadas (flechas) rodeadas por células inflamatorias. A las 24h incrementa el infiltrado inflamatorio que rodea a las amebas (Fig. 16E). Finalmente a las 72h (Fig. 16F) únicamente se observa lesiones residuales sin amebas.

### 10.7. Histología de la infección hepática amebiana de los ratones inmunizados tratados con MEG y apocinina

Enseguida, para explorar si las ROS o el NO $\cdot$ , producidos durante el estallido oxidante de los PMNs y macrófagos, son responsables de la eliminación temprana del parásito, se inyectan amebas en 2 grupos diferentes de ratones. El primero tratado con apocinina, un inhibidor específico de NADPH-oxidasa y el segundo recibe MEG, que es un inhibidor específico de iNOS.

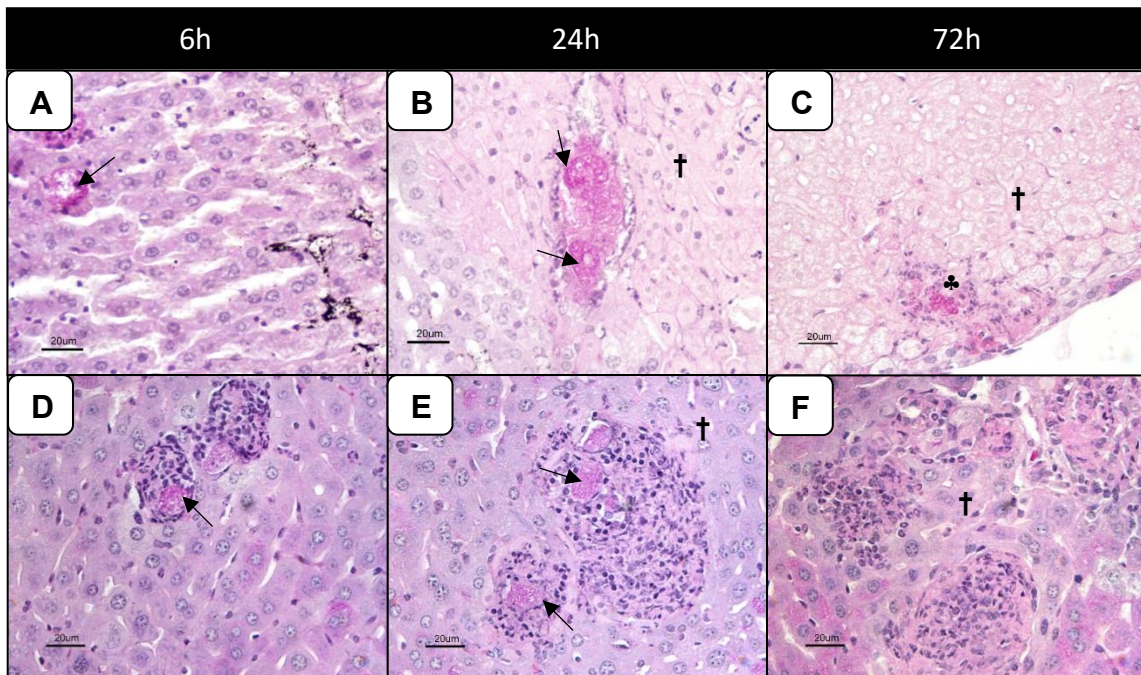


Figura 17. Las imágenes representan la histología del hígado posterior a la infección hepática amebiana en el grupo control (A-D) y en el grupo inmunizado tratado con MEG (D-F), a los tiempos 6, 24 y 72h. Corte histológico a 5 µm, teñidos con tinción de PAS y observados a 40X en microscopía de campo claro. (→) señalan amebas bien conservadas , (†) la isquemia y (♣) restos de amebas.

En la figura 17D se observan amebas bien conservadas (flechas) rodeadas por los leucocitos, a las 24h (17E) incrementa el número de células inflamatorias que rodean a las amebas. A las 72h (17F) no se observan amebas y únicamente se observan lesiones residuales.

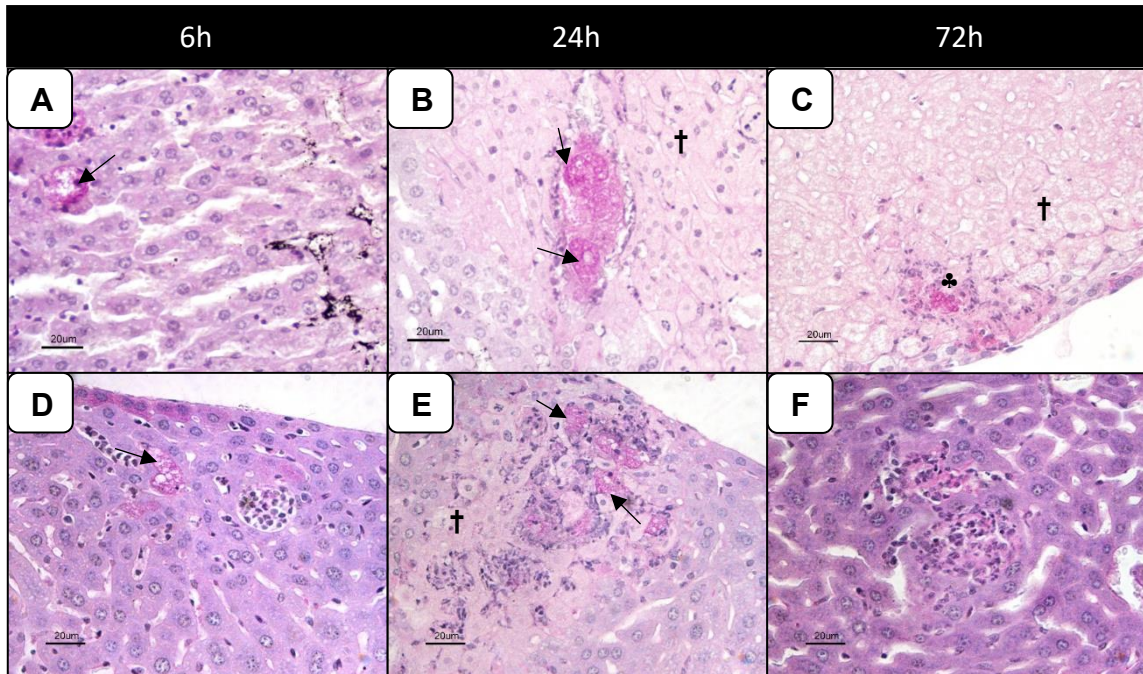
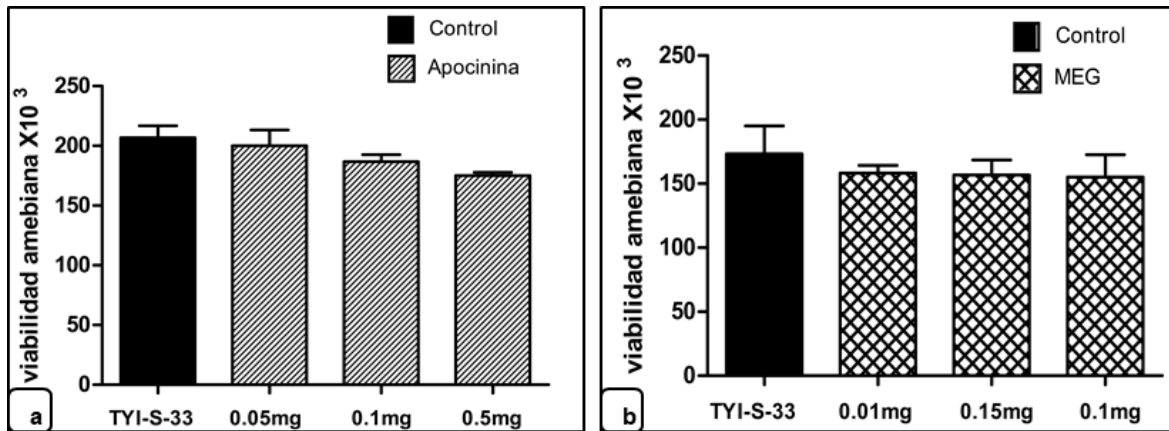


Figura 18. Las imágenes representan la histología del hígado posterior a la infección hepática amebiana en el grupo control (A-C) y en el grupo inmunizado tratado con apocinina (D-F), a los tiempos 6, 24 y 72h. Corte histológico a 5  $\mu\text{m}$ , teñidos con tinción de PAS y observados a 40X en microscopía de campo claro. (→) señalan amebas bien conservadas, (†) la isquemia y (♣) restos de amebas.

En la figura 18D se observa a las amebas rodeadas por escasas células inflamatorias, a las 24h (Fig. 18E) no se observa un incremento en el infiltrado inflamatorio que rodeada a los parásitos y éstos se encuentran en zona de isquemia. A las 72h (Fig. 18F) únicamente se observan pequeñas lesiones residuales sin la presencia de amebas.

Para evaluar el posible efecto citotóxico de los compuestos sobre *E. histolytica*, se evalúa el crecimiento amebiano *in vitro* en presencia de apocinina y MEG comparándolos con el crecimiento en medio de cultivo (TYI-S-33).



Gráfica 4. Las barras representan la media (n=3) y EEM del crecimiento *in vitro* en presencia de diferentes concentraciones de apocinina (a) y MEG (b). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA una vía con post-prueba estadística Dunnett. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (amebas en medio TYI-S-33) como se indica, \*P≤0.05.

En la gráfica 4a observa que apocinina en una concentración de 0.25mg/ml inhibe 16.9% el crecimiento amebiano con respecto al control.

En la gráfica 4a y 4b se observa que las concentraciones administradas de apocinina (0.41mg/8h) y MEG (0.10mg/8h) no muestran actividad amebicida y no interfieren con el crecimiento amebiano en cultivo.

### 10.8. Histología de la infección hepática amebiana de los ratones inmunes e hipocomplementémicos

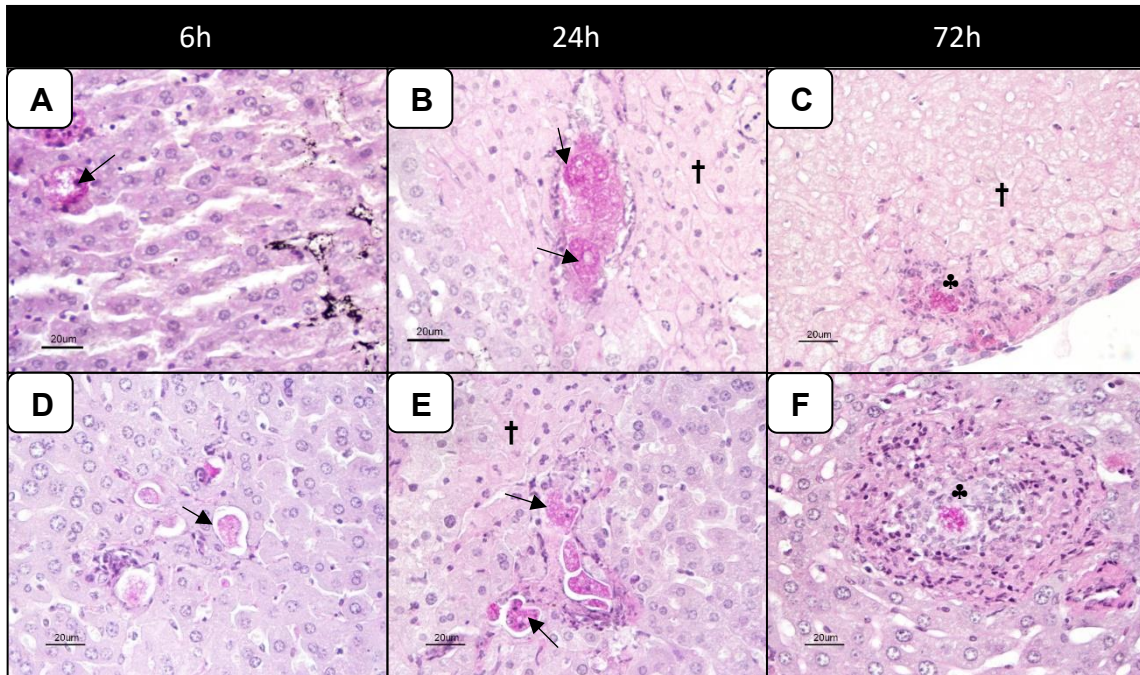
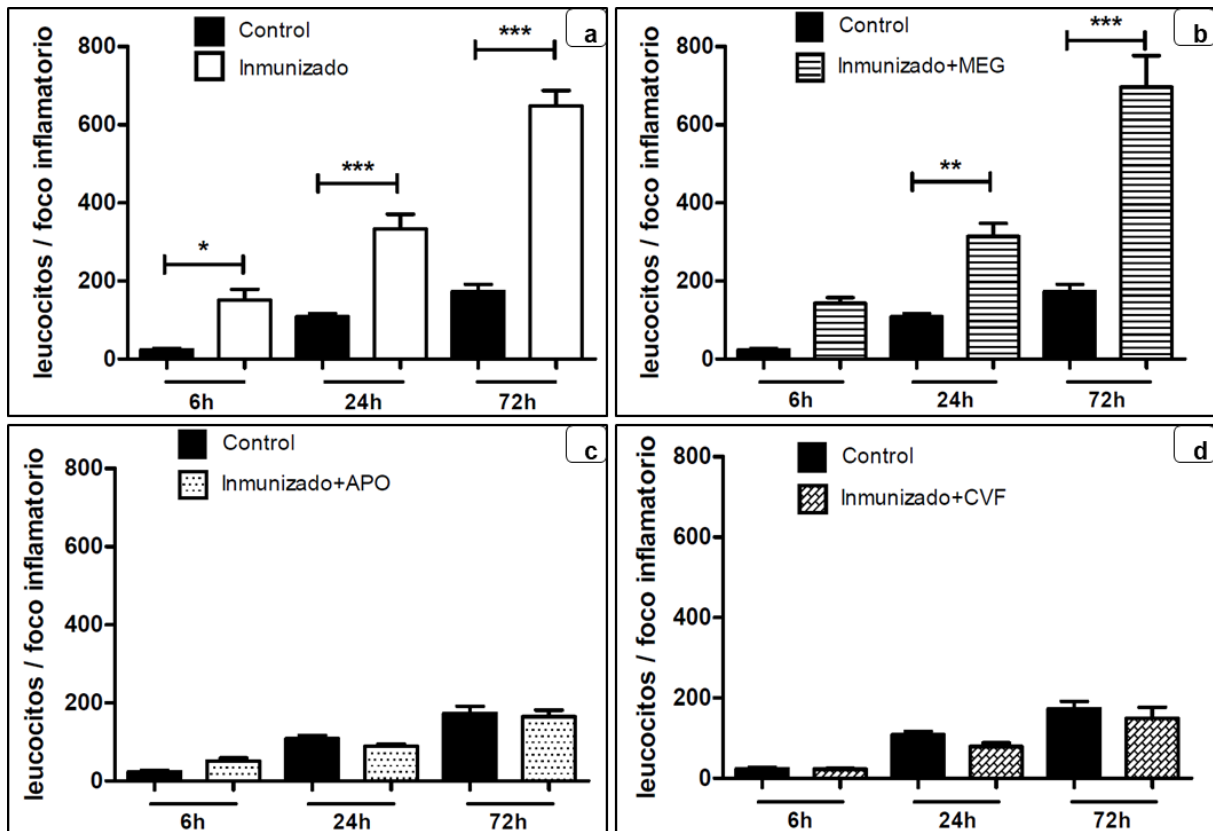


Figura 19. Las imágenes representan la histología del hígado posterior a la infección hepática amebiana en el grupo control (A-C) y en el grupo inmunizado-hipocomplementémico (D-F), a las 6, 24 y 72h. Corte histológico a 5 µm, teñidos con tinción de PAS y observados a 40X en microscopía de campo claro. (→) señalan amebas bien conservadas , (†) la isquemia y (♣) restos de amebas.

En la figura 19D y 19E se observa escaso infiltrado inflamatorio rodeando algunas amebas bien conservadas (flechas), y a las 24h la isquemia es aparente. A las 72h (Fig. 19F) únicamente se observan lesiones residuales con restos amebianos.

## 10.9. Análisis cuantitativo leucocitario en cortes histológicos de hígados de ratón

Con la finalidad de evaluar la respuesta inflamatoria, se cuantificó el número de leucocitos de 20 focos inflamatorios por tiempo cohorte de los grupos en estudio (Ver 8.8).



Gráfica 5. Las barras representan la media  $\pm$  EEM ( $n=30$ ) del análisis cuantitativo leucocitario en los focos inflamatorios de 6, 24 y 72h de la infección hepática amebiana en ratón. a) grupo de ratones inmunizados, b) grupo inmunizado tratado con MEG, c) grupo inmunizado tratado con APO, y d) grupo inmunizado e hipocomplementémico. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA una vía con una prueba post hoc Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos como se indica; \* $P \leq 0.05$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ .

En la gráfica 5 se presenta la cuantificación del número de leucocitos por foco inflamatorio de todos los grupos. En la gráfica 5a se observa un incremento en el número de leucocitos que corresponde al grupo de los ratones inmunizados (barras blancas), lo cual muestra diferencias significativas con respecto al grupo control; a

las 6h con un incremento en la cantidad de células inflamatorias del 630%, a las 24h 306% y 372% a las 72h. En el caso de los ratones inmunizados tratados con MEG (barras con líneas horizontales, gráfica 5b) el comportamiento es semejante a los inmunizados. Este grupo muestra un incremento del 598% a las 6h con una media de 143 leucocitos por foco inflamatorio, mientras que en el grupo control, la media a las 6h es de 23 leucocitos por foco. El grupo de los ratones inmunizados tratados con MEG a las 24h mostró un incremento del 289% con una media de 315 leucocitos y a las 72h el incremento fue del 402%.

En el caso de los ratones tratados con apocinina (gráfica 5c, barras con puntos), y en el grupo de los ratones inmunizados e hipocomplementémicos (gráfica 5d, barras con cuadro), se observa que no hay diferencias significativas con respecto al grupo control durante los tiempos de la infección.

#### 10.10. Análisis cualitativo de la integridad de las amebas en cortes histológicos de hígados de ratón Balb/c

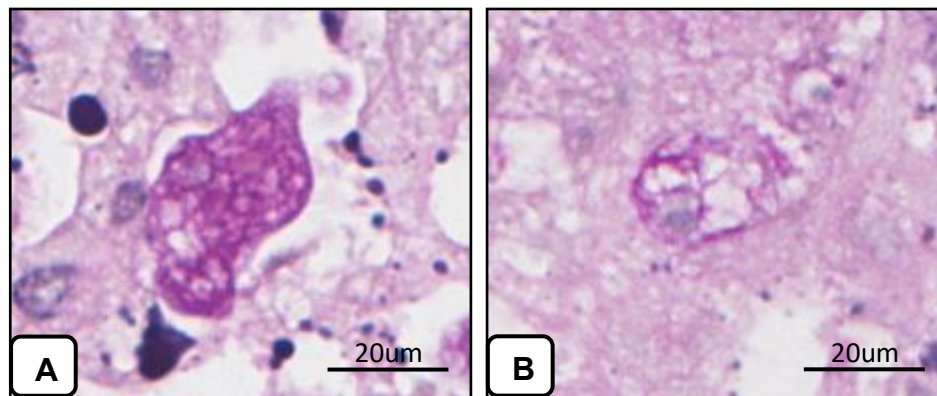


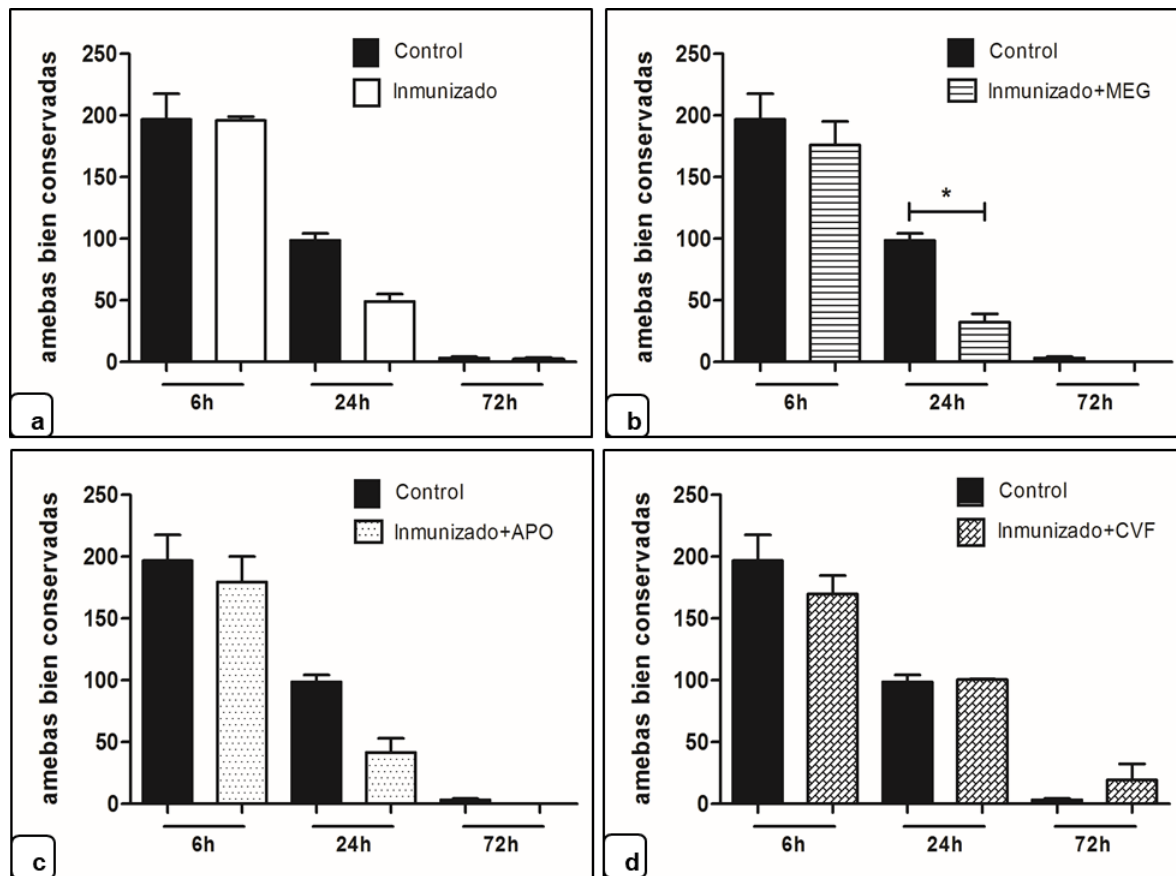
Figura 20. Trofozoítos de *E. histolytica* en hígado de ratón 24h de infección hepática amebiana. A) ameba bien conservada, B) ameba vacuolada y fragmentada. Corte histológico a 5 µm, teñidos con tinción de PAS y observados a 40X en microscopía de campo claro.

El conteo de las amebas bien conservadas se realiza visualmente con microscopía de campo claro. Los trofozoítos que son considerados bien conservados en cuanto a estructura, son alargados con pseudópodos la membrana se observa bien delimitada

al igual que el espacio que ocupa el citoplasma (Fig. 20A) (Aceves-Cano *et al.*, 2015).

Los trofozoítos que no son considerados en el conteo son aquellos que presentan múltiples vacuolas. En éstos, no se observa membrana citoplasmática definida y en la mayoría de los casos se están redondeados (Fig. 20B).

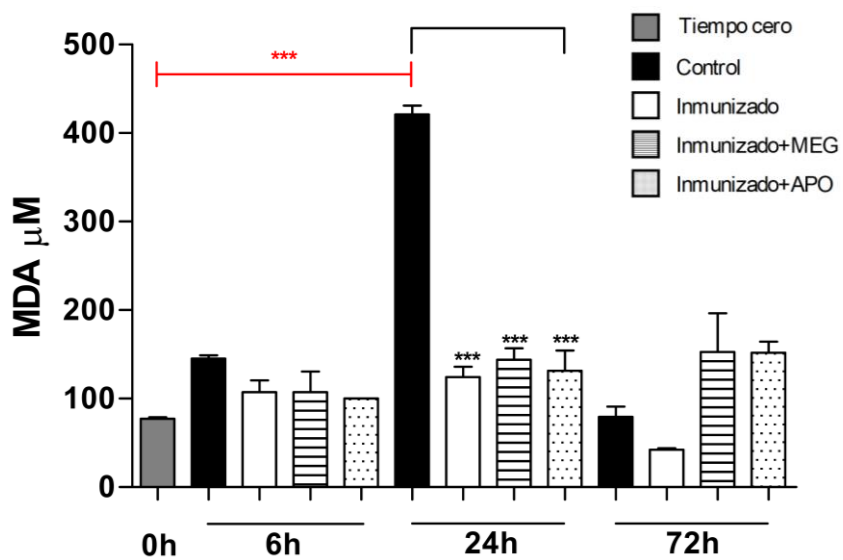
### 10.11. Análisis cuantitativo de la integridad de las amebas en cortes histológicos de hígados de ratón Balb/c



Gráfica 6. Las barras representan la media de los valores  $\pm$  EEM ( $n=4$ ) del análisis cuantitativo de amebas bien conservadas en al menos 3 cortes histológicos de  $5\mu\text{m}$  a las 6, 24 y 72h de la infección hepática amebiana en ratón. a) grupo de ratones inmunizados, b) grupo inmunizado tratado con MEG, c) grupo inmunizado tratado con APO, y d) grupo inmunizado e hipocomplementémico. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA una vía con una prueba post hoc Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos como se indica;  $*P\leq 0.05$ .

En la gráfica 6 se muestra el análisis cuantitativo de las amebas bien conservadas presentes en los diferentes grupos a lo largo de la infección (6, 24 y 72h). En ninguno de ellos se observan diferencias significativas respecto del control, con excepción del grupo de los ratones inmunizados y tratados con MEG, en donde a las 24h se observa un decremento del 67% en el número de amebas bien conservadas (gráfica 6b).

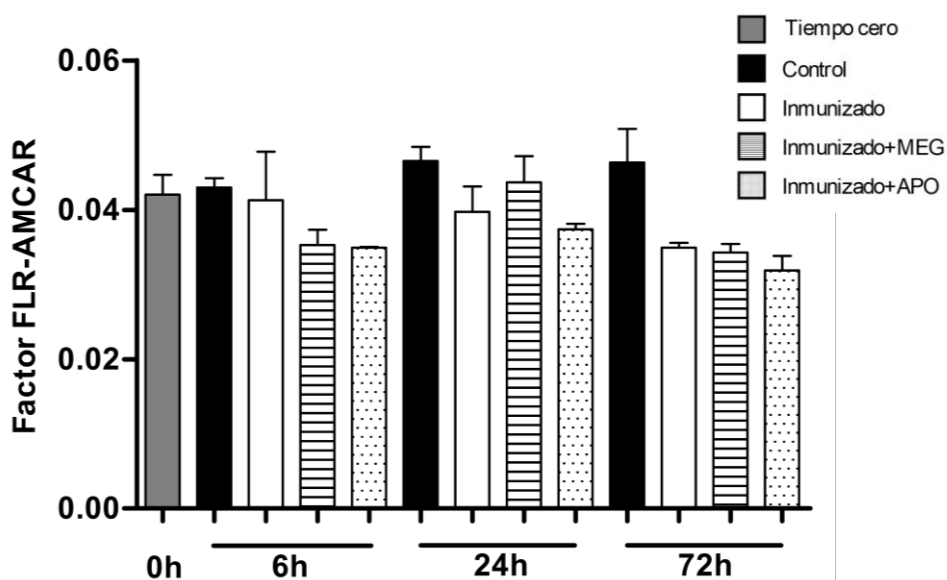
### 10.12. Evaluación de los niveles de Malondialdehído y aminas carboniladas



Gráfica 7. Las barras representan la media (n=4) y el EEM de la concentración de MDA en cada uno de los grupos experimentales. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA una vía con una prueba post hoc Bonferroni. Se comparan los grupos control vs tiempo cero (condiciones basales, barra roja) y los grupos inmunizados y tratados vs su control de cada tiempo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos como se indica; \*\*\*P≤0.001.

Con la finalidad de determinar la respuesta prooxidante durante la infección hepática amebiana del ratón se determinó los niveles de MDA y proteínas carboniladas en el hígado del ratón. En la gráfica 7 observa que los niveles de MDA disminuyen significativamente solamente a las 24h en los grupos inmunizados (barras blancas) y tratados con apocinina (barras con puntos) o MEG (barras con cuadros), respecto al control (barras negras). En el grupo de los ratones tiempo cero (barras grises), los

cuales no fueron inyectados con trofozoítos, se observa que la media de concentración de MDA es de  $78.5 \mu\text{M}$  que es semejante a las concentraciones de los ratones inmunizados e inmunizados tratados con MEG y apocinina. Al comparar el control con el grupo de tiempo cero se observa un incremento de 545% en las concentraciones de MDA únicamente a las 24h.



Gráfica 8. Las barras representan la media (n=4) y el EEM del factor de fluorescencia para aminas carboniladas en proteínas totales de cada uno de los grupos experimentales. Se comparan los grupos control vs grupo intacto y los grupos inmunizados y tratados vs su control de cada tiempo. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA una vía con una prueba post hoc Bonferroni. No se observan diferencias significativas entre los grupos.

Por otra parte, el factor para aminas carboniladas se determina, dividiendo el área total bajo la curva del cromatograma de UV a 220 nm (proteína) entre el área total bajo la curva del cromatograma de fluorescencia,  $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$  (grupos carbonilos). Este factor es utilizado para normalizar el análisis y comparar los diferentes tratamientos que se aplican en los ratones. En la gráfica 8 se observa que no existen diferencias significativas entre los grupos con respecto al control no inmune. Además, se aprecia claramente que el factor para aminas carboniladas de los ratones del grupo cero (0.042) es similar al resto de los grupos.

## 11. Discusión de resultados

Los estudios histológicos de este trabajo muestran que se generó la colonización hepática en todos los grupos experimentales se generó; en las gráficas 6a, b, c y d. Se observa una media de 200 amebas bien conservadas a las 6h, a pesar de esto y aunque las amebas se encuentren íntegras y en contacto directo con los hepatocitos no se observa un efecto lítico en el tejido. Muy probablemente por la presencia de  $\alpha$ -2-macroglobulina en el suero como lo describió Montfort *et al.*, (1993) en donde la capacidad citolítica de *E. histolytica* sobre hepatocitos aislados de hígado de hámster y rata es un fenómeno dependiente de proteasas de cisteína que es inhibible por ésta.

Después de 24h de infección se observa una disminución del 50% de las amebas bien conservadas, semejante a lo descrito por Rigotherier *et al.*, (2002) en donde existe una muerte de hasta el 70% durante las primeras 24h, debido a las altas concentraciones de oxígeno. Con excepción del grupo inmunizado tratado con MEG que muestra una disminución significativa respecto al grupo control (Gráfica 6b), a pesar de esto la tendencia a la disminución es semejante a los demás grupos. Además se descartó el efecto amebicida *in vitro* tanto de MEG como de apocinina (Gráfica 4). A las 72h la presencia de amebas bien conservadas en todos los cortes histológicos es casi nula. Este resultado es similar a lo reportado por Velazquez *et al.*, (1998), en el cual el tiempo de eliminación de la ameba es similar a 2 días. Trabajos que contrastan con lo observado son los de Jarillo-Luna *et al.*, (2000, 2002) y Aceves-Cano *et al.*, (2015) en los que se observan amebas bien conservadas en tiempos que van desde 4 a 7 días. Esta variabilidad en el tiempo de eliminación de la ameba puede deberse a la gran cantidad y vía de amebas dosificadas (Tsutsumi *et al.*, 1984) ( $7.5 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$ ) en un área pequeña (vía intrahepática) que puede favorecer la supervivencia de las amebas debido a la cooperatividad para contrarrestar los diferentes tipos de estrés. Estudios realizados por Burchard y Mirelman (1988) determinaron que dicha variabilidad se debe al daño mecánico que genera la vía de inoculación intrahepática.

Para evitar estas variaciones metodológicas y realizar un estudio comparativo con la infección hepática en hámsteres, se realizó la administración por vía intraportal y el número de amebas se administró en dosis equivalentes a las que se inoculan en el hámster ( $1 \times 10^6/100\text{gr}$ ) (Tsutsumi *et al.*, 1984).

En los cortes histológicos de la infección hepática amebiana del grupo control el tiempo de eliminación de las amebas se da antes de las 72h (Fig.15E). Se ha propuesto que la resistencia del ratón a la IHA se debe al  $\text{NO}\cdot$  y ROS liberados por células inflamatorias activadas ya que estudios *in vitro* han mostrado alta actividad amebicida por parte del  $\text{NO}\cdot$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de macrófagos murinos activados (Denis y Chadee, 1989; Ghadirian y Salimi, 1993; Lin y Chadee, 1992). Además, en condiciones *in vivo* durante las etapas iniciales de la infección hepática amebiana en ratones Balb/c y C3H/HeJ los neutrófilos que rodean a la ameba son capaces de incrementar  $\text{NO}\cdot$  a través de iNOS (Jarillo-Luna *et al.*, 2002). En el grupo control experimental, el efecto amebicida de estas moléculas es poco probable ya que se observan escasos leucocitos adyacentes a las amebas (Fig. 15A-E). Al realizar la cuantificación periférica leucocitaria amebiana se encontró  $23 \pm 17$  leucocitos a las 6h, no observándose incremento significativo entre los grupos 6-24h, y 24-72h (Gráfica 5A, barras negras). Estos resultados sugieren que muy probablemente en esta especie animal no se generan quimiocinas por la presencia de la ameba. Dentro de estas moléculas encontramos a: 1) IL-8 (Krakaver *et al.*, 1999); 2) productos de la vía metabólica de la lipoxigenasa del ácido araquidónico, sobre todo leucotrieno B<sub>4</sub>; 3) y componentes del sistema del complemento como C5a y C3a; donde C5a, es considerada una de las más potentes quimioatrayentes de neutrófilos (Schreiber *et al.*, 2009).

Para conocer si la ausencia de infiltrado inflamatorio que caracteriza a la infección hepática amebiana del ratón Balb/c es debido a la ausencia de péptidos quimiotácticos generados e inducidos por la activación de complemento, se realizó el análisis de quimiotaxis *in vivo* (Gráfica 3) de leucocitos inducido por la presencia de amebas en suero fresco y descomplementado de ratón Balb/c y hámster Sirio Dorado. Se observó que la actividad quimiotáctica leucocitaria es baja (15%) en el

suero descomplementado de ratones y hámsteres (Gráfica 3) y en presencia de suero con complemento, existe un incremento significativo (3.8 veces) en la actividad quimiotáctica de suero con complemento de hámster, estos resultados concuerdan con lo descrito por Guo *et al.*, (2007) en donde observa exudación de leucocitos inducida por complemento. Contrario a esto, en el suero con complemento de ratón no hay quimioatracción; esto sugiere, que el complemento de ratón en presencia de amebas no genera o induce péptidos quimiotácticos *in vitro*.

Se evaluó la capacidad amebicida del complemento del ratón *in vitro* (Gráfica 1), observando un efecto amebicida no significativo. Olivos-García *et al.*, (2018) demostraron el efecto amebicida del complemento en rata Wistar y hámster *in vivo* e *in vitro*, encontrando que el complemento de rata es 100% lítico para las amebas aun diluyéndolo 5 veces; contrario a esto, el suero de hámster no presentó actividad lítica amebicida, éste es considerado una especie susceptible al AHA. Estos resultados sugieren un efecto amebicida muy bajo o nulo del suero de ratón similar al del hámster. Otro elemento que sustenta lo observado es que en el grupo control descomplementado no existe diferencia significativa con respecto al tiempo de eliminación de las amebas (72h, datos no mostrados).

Otra causa de la disminución de las amebas del hígado de ratón (Fig. 15A-E), puede deberse a las concentraciones de oxígeno presentes en el tejido, que van del 6 al 13% (Nauck *et al.*, 1981); y como la ameba es un microorganismo microaerófilo que no sobrevive en ambientes superiores al 5% (Band y Cirrito, 1979); Olivos-García *et al.*, en 2012 describen que la principal causa de la susceptibilidad de *E. histolytica* al oxígeno se debe al aumento del estrés oxidante que inactiva los centros Fe-S de sus enzimas, lo cual genera disfunción metabólica, acidificación citoplasmática, pérdida de la integridad de la membrana y muerte; pero la participación del O<sub>2</sub> en la desaparición de las amebas del hígado del grupo control, muy probablemente no influye, pues en los hallazgos histológicos se observa la presencia de zonas isquémicas (demostrado por la falta de perfusión de la tinta china) desde las 3h hasta la desaparición de las amebas. Por lo que se puede deducir que el oxígeno no es un factor que interviene en la eliminación de la ameba.

La disminución del 50% de las amebas dentro de las primeras 24h de infección se correlaciona con el incremento significativo prooxidante sugerido por los niveles de MDA observados en la gráfica 7 (barras negras) donde se observa el incremento de estos a las 24h con respecto al grupo basal; esto concuerda con experimentos realizados en el laboratorio de patología que demuestran que uno de los requerimientos esenciales para la sobrevivencia y proliferación amebiana en los tejidos del hospedero es un microambiente reducido (datos no mostrados) que concuerda con lo descrito por Guilin y Diamond (1980) en donde un entorno reductor es requisito absoluto para la proliferación amebiana. Pero esta elevación disminuye a las 72h, y muy probablemente se debe al sistema antioxidante del hígado que contrarresta a los oxidantes (Iskusnykh *et al.*, 2013). Por esta razón al determinar el comportamiento de las aminos carboniladas en el grupo control, no se encontró diferencias significativas con respecto a las cantidades basales (Gráfica 8 barras negras); Vargas *et al.*, (2007) describe que cuando existen altos niveles de oxidantes, los lípidos son los primeros en sufrir daño y posteriormente si el ambiente oxidado no se contrarresta ocasiona daño en las proteínas. Este efecto oxidante “amebicida” del tejido sugiere que la eliminación solo pudiera influir en las primeras 24h, pues tanto el MDA y las proteínas carboniladas a las 72h no tienen diferencias significativas con respecto al grupo basal.

En la gráfica 6a se observa una disminución parcial y total de amebas bien conservadas a las 24 y 72h, esta disminución puede deberse a que no se observa destrucción tisular lítica (figura 15), que es una característica de la amebiasis invasiva en humanos (Brandt y Tamayo, 1970) y en animales de experimentación, esta lisis celular es el medio que probablemente favorece la sobrevivencia al proporcionarle nutrientes para su crecimiento (Tsutsumi y Martinez-Palomo, 1988). Por lo que al no observar la generación de necrosis lítica (Fig. 15) originada por los leucocitos (Tsutsumi y Martinez-Palomo, 1988) la ameba no se encuentra en las condiciones necesarias para su proliferación. Por lo que la participación del tejido en los grupos de experimentación como sostén de nutrientes es poco probable. Lo que sugiere que la isquemia generada por la oclusión sanguínea sinusoidal por las amebas y el plasma retenido permite la supervivencia del parásito solo durante 72h.

Estos hallazgos se correlacionan con lo observado en la gráfica 2 en donde en condiciones *in vitro* el suero de ratón soporta la sobrevivencia amebiana únicamente por 72h.

Por otra parte, la ameba fue incapaz de sobrevivir en el hígado del ratón en ausencia de células inflamatorias (Fig. 15), estos resultados se correlacionan con lo observado en el AHA de hámster en donde se ha demostrado que la presencia de abundantes leucocitos es un requisito para la supervivencia amebiana (Olivos-García *et al.*, 2004). Se sabe que además de los péptidos quimioatrayentes del complemento, las ROS derivadas de las células inflamatorias también tienen actividad proinflamatoria (Kim *et al.*, 2010). El incremento de la afluencia leucocitaria durante la infección hepática amebiana en el ratón previamente inmunizado sugiere que este animal es capaz de responder a los péptidos quimioatrayentes generados por la activación del complemento (Fig. 16 y gráfica 5a). Esta propuesta es apoyada por los resultados de la hipocomplementemia en ratones inmunizados, causada por el CVF, en los que la afluencia leucocitaria se reduce significativamente en niveles similares al del grupo control (Fig. 19 y gráfica 5d). Además, esto también sugiere que la falta de afluencia leucocitaria observada en los ratones controles pudiera deberse a la falta de péptidos quimiotácticos como C3a o C5a generados por la activación del complemento.

Por otra parte, es posible que las ROS derivadas de las células inflamatorias participen en el incremento de la afluencia leucocitaria de los ratones inmunizados ya que su inhibición específica con apocinina resultó en una significativa disminución de la afluencia leucocitaria (Fig. 18 y gráfica 5c), que se correlaciona con lo descrito por Morgan y Liu (2011) en donde describe que NADPH-oxidasa actúa como agente proinflamatorio. Contrario a esto, el inhibidor específico de iNOS no modifica la intensidad de la respuesta inflamatoria, sugiriendo que en estas condiciones el NO $\cdot$  no se produce o no tiene efecto proinflamatorio (Fig. 17 y gráfica 5b).

Otra observación importante de este estudio es que a pesar del incremento de la afluencia leucocitaria, *E. histolytica* no prolongó su tiempo de eliminación en el hígado del ratón. En estas condiciones, la participación de las ROS, NO $\cdot$  y HOCl en la eliminación amebiana, es poco probable ya que el uso de inhibidores específicos

de NADPH oxidasa, que genera superóxido e iNOS que cataliza la formación de NO $\cdot$ , no prolongaron el tiempo de eliminación del parásito (Fig. 17 y 18). Estos resultados son compatibles con lo descrito por Seydel *et al.*, (2000) en los que el tiempo de eliminación de la ameba no se prolonga en ratones genéticamente deficientes en la producción de iNOS. Contrario a esto estos resultados, Jarillo-Luna *et al.*, (2002) observo que la iNOS de los leucocitos que rodean a la ameba y el NO $\cdot$  circulante aumenta a partir de las 6 h y disminuyen de forma gradual hasta la desaparición de los parásitos. Sin embargo, en estos experimentos no se neutraliza la actividad del NO $\cdot$  local que pudiera haberse generado.

Finalmente, otro factor que pudiera participar en la eliminación de la ameba del hígado de ratón es el complemento. Sin embargo esto es poco probable ya que el tiempo de eliminación de la ameba no se prolonga en el hígado de ratones controles o previamente inmunizados con lisados amebianos (Fig. 15 y 16). La resistencia amebiana al complemento de estas especies podría atribuirse al menos a dos causas: 1) *E. histolytica* de la cepa HM1: IMSS produce una proteasa EhCP de 56 kDa, que le otorga resistencia a la lisis mediada por el complemento (Reed y Gigli, 1990) y 2) un epítipo que se encuentra en la adhesina EhGL de la ameba (el cual muestra una alta similitud con CD59 de humanos y en ratones ) inhibe la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) (Braga *et al.*,1992; Schnabolk *et al.*, 2017).

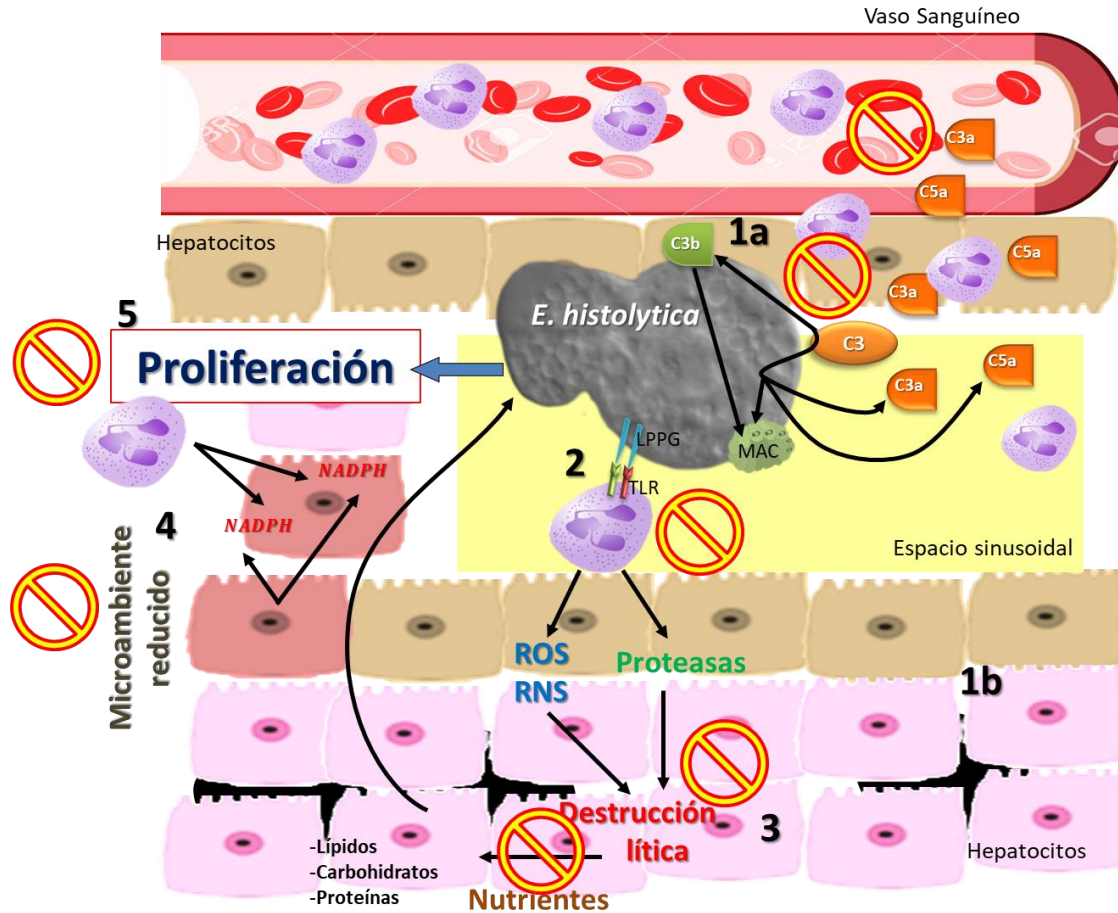


Figura 21. Diagrama hipotético de la resistencia natural del ratón Balb/c ante la infección hepática amebiana por la cepa HM1: IMSS.

En la figura 21 se muestra el diagrama hipotético de la resistencia natural del ratón Balb/c ante la infección hepática amebiana por la cepa HM1: IMSS. En teoría lo que estaría ocurriendo es lo siguiente: 1a) cuando la ameba llega a los vasos sanguíneos y espacio sinusoidal, se estaría activando la vía alterna del complemento mediante la unión covalente de C3b a los constituyentes de la superficie amebiana. C3b esta disponible gracias a una ruptura continua del C3 en el plasma, donde también se genera C3a (molécula quimiotáctica). Una vez unida comienza una serie de reacciones donde interviene el factor B, D y properdina, dando lugar a la formación de la convertasa C5, generando C5a potente anafilatoxina que difunde hacia el plasma (requisito para la extravasación y atracción leucocitaria) y C5b se fija a la membrana de la ameba para continuar con la formación del MAC (C6-C7-C8-C9).

1b) La llegada de la ameba por circulación portal, genera isquemia por la oclusión que produce (demostrado por la falta de perfusión de la tinta china) generándose necrosis de tipo coagulativa.

2) Cuando la vía alterna del complemento se activa se generan moléculas quimiotácticas (C5a, C3a), que son necesarias para el reclutamiento leucocitario al sitio de la infección, estos leucocitos, se activan mediante el reconocimiento de LPPG por TLR-2 y TLR-4, induciendo el estallido respiratorio que resulta en el aumento de ROS y RNS, y de la liberación del contenido granular. 3) Estas moléculas generan la destrucción lítica en los hepatocitos. Por tal motivo la ameba puede obtener nutrientes necesarios para su proliferación como carbohidratos, lípidos y proteínas, especialmente glucosa ya que glucólisis es la única vía metabólica del parásito que produce esqueleto de carbono, intermediarios reductores y ATP. 4) es un requisito absoluto para la proliferación amebiana la actividad reductora (NADPH), esta es sostenida por células metabólicamente activas. Finalmente, 5) todos estos factores propician un microambiente necesario para la proliferación amebiana.

En el modelo generado en el ratón Balb/c los pasos 1a, 1b, 3, 4 y 5 no se llevan a cabo. Por tanto, al no encontrarse la ameba en un microambiente favorable para su proliferación, únicamente la ameba es viable hasta las 72h, muy seguramente la soporta el suero atrapado en las sinusoides de las zonas isquémicas.

## 12. Conclusión

Al evaluar los cortes histológicos en todos los grupos experimentales se observa una colonización de amebas bien conservadas a las 6h (n= 200), mismas que se van degenerando gradualmente hasta su desaparición a las 72h.

En los cortes histológicos a las 6, 24 y 72h, el infiltrado leucocitario incremento significativamente con respecto al grupo control en los grupos inmunizados y tratados con MEG; contrario a esto, los grupos con apocinina e hipocomplementémicos no mostraron incremento significativo en el infiltrado leucocitario con respecto al grupo control.

El complemento, NO $\cdot$  y ROS no participan en la eliminación de la ameba, esto sugiere que no son mecanismos de resistencia natural a la amebiasis hepática experimental por la cepa HM1: IMSS de *E. histolytica* en el ratón Balb/c.

La escasa afluencia leucocitaria es parte de la resistencia natural del ratón Balb/c a la amebiasis hepática experimental.

### 13. Bibliografía

1. Mi-ichi F, Yoshida H, Hamano S. Entamoeba Encystation: New targets to prevent the transmission of amebiasis. PLoS Pathog. 2016; 12(10): 1-13.
2. González-Vázquez MC, Carabarin LA, Baylon PL, Rosales JL. De amibas y amebiasis: *Entamoeba histolytica*. Elementos 87. 2012: 13-18.
3. Winn H, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman diagnóstico microbiológico: Texto y atlas en color. 8ª ed. Argentina: Médica Panamericana; 2008.
4. Becerril MA. Parasitología médica. 3ª ed. España: McGraw-Hill Interamericana; 2011.
5. Flisser A, Pérez-Tamayo R. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. México: Editores de textos mexicanos; 2006.
6. Choudhuri G, Rangan M. Amebic infection in humans. Indian J Gastroenterol. 2012; 31(4): 153-162.
7. Mortimer L, Chadee K. The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. Exp Parasitol. 2010; 126(3): 366-380.
8. Bogitsh BJ, Carter CE, Oeltmann TN. Human Parasitology. 5ª ed. United States: Academic Press; 2018.
9. Welter B, Sehorn M, Temesvari L. Flow cytometric characterization of encystation in *Entamoeba invadens*. Mol Biochem Parasitol. 2017; 218: 23-27.
10. Mattern CF, Keister DB. Experimental amebiasis. II. Hepatic amebiasis in the newborn hamster. Am J Trop Med Hyg. 1977; 26(3): 402-411.
11. Burchard GD, Mirelman D. *Entamoeba histolytica*: virulence potential and sensitivity to metronidazole and emetine of four isolates possessing nonpathogenic zymodemes. Exp Parasitol. 1988; 66(2): 231-242.
12. Tanyuksel M, Petri WA Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin Microbiol Rev. 2003; 16(4): 713-729.
13. Guerrero M, Larriva-Shahd J, Ramírez ME, Riós D, Ruiz Molina A. Collagen fibers in liver experimental amebic lesion. An ultrastructural study. Arch Invest Med (Mex). 1982; 13(3): 223-231.

14. Petri WA Jr, Haque R, Mann BJ. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol.* 2002; 56:39-64.
15. Ralston KS, Petri WA Jr. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol.* 2011; 27(6): 254-263.
16. MacFarlane RC, Singh U. Identification of an *Entamoeba histolytica* serine-, threonine-, and isoleucine-rich protein with roles in adhesion and cytotoxicity. *Eukaryot Cell.* 2007; 6(11): 2139–2146.
17. Ralston KS, Solga MD, Mackey-Lawrence NM, Somlata, Bhattacharya A, Petri WA Jr. Trophocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion. *Nature.* 2014; 508: 526–530.
18. Ralston KS. Chew on this: amoebic trophocytosis and host cell killing by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol.* 2015; 31 (9): 442-452.
19. Aguilar-Rojas A, Olivo-Marin JC, Guillen N. The motility of *Entamoeba histolytica*: finding ways to understand intestinal amoebiasis. *Curr Opin Microbiol.* 2016; 34: 24-30.
20. Choudhuri G, Rangan M. Amebic infection in humans. *Indian J. Gastroenterol.* 2012; 31(4): 153-162.
21. Leippe M. Amoebapores. *Parasitol Today.* 1997; 13:178-183.
22. Zhang X, Zhang Z, Alexander D, Bracha R, Mirelman D, Stanley SL Jr. Expression of Amoebapores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis. *Infect Immun.* 2004; 72(2): 678-683.
23. Tillack M, Biller L, Irmer H, Freitas M, Gomes MA, Tannich E, Bruchhaus I. The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics.* 2007; 8: 170.
24. Irmer H, Tillack M, Biller L, Handal G, Leippe M, Roeder T, et al. Major cysteine peptidases of *Entamoeba histolytica* are required for aggregation and digestion of erythrocytes but are dispensable for phagocytosis and cyto-pathogenicity. *Mol Microbiol.* 2009; 72: 658–667.

25. Thibeaux R, Weber C, Hon CC, Dillies MA, Avé P, Coppée JY, Labruyère E, Guillén N. Identification of the virulence landscape essential for *Entamoeba histolytica* invasion of the human colon. PLoS Pathog. 2013; 9(12): e1003824.
26. Biller L, Matthiesen J, Kühne V, Lotter H, Handal G, Nozaki T, Saito-Nakano Y, Schümann M, Roeder T, Tannich E, Krause E, Bruchhaus I. The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. Mol Cell Proteomics. 2014; 13(1): 132–144.
27. Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*. Front Immunol. 2016; 7:175.
28. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la microbiología. 9ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2007.
29. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. Immunity. 2010; 33(5): 657-670.
30. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. 8ª ed. España: Elsevier; 2015.
31. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part I-molecular mechanisms of activation and regulation. Front Immunol. 2015; 6: 262.
32. Chadee K, Moreau F, Meerovitch E. *Entamoeba histolytica*: chemoattractant activity for gerbil neutrophils *in vivo* and *in vitro*. Exp Parasitol. 1987; 64(1): 12-23.
33. Salata RA, Ahmed P, Ravdin JI. Chemoattractant activity of *Entamoeba histolytica* for human polymorphonuclear neutrophils. J Parasitol. 1989; 75(4): 644-646.
34. Kretschmer R, Collado ML, Pacheco MG, Salinas MC, Lopez-Osuna M, Lecuona M, Castro EM, Arellano J. Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *E. histolytica*. Parasite Immunol. 1985; 7(5): 527-543.
35. Reed SL, Gigli I. Lysis of complement-Sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. Initiation of complement activation by an extracellular neutral cysteine proteinase. J Clin Invest. 1990; 86(6): 1815-22.
36. Norris KA, Bradt B, Cooper NR, So M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. J Immunol. 1991; 147(7): 2240-2247.

37. Reed SL, Curd JG, Gigli I, Gillin FD, Braude AI. Activation of complement by pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. J Immunol. 1986; 136(6): 2265-2270.
38. Braga LL, Ninomiya H, McCoy JJ, Adal K, Wiedmer T, Pham C, Sims PJ, Petri WA Jr. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res. 1992; 90(3): 133.
39. Nathan C. Nitric-Oxide as a secretory product of mammalian-cells. FASEB J. 1992; 6(12): 3051-3064.
40. Bogdan C, Rölinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. Curr Opin Immunol. 2000; 12(1): 64–76.
41. Lin JY, Chadee K. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. J Immunol. 1992; 148(12): 3999-4005.
42. Jarillo-Luna RA, Campos-Rodríguez R, Tsutsumi V. *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. Exp Parasitol. 2002; 101(1): 40-56.
43. Tseng CW, Liu GY. Expanding roles of neutrophils in aging hosts. Curr Opin Immunol. 2014; 29: 43-48.
44. Choi MH, Sajed D, Poole L, Hirata K, Herdman S, Torian BE, Reed SL. An unusual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack. Mol Biochem Parasitol. 2005; 143(1): 80-89.
45. Campos-Rodríguez R, Gutiérrez-Meza M, Jarillo-Luna RA, Drago-Serrano ME, Abarca-Rojano E, Ventura-Juárez J, Cárdenas-Jaramillo LM, Pacheco-Yeppez J. A review of the proposed role of neutrophils in rodent amebic liver abscess models. Parasite. 2016; 23: 6.
46. Badior BM. Phagocytes and oxidative stress. Am J Med. 2000; 109: 33-44.
47. Cascales MA. Estallido respiratorio de los fagocitos. Anal Real Acad Nac Farm. 2005; 71(2): 365-386.
48. Pérez-Gastell PL, Pérez-Alejo JL. Métodos para medir el daño oxidativo. Rev Cubana Med Milit. 2000; 29(3): 192-198.

49. Seydel KB, Smith SJ, Stanley SL Jr. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma Interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infect Immun.* 2000; 68(1): 400-402.
50. Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18(6): 642-660.
51. Pacheco-Yépez J, Campos-Rodríguez R, Shibayama M, Ventura-Juárez J, Serrano-Luna J, Tsutsumi V. *Entamoeba histolytica*: production of nitric oxide and in situ activity of NADPH diaphorase in amebic liver abscess of hamsters. *Parasitol Res.* 2001; 87(1): 49-56.
52. Meri S, Richaud G, Linder E. Complement activation by antigenic fractions of *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol.* 1985; 7(2): 153-164.
53. Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury II. Mechanisms of neutrophil induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290(6): 1083-1088.
54. Tsutsumi V, Mena-Lopez R, Anaya-Velazquez F, Martinez-Palomo A. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol.* 1984, 117: 81-91.
55. Herbert, W.J. Mineral oil adjuvants and the immunization of laboratory animals. 3<sup>a</sup> ed. Oxford: Handbook of Experimental Immunology; 1978.
56. Vogel CW, Bredehorst R, Fritzing DC, Grunwald T, Siegelmüller P, Kock MA. Structure and function of cobra venom factor, the complement-activating protein in cobra venom. *Adv Exp Med Biol.* 1996; 391: 97-114.
57. Boyden SV. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med.* 1962; 115: 453.
58. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1978; 72(4): 431-432.
59. Carson FL, Hladik C. Histotechnology: A self- Instructional Text. 3<sup>a</sup> ed. Hong Kong: American society for Clinical Pathology Press; 2009.

60. Krishnan V, Ponnuraj K, Xu Y, Macon K, Volanakis JE, Narayana SV. The crystal structure of cobra venom factor, a cofactor for C3- and C5-convertase CVFBb. Structure. 2009; 17(4): 611-619.
61. Sim AS, Salonikas C, Naidoo D, Wilcken DE. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2003; 785(2): 337-344.
62. Andersen CM, Mortensen G. Fluorescence Spectroscopy: a rapid tool for analyzing dairy products. J Agric Food Chem. 2008; 56(3): 720-729.
63. Gakamsky A, Duncan RR, Howarth NM, Dhillon B, Buttenschön KK, Daly DJ, Gakamsky D. Tryptophan and non-tryptophan fluorescence of the eye lens proteins provides diagnostics of cataract at the molecular level. Sci Rep. 2017; 7: 40375.
64. Pérez-Tamayo R, Montfort I, Tello E, Olivos A. Ischemia in experimental acute amebic liver abscess in hamsters. Int J Parasitol. 1992; 22(1): 125-129.
65. Velazquez C, Shibayama-Salas M, Aguirre-Garcia J, Tsutsumi V, Calderon J. Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. Parasite Immunol. 1998; 20(6): 255-262.
66. Aceves-Cano A, Gaytán-Ochoa R, Ramos-Martínez E, Erosa de la Vega G, González-Horta C, Talamás-Rohana P, Sánchez-Ramírez B. Morphological Findings in Trophozoites during Amoebic Abscess Development in Misoprostol-Treated BALB/c Mice. Biomed Res Int. 2015; 2015: 898467.
67. Montfort I, Pérez-Tamayo R, González Canto A, García de León MC, Olivos A, Tello E. Role of cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* on the cytopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes in vitro. J parasitol. 1993; 79(1): 98-105.
68. Rigotherier MC, Khun H, Tavares P, Cardona A, Huerre M, Guillén N. Fate of *Entamoeba histolytica* during establishment of amoebic liver abscess analyzed by quantitative radioimaging and histology. Infect Immun. 2002; 70(6): 3208-3215.
69. Denis M, Chadee K. Cytokine activation of murine macrophages for in vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Infect Immun. 1989; 57(6): 1750-1756.

70. Ghadirian E, Salimi A. *In vitro* effect of recombinant interferon gamma in combination with LPS on amoebicidal activity of murine Kupffer cells. *Immunobiology*. 1993; 188(1-2): 203-219.
71. Krakaver T, Vilcek J, Oppenheim JJ. Proinflammatory cytokines. TNF and IL-1 families, chemokines, TGF-B, and others. In: Paul WE (ed) *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 775-811.
72. Schreiber A, Xiao H, Jennette JC, Schneider W, Luft FC, Kettritz R. C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20(2): 289-298.
73. Guo X, Houpt E, Petri WA Jr. Crosstalk at the initial encounter: interplay between host defense and amoeba survival strategies. *Curr Opin Immunol*. 2007, 19 (4): 376-84.
74. Olivos-García A, Nequiz M, Liceaga S, Mendoza E, Zúñiga P, Cortes A, López-Velázquez G, Enríquez-Flores S, Saavedra E, Pérez-Tamayo R. Complement is a rat natural resistance factor to amoebic liver infection. *Biosci Rep*. 2018; 36(5): 1-13.
75. Nauck M, Wölflle D, Katz N, Jungermann K. Modulation of the glucagon-dependent induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase and tyrosine aminotransferase by arterial and venous oxygen concentrations in hepatocyte cultures. *Eur J Biochem*. 1981; 119(3): 657-661.
76. Band RN, Cirrito H. Growth response of axenic *Entamoeba histolytica* to hydrogen, carbon dioxide, and oxygen. *J Protozool*. 1979; 26(2): 282-286.
77. Olivos-García A, Saavedra E, Luis-García ER, Nequiz M, Pérez-Tamayo R. Stress Response in *Entamoeba histolytica*. In: Requena JM, editor. *Stress Response in Microbiology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press. 2012; 405-427.
78. Gillin FD, Diamond LS. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*: effects of temperature and oxygen tension on growth and survival. *Exp Parasitol*. 1980; 49(3): 328-38.
79. Iskusnykh IY, Popova TN, Agarkov AA, Pinheiro de Carvalho MÂ, Rjevskiy SG. Expression of Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase and Level of

- Free Radical Processes under Toxic Hepatitis in Rats. *J Toxicol.* 2013; 2013: 870628.
- 80.** Vargas F, Rivas C, Nursamaa A, Zoltan T. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en Química.* 2007; 2(2): 3-15.
- 81.** Brandt H, Tamayo RP. Pathology of human amebiasis. *Human Pathol.* 1970; 1(3): 351-385.
- 82.** Tsutsumi V, Martinez-Palomo A. Inflammatory Reaction in Experimental Hepatic Amebiasis. *Am J Pathol.* 1988; 130(1): 112-119
- 83.** Olivos-García A, Nequiz-Avendaño M, Tello E, Martínez RD, González-Canto A, López-Vancell R, García de León MC, Montfort I, Pérez-Tamayo R. Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. *Exp Mol Pathol.* 2004; 77(1):66-71.
- 84.** Kim D, Kim YJ, Koh HS, Jang TY, Park HE, Kim JY. Reactive oxygen species enhance TLR10 expression in the human monocytic cell line THP-1. *Int J Mol Sci.* 2010; 11(10): 3769-3782.
- 85.** Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Res.* 2011; 21(1): 103-115.
- 86.** Schnabolk G, Beon MK, Tomlinson S, Rohrer B. New Insights on Complement Inhibitor CD59 in mouse Laser-Induced Choroidal Neovascularization: mislocalization after injury and targeted delivery for protein replacement. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2017; 33(5): 400-411.

## 14. Anexos

### Anexo 1. Stock de fosfatos pH 7.2

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.15 M

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.15 M

Adicionar monobásico al dibásico hasta llegar a un pH final de 7.2

### Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Stock de fosfatos pH 7.2 100 mL

NaCl 10.53 g

Disolver el NaCl y aforar a un volumen de 1 L con agua desionizada

### Anexo 2. Preparación de azul de tripan al 0.4%

Azul de tripan 400 mg

PBS 100 mL

Disolver el azul de tripan en 100 mL de PBS

### Anexo 3. Medio de cultivo TYI-S-33

Biosate peptona 120 g

Dextrosa 40 g

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  4 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.4 g

NaCl 8 g

Cisteína 4 g

Ácido Ascórbico 0.8 g

Citrato férrico de amonio (FAC) 90mg

Disolver secuencialmente los compuestos en 3480 mL de agua bidestilada.

Ajustar el pH a 6.8 con NaOH 1N

Filtrar con papel filtro

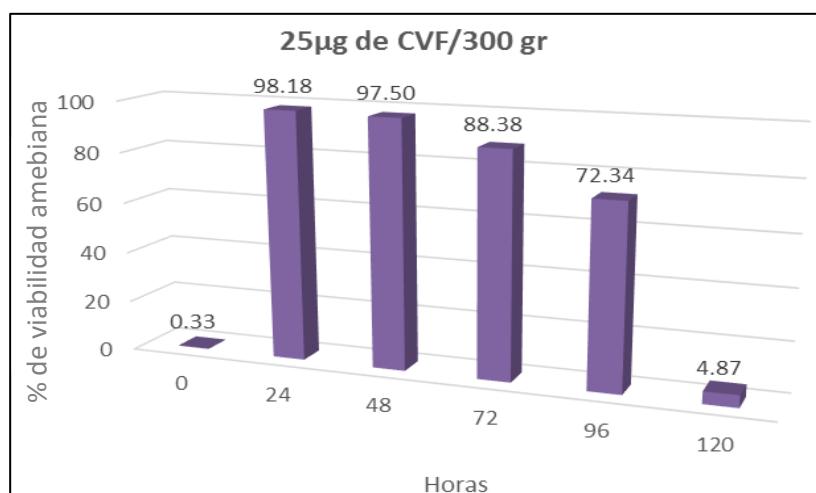
Esterilizar a 121°C por 15 min

Suplementar el medio con vitaminas 3% (tween 80 Mixtone) y suero bovino adulto

10%

#### Anexo 4. Evaluación de la actividad hipocomplementémica del CVF

La actividad hipocomplementémica del CVF purificado se evaluó *in vivo* inyectando 25µg de CVF puro por vía intraperitoneal en ratas Wistar de aproximadamente 300 gr, de acuerdo a los procedimientos descritos por Van den Berg en 1990. Posterior a esta administración se obtuvo sangre (1.5 mL/rata) de la cola cada 24 h durante 5 días y el suero se obtuvo por centrifugación a 4°C. El efecto hipocomplementémico del CVF se evaluó *in vitro* incubando trofozoitos virulentos de *E. histolytica* ( $1 \times 10^6$ ) con un ml de suero durante 2h a 37°C. Pasado el periodo de incubación, la viabilidad celular se determinó mediante la exclusión con azul tripán por medio de conteo directo en la cámara de Neubauer (Gráfica 6).



Gráfica 9. Evaluación de la actividad hipocomplementémica del CVF. La hipocomplementemia es total después de 24 y 48 h de la inyección del CVF y después los niveles de complemento gradualmente se restablecen a los cinco días.

#### Anexo 5. Validación del algoritmo informático para el conteo de leucocitos

Para validar el algoritmo informático para el conteo de leucocitos, se compararon cuentas manuales de los leucocitos presentes en una misma imagen vs cuentas automatizadas. Los datos obtenidos se graficaron y se les realizó una prueba de regresión lineal, mostrando una correlación cercana a uno.

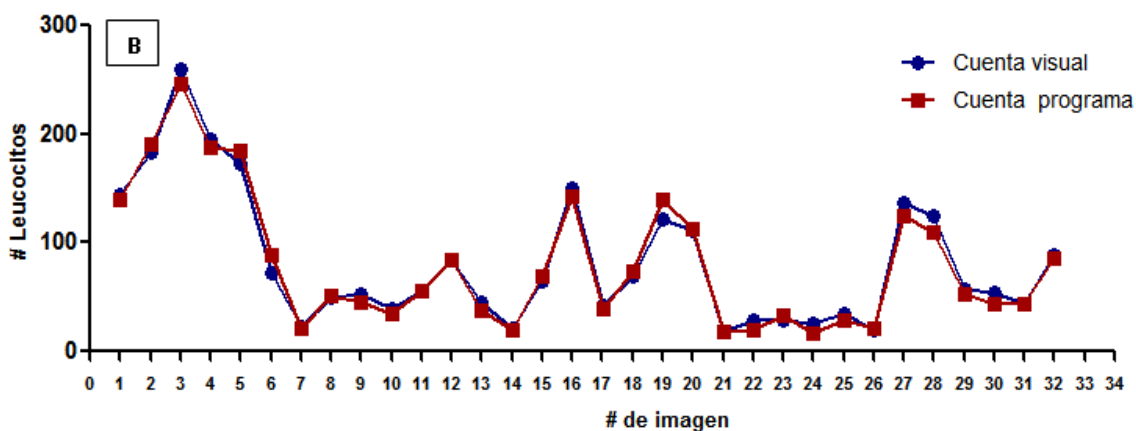
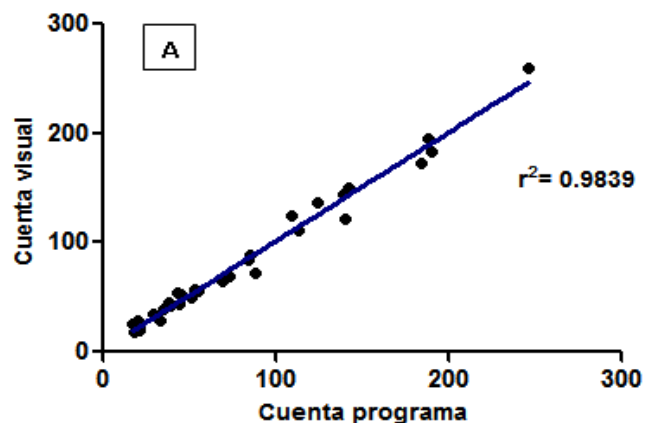


Figura 22. Validación del algoritmo informático para el conteo de leucocitos. **La** regresión lineal (A) mostró una correlación de 0.98. (B) Representación gráfica de ambos métodos de conteo para diferentes imágenes.

Una vez validado el algoritmo, se prosiguió al análisis cuantitativo de leucocitos presentes en los focos inflamatorios del hígado de ratón.

## Anexo 6. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de MDA y proteínas carboniladas

### 6.1. Cuantificación de MDA total por UPLC

- Condiciones cromatográficas

Para este análisis se utilizó un cromatógrafo UPLC, Acquity clase H (Waters) con una bomba cuaternaria y un detector de fluorescencia. Para la separación se utilizó una

columna Zorbax SB-C18 (Agilent) de 4.6 x 150 mm con tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ . Para la recopilación y procesamiento de los datos se utilizó el software Empower 3.0. Como fase isocrática se utilizó metanol:acetato de sodio 25 mmol/L (50:50 v/v) a un flujo de 0.3 mL/min. Se detectó el aducto MDA-TBA<sub>2</sub> en fluorescencia a  $\lambda_{\text{ex}} = 527$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 551$  nm.

- Preparación de los estándares

Se prepara una solución stock de 3000  $\mu\text{mol/L}$  de TMP (1, 1, 3, 3 tetra metoxi propano) en agua MilliQ que se usa como estándar de MDA. La solución stock se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los estándares de trabajo se prepararon diariamente en fresco (intervalo de 6.0 a 100  $\mu\text{mol/L}$ ).

## 6.2. Cuantificación de MDA total por UPLC

- Condiciones cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo UPLC, Acquity clase H (Waters) con una bomba cuaternaria y un detector de fluorescencia. Para la separación se utilizó una columna Yarra SEC 2000 de 300 x 7.8 mm, de tamaño de partícula de 3  $\mu\text{m}$ . como fase móvil se utilizó buffer de fosfatos pH=7.2 100nM a un flujo 0.7mL/min.

## **Anexo 7. Técnica para deshidratación, embebido y corte de tejidos en parafina**

Una vez obtenidos los tejidos, se colocan en formol al 10% vol/vol en PBS, hasta su inclusión en parafina. Enseguida se colocan los tejidos en casetes para su inclusión.

Se sigue el siguiente proceso:

- a) Formol 10%, 10 min
- b) Alcohol 96% 1, 2h
- c) Alcohol 96% 2, 2h
- d) Alcohol 96% 3, 2h
- e) Alcohol 100% 1, 2h
- f) Alcohol 100% 2, 2h
- g) Alcohol 100% 3, 2h
- h) Alcohol-Xilol (1:1), 2h

- i) Xileno 1, 2h
- j) Xileno 2, 2h
- k) Parafina 1, 2h
- l) Parafina 2 (Inclusión)

Una vez incluidos se ponen en la plancha fría para su solidificación, se realizan los cortes a 5µm, se colocan en laminillas con gelatina y finalmente se secan en el horno 30-45min (65°-70°C).

### **Anexo 8. Tinción de PAS**

1. los cortes se Desparafinan y deshidratan como a continuación se indica:
  - a. Xilol 1, 30min
  - b. Xilol 2, 30min
  - c. Xilol-alcohol absoluto, 45min
  - d. Alcohol absoluto, 20min
  - e. Alcohol 96%, 20min
  - f. Agua de la llave
  - g. Agua destilada
2. Colocar las laminillas en ácido peryódico (0.5%) por 10 min
3. Realizar 3 lavados con agua destilada
4. Incubar con reactivo de Schiff 10 min
5. Lavar con agua destilada
6. Colocar las laminillas en disulfito de sodio (0.5%) por 6 min
7. Lavar con agua de la llave por 10 min
8. Colocar las laminillas en hematoxilina de Harris 5 min
9. Pasar las laminillas en alcohol ácido (1 baño rápido)
10. Lavar las laminillas con agua de la llave
11. Pasar las laminillas en solución de carbonato de Litio 1% (3 veces)
12. Lavar las laminillas con agua de la llave
13. Regresar las laminillas por el tren de deshidratación en el orden inverso con los mismos tiempos.
14. Montar las laminillas en resina hidrofóbica.