



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

TESIS

***“Papel toxicológico del estrés oxidante durante la amibiasis intestinal en hámsteres vagotomizados”***

PRESENTA

**MA. DEL ROSARIO MONTOYA GARCÍA**

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
ÁREA TOXICOLOGÍA

COMITÉ TUTORAL

PhD. MARÍA DEL ROSARIO CAMPOS ESPARZA (Tutor)

DR. JAVIER VENTURA JUÁREZ (Tutor)

DR. ALFONSO OLIVOS GARCÍA (Asesor)

Aguascalientes, Ags. Junio del 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS  
BÁSICAS  
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **MA. DEL ROSARIO MONTOYA GARCÍA** con ID 10184 quien realizó la tesis titulado: **PAPEL TOXICOLÓGICO DEL ESTRÉS OXIDANTE DURANTE LA AMIBIASIS INTESTINAL EN HÁMSTERES VAGOTOMIZADOS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATE NTAMENTE  
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 1º. de Junio de 2015

PhD María del Rosario Campos Esparza  
Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Ciencias Básicas  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS  
BÁSICAS  
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **MA. DEL ROSARIO MONTOYA GARCÍA** con ID 10184 quien realizó la tesis titulado: **PAPEL TOXICOLÓGICO DEL ESTRÉS OXIDANTE DURANTE LA AMIBIASIS INTESTINAL EN HÁMSTERES VAGOTOMIZADOS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATE NTAMENTE  
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 1º. de Junio de 2015

Dr. Javier Ventura Juárez  
Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Ciencias Básicas  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

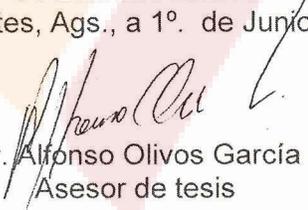
M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS  
BÁSICAS  
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **MA. DEL ROSARIO MONTOYA GARCÍA** con ID 10184 quien realizó la tesis titulado: **PAPEL TOXICOLÓGICO DEL ESTRÉS OXIDANTE DURANTE LA AMIBIASIS INTESTINAL EN HÁMSTERES VAGOTOMIZADOS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATE NTAMENTE  
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 1º. de Junio de 2015

  
Dr. Alfonso Olivos García  
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Ciencias Básicas  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**MA. DEL ROSARIO MONTOYA GARCÍA  
ALUMNA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS  
ÁREA TOXICOLOGÍA  
P R E S E N T E.**

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“Papel toxicológico del estrés oxidante durante la amibiasis intestinal en hámsteres vagotomizados”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

**ATENTAMENTE**

Aguascalientes, Ags., 09 de junio de 2015

**“SE LUMEN PROFERRE”**

EL DECANO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Ruiz Gallegos', written over a large, faint watermark of the university logo.

**M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS**

c.c.p.- Archivo.  
JJRG,yscd

Este trabajo de investigación ha sido financiado por:

- ✚ Beca de Maestría del Consejo Nacional de ciencia y Tecnología (275741)
- ✚ Proyecto CONACYT 2011 Medicina y Ciencias de la Salud: Mecanismos Moleculares de la Inflamación Modulados por el Sistema Nervioso Autónomo en un Modelo de Amibiasis Experimental (134487).
- ✚ Proyecto Interno de la UAA PIBB-11-3

## **AGRADECIMENTOS**

*Primeramente a Dios por darme la salud, la fuerza y la fe necesaria para lograr mis sueños y enfrentar los retos en mi vida.*

*A mi tutora Dra. María del Rosario Campos Esparza por la dedicación y entrega sin límites que puso para que todo saliera bien, gracias por su paciencia y comprensión.*

*A mi tutor Dr. Javier Ventura Juárez por su gran apoyo, sus enseñanzas, por compartir de una manera desinteresada todos sus conocimientos y contagiarme el gusto por la investigación.*

*Al Dr. Alfonso Olivos García por todo el apoyo brindado por sus consejos y valiosas enseñanzas.*

*Al Dr. Andrés Quintanar Stephano por alentarme y darme todas las herramientas para aprender a realizar las vagotomías.*

*A mis padres por todo el amor y dedicación que me profesaron a lo largo de su vida y que desde el cielo lo siguen haciendo.*

*A mi esposo Carlos por su gran amor y apoyo incondicional, por compartir conmigo esta aventura, que sin su ayuda no hubiera sido posible, gracias amor.*

*A mi hermoso hijo Emiliano por ser el sol que ilumina mi vida día a día.*

*A mis suegros por apoyarme en todos los momentos difíciles, a mis hermanas y hermanos, gracias por su apoyo y cariño*

*A todos los compañeros y amigos del laboratorio, a Liz por contagiarme su optimismo y apoyo, a Manuel por ser el sensei de la tecnología, a Sandra, Lety, Fabiola, Esperanza, Martín, Nayeli, Gaby, Enrique y Chava.*

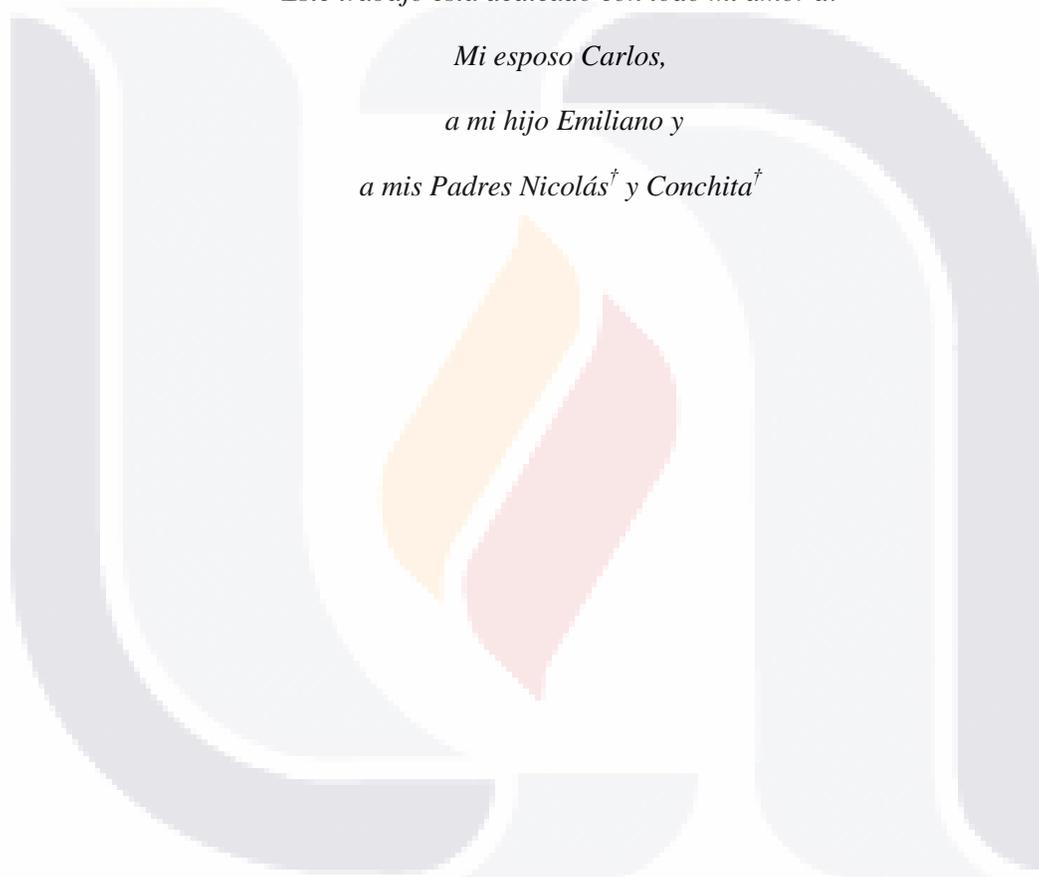
***DEDICATORIAS***

*Este trabajo está dedicado con todo mi amor a:*

*Mi esposo Carlos,*

*a mi hijo Emiliano y*

*a mis Padres Nicolás<sup>†</sup> y Conchita<sup>†</sup>*



**INDICE**

1. INTRODUCCIÓN ..... 4

    1.1. Amibiasis intestinal..... 4

    1.2. Respuesta inflamatoria durante la amibiasis intestinal..... 6

        1.2.1 Modulación de la respuesta inflamatoria por el nervio vago ..... 7

    1.3. Estrés oxidante durante la amibiasis..... 10

    1.4. Antioxidantes..... 12

2. ANTECEDENTES ..... 15

3. JUSTIFICACIÓN ..... 17

4. HIPÓTESIS ..... 18

5. OBJETIVO GENERAL ..... 18

6. OBJETIVOS PARTICULARES ..... 18

7. METODOLOGÍA ..... 19

    7.1. Animales Experimentales ..... 19

    7.2. Cultivo axénico de trofozoítos de *E. histolytica*..... 19

    7.3. Vagotomía ..... 19

    7.4. Modelo de amibiasis intestinal ..... 20

    7.5. Obtención y preparación de muestras..... 21

    7.6. Medición de la producción del anión superóxido ..... 21

    7.7. Detección de la enzima endógena Superóxido Dismutasa ..... 22

    7.8. Determinación de la enzima endógena Catalasa ..... 23

    7.9. Inmunohistoquímica ..... 24

    7.10. Histoquímica..... 25

    7.11. Tratamiento con apocinina..... 25

8. RESULTADOS..... 27

    8.1. Aumento en el peso del estómago en animales vagotomizados ..... 27

    8.2. Efecto de la vagotomía en la producción del anión superóxido en amibiasis intestinal 28

    8.3. Actividad de superóxido dismutasa en animales vagotomizados inoculados con *E. histolytica*..... 30

    8.4. Decremento de la actividad de catalasa en animales vagotomizados inoculados con *E. histolytica*..... 31

    8.5. La apocinina disminuye la respuesta inflamatoria en animales vagotomizados ..... 32

8.7. La apocinina estimula la fagocitosis de células de la respuesta inmune por *E. histolytica* ..... 36

9. DISCUSIÓN ..... 39

10. CONCLUSIÓN..... 42

Apéndice A..... 49

Apéndice B..... 49

Apéndice C..... 50

Apéndice D..... 51



## **RESUMEN**

*Entamoeba histolytica* es un parásito protozoario responsable de la amibiasis exclusiva del ser humano, es frecuente en países subdesarrollados y provoca aproximadamente cien mil muertes por año en el mundo. Diversas especies de amibas colonizan el intestino, sólo *Entamoeba histolytica* es capaz de invadirlo y a otros órganos. La amibiasis intestinal invasiva se caracteriza por lesiones ulcerosas, diarrea, fiebre y abundante inflamación, con infiltrado de neutrófilos y macrófagos acompañados de estrés oxidante mediante la generación de Especies Reactivas de Oxígeno. Por otra parte, el nervio vago del Sistema Nervioso Parasimpático interactúa con el Sistema Inmune para modular la inflamación. Para conocer el papel toxicológico del estrés oxidante en la amibiasis intestinal en hámsteres vagotomizados, determinamos la presencia de las Especies Reactivas de Oxígeno en un modelo de amibiasis intestinal 10 h en hámsteres vagotomizados. Se utilizaron 145 hámsteres dorados machos (*Mesocricetus auratus*) y se dividieron en 7 grupos: Intacto, Control, Control + amiba, Sham, Sham + amiba, vagotomizado y vagotomizado + amiba, a otros 7 grupos se les agregó apocinina. Los animales con vagotomía a los 32 días post-cirugía, se les inyectó en el ciego 500,000 trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (HM1:IMSS). Para observar el daño, a todos los grupos se les cuantificó la producción del anión superóxido, el número de amibas y la actividad de las enzimas antioxidantes Superóxido Dismutasa y Catalasa, finalmente se analizó la lesión tisular en muestras de ciego. La ausencia del nervio vago en la amibiasis intestinal incrementa la expresión del anión superóxido y disminuye el número de trofozoítos en la submucosa, así como la actividad de las enzimas antioxidantes Superóxido Dismutasa y Catalasa. Sin embargo, los animales vagotomizados, en presencia de apocinina incrementaron significativamente la expresión de Superóxido Dismutasa y se observó que *Entamoeba histolytica* aumento cualitativamente la fagocitosis de leucocitos, sin embargo, no mostró cambios en el número de trofozoítos. Estos resultados sugieren que la vagotomía en la amibiasis intestinal induce estrés oxidante y eliminación de *Entamoeba histolytica*. Por otra parte, la apocinina ayuda a disminuir el proceso inflamatorio y a promover la eliminación del parásito.

**PALABRAS CLAVE:** *Amibiasis intestinal, Antioxidante, Estrés oxidante, Inflamación, Sistema Nervioso Parasimpático*

# TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Amibiasis intestinal

El ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) inicia con la ingestión de agua o alimentos contaminados con quistes del parásito (forma infectante) algunos de los cuales al llegar al lumen del intestino delgado favorecidos por el pH del medio, se desenquistan y se transforman en trofozoítos, estos al llegar al intestino grueso proliferan; y algunos vuelven a enquistar. Finalmente al salir junto con las heces los quistes están listos para reiniciar su ciclo biológico (Olivos-García A. y cols. 2011) (Fig. 1).

El mecanismo de la infección en el intestino es complejo e implica inicialmente la degradación de la capa de moco, seguido por adhesión y lisis de las células epiteliales, y afluencia de neutrófilos y macrófagos que tratan de eliminar al parásito. Si esto no ocurre, el parásito puede migrar a sitios extraintestinales, siendo el absceso hepático amibiano la complicación extraintestinal más frecuente de amibiasis invasiva, aunque los pulmones, el corazón, el cerebro, la piel, y los genitales también pueden verse afectados (Khan, 2008). El curso y el resultado final de la infección dependen de una variedad de factores tales como la virulencia de la cepa infectante y factores del hospedero que pueden alterar el riesgo y la severidad de la enfermedad (Sargeaut P. y cols. 1978). La amibiasis invasiva se caracteriza por tener áreas con abundante inflamación (Campos-Rodríguez R. y cols. 2009) con un gran infiltrado de neutrófilos y macrófagos que hace que aumente el estrés oxidativo generando especies reactivas de oxígeno (ROS).

Aproximadamente 500 millones de personas son infectadas en el mundo por *E. histolytica* (Wong-Baeza, 2010). A pesar de la gran efectividad y disponibilidad de los fármacos antiamibianos, la amibiasis continúa siendo un problema de Salud Pública Mundial. La prevalencia de la amibiasis varía desde el 1% en países industrializados hasta el 50 - 80% en los llamados en desarrollo (Khan, 2008).

Se sabe que el 10% de las personas infectadas con *E. histolytica* muestran sintomatología. De estos casos, del 80 al 98% son intestinales y del 2 al 20% extraintestinales. Los síntomas clínicos pueden variar desde una presentación leve y no específica (estreñimiento alternado con diarrea, dolor en la parte inferior del abdomen,

náusea leve durante o después de la comida, distensión abdominal con dolor en la fosa iliaca derecha) hasta disentería para la colitis fulminante y megacolon tóxico.

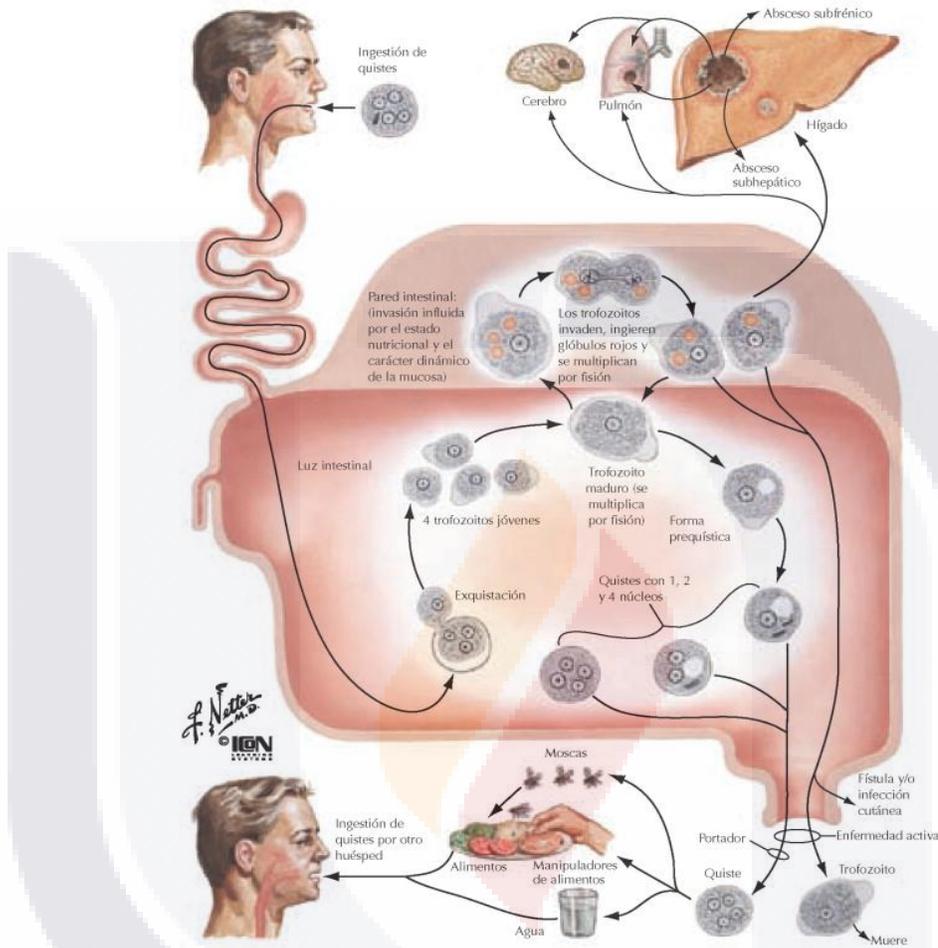


Fig. 1 Ciclo de vida y sitios de infección por *E. histolytica* (Netter, 2006).

Con menor frecuencia la amibiasis puede causar apendicitis o ameboma (Wong-Baeza, 2010). La destrucción tisular y la capacidad de invasión de la mucosa colónica durante la amibiasis intestinal (Fig. 2), ha sido relacionada con una gran cantidad de moléculas producidas por *E. histolytica* como: adhesinas, amiboporos y proteasas. Los amiboporos de *E. histolytica* son péptidos capaces de destruir algunas bacterias ingeridas. Las proteasas pueden ayudar a degradar la matriz extracelular durante la invasión y promover la lisis de las células diana. También, se sabe que las amibas producen el factor de inhibición de locomoción de neutrófilos que inhibe la quimiotaxis y la quimioquinesis de macrófagos (Kretschmer R. y cols. 1985).



**Fig. 2** Trofozoítos de *E. histolytica* invadiendo la mucosa intestinal de conejillo de india (Espinoza-Cantellano, 2000).

## 1.2. Respuesta inflamatoria durante la amibiasis intestinal

En la amibiasis intestinal, la invasión de la mucosa por trofozoítos de *E. histolytica* va acompañada por un infiltrado inflamatorio constituido principalmente por neutrófilos y macrófagos que se reclutan en el sitio de la lesión, y son incapaces de eliminarlo (Espinoza-Cantellano, 2000) (Fig. 3). Se ha demostrado que las células epiteliales desempeñan un papel activo en la respuesta inmune contra la *E. histolytica* a través de la secreción de una gran variedad de citocinas pro-inflamatorias. Éstas incluyen a las interleucinas IL-8, IL-6 e IL-1 $\alpha$  que son quimioatrayentes de monocitos, a la proteína 1 (MCP-1), al factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), las cuales estimulan la destrucción del tejido epitelial y facilitan la invasión por *E. histolytica* (Eckmann L. y cols. 1995). Además, las cisteín proteasas (Li E., Yang W-G., Zhang T. y Stanley S. 1995) pueden contribuir con la destrucción de la matriz extracelular durante la invasión y favorecer a la lisis de las células diana. Una adherencia multifuncional con lectina Gal/GalNAc le permite al parásito la unión a la mucosa del colon, lo cual evita su eliminación del tracto intestinal. La lectina también está relacionada con la resistencia amibiana al complemento ya que inhibe el depósito del complejo de ataque a través de una secuencia similar a CD59. Además, la lectina también podría participar en el anclaje de la amiba a los proteoglicanos durante el proceso de invasión.

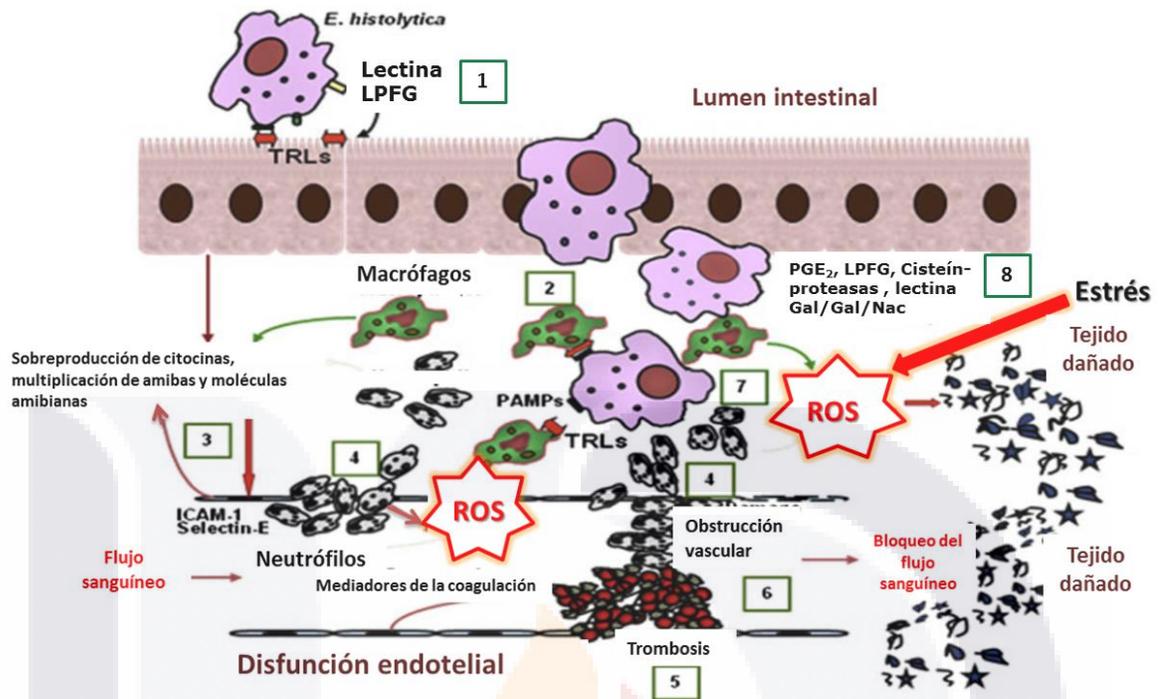
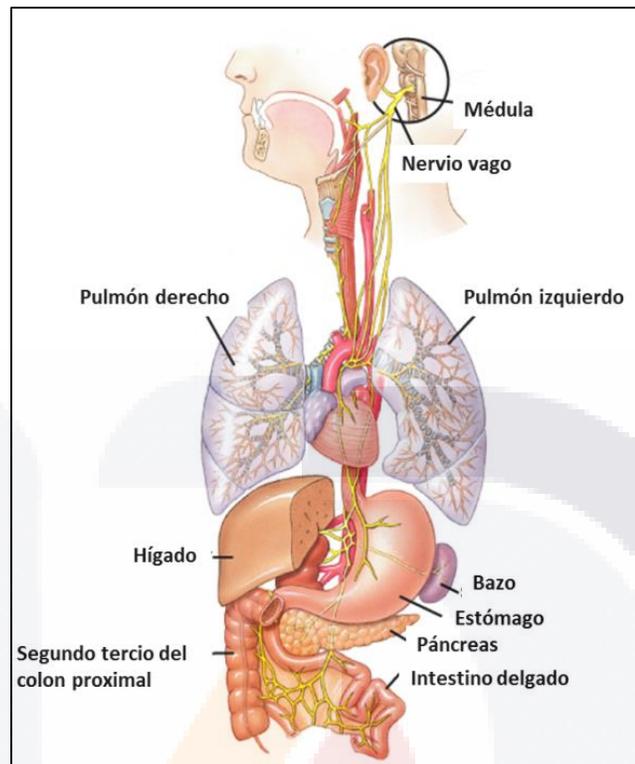


Fig. 3 Respuesta inmune de *E. histolytica* y producción de estrés oxidante (Campos - Rodríguez R., 2009).

Por otra parte los amiboporos de *E. histolytica* son péptidos pequeños de 77 residuos de aminoácidos con 3 isoformas (A, B y C, presentes en una proporción de 35:10:1 respectivamente) que forman canales y destruyen algunas bacterias ingeridas que pueden servir como nutrientes (Akbar M. y cols. 2004).

### 1.2.1 Modulación de la respuesta inflamatoria por el nervio vago

El nervio vago se distribuye por todas las regiones de la cabeza, cuello, tórax y abdomen para inervar numerosas vísceras, y por esto se denomina vago. Dentro de sus múltiples funciones, el nervio vago es el conductor principal de señales entre dos vías de comunicación, entre el Sistema Nervioso Central (SNC) y el Sistema Nervioso Entérico (SNE). Mientras que el SNE es capaz de funcionar de manera independiente, la función gastrointestinal (GI) normal requiere del SNE y de la inervación vagal. La inervación vagal es esencial para la homeostasis, la saciedad, náuseas, detección de dolor visceral y operaciones de esfínteres. Las fibras motoras y sensoriales del nervio vago se encuentran a través de toda la longitud del tracto gastrointestinal, desde el esófago hasta el colon (Fig. 4) (Elayne y Ratcliffe, 2011).



**Fig. 4** Distribución del nervio vago (Netter, 2006).

El nervio vago establece un puente de comunicación inmune-cerebro (Fig. 5). La regulación de la respuesta inmune innata es fundamental para controlar la inflamación y para la prevención y tratamiento de algunas enfermedades. Se ha descrito un papel anti-inflamatorio de las ramas eferentes del nervio vago a través de la vía colinérgica anti-inflamatoria: la acetilcolina es liberada sobre el sitio distal y final de las ramas eferentes del nervio vago que interactúan con la subunidad  $\alpha 7$  de los receptores nicotínicos de los macrófagos humanos para inhibir la liberación de citocinas pro-inflamatorias tales como el TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, inhibiendo la inflamación (Pavlov y Tracey, 2005).

Otros estudios han revelado que la vagotomía hepática en un modelo de absceso hepático amibiano (AHA) en hámster interrumpió la respuesta inflamatoria, disminuyendo significativamente la cantidad de neutrófilos infiltrados, sin observar cambios en la cantidad de macrófagos encontrados, por otro lado, en ese estudio, no se analizó el papel de la amiba en la producción de estrés oxidante. Esto sugiere que la vagotomía hepática podría dejar predominantemente el control del proceso inflamatorio al Sistema Nervioso Simpático, induciendo a las células estelares hepáticas a diferenciarse en miofibroblastos

formando de este modo una barrera de colágeno que bloquearía la migración del trofozoíto (Muñoz-Ortega M. y cols. 2011).

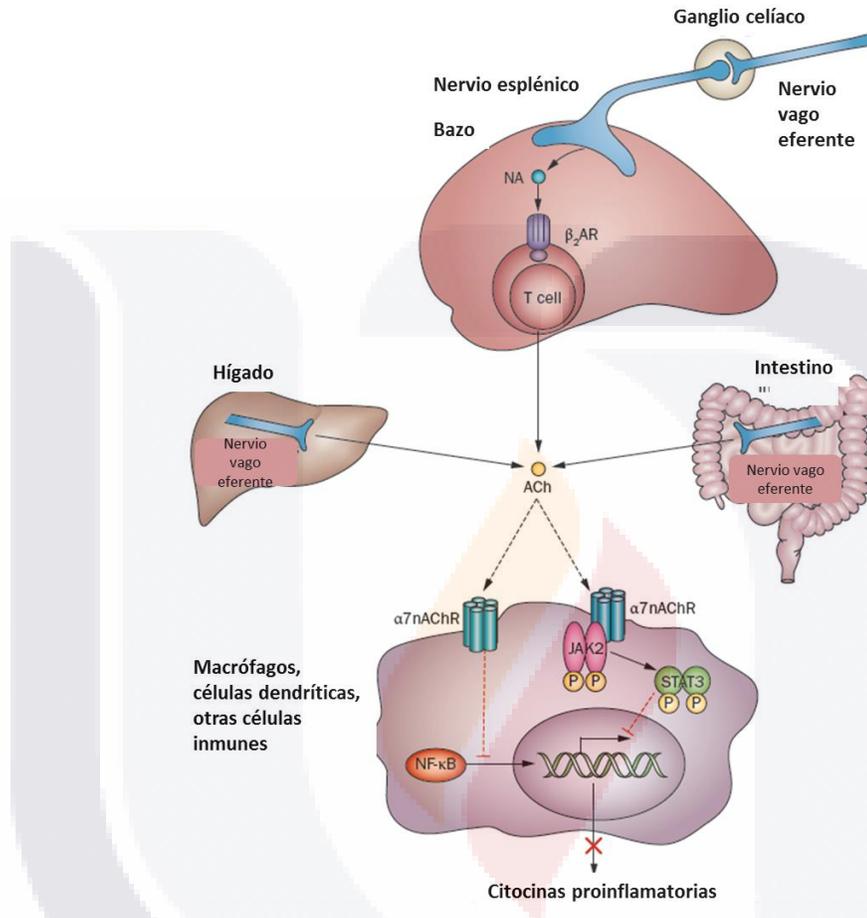


Fig. 5 Mecanismo molecular del control colinérgico de la inflamación (Pavlov y Tracey, 2012).

El nervio vago es un modulador de la inflamación intestinal (Van Der Zanden E., Boecxstaens G. y De Jonge W., 2009) a través de la vía colinérgica anti-inflamatoria, regulando la liberación de acetilcolina (ACh) que actúa sobre los receptores  $\alpha 7$  nicotínicos presentes en células del sistema inmune como macrófagos y linfocitos T y B (Sánchez-Alemán E. y cols. 2015) inhibiendo la liberación de citocinas pro-inflamatorias.

### 1.3. Estrés oxidante durante la amibiasis

El estrés oxidante es un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la incapacidad de las defensas antioxidantes para detoxificar rápidamente los intermediarios reactivos o reparar el daño resultante (Roberts y Sindhu, 2009). Las ROS son derivadas de vida corta del metabolismo del oxígeno producido en todos los sistemas biológicos que reaccionan con moléculas cercanas a su sitio de formación: anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), óxido nítrico (NO) y radical peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), que en concentraciones bajas son indispensables en varios procesos bioquímicos, como mensajeros intracelulares, diferenciación celular, apoptosis y defensa contra microorganismos (Roberts, 2009). Bajo condiciones fisiológicas el exceso de peroxinitrito (y otros ROS), es impedido por sistemas de defensa antioxidantes de las células del sistema inmune innato, donde la unión a una proteína adecuada y la formación de un enlace disulfuro impide la formación del radical dañino (Olivos-García A., Saavedra E., Luis-García E., Nequiz M. y Pérez-Tamayo R., 2012).

Algunas células del sistema inmune innato como macrófagos, neutrófilos y células NK son activadas durante la infección de parásitos unicelulares, virus o bacterias. Estas células atacan a los patógenos mediante la liberación de una variedad de moléculas efectoras, como el óxido nítrico (NO), que es uno de los mensajeros intracelulares más versátiles conocidos dentro del sistema inmune. Los macrófagos activados sintetizan altos niveles de NO que favorecen la interacción con ROS y la consecuente producción de peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), un radical muy potente que puede favorecer la apoptosis y causar destrucción celular (Olivos-García A., 2012).

Durante la amibiasis intestinal, con ulceración superficial, se ha observado la infiltración de neutrófilos a la lámina propia. Durante esta etapa los neutrófilos rodean a las amibas, lo que conduce a una lisis rápida de células inflamatorias y necrosis de tejidos (Espinosa-Cantellano, 2000).

Durante mucho tiempo se sostuvo que la patogenicidad de *E. histolytica* se debía a su capacidad para destruir los tejidos, sin embargo, recientemente se ha demostrado que la respuesta inflamatoria es la principal causa de dicha destrucción. Con la isquemia que

produce la inflamación se crea un microambiente favorable para la sobrevivencia del parásito al disminuir el acceso de moléculas potencialmente tóxicas como el complemento, los anticuerpos, el oxígeno y ROS (Olivos-García A. y cols. 2004).

*E. histolytica* es un organismo microaerofílico que no tolera concentraciones elevadas de oxígeno (más del 5%), sin embargo, durante la invasión a los tejidos, los trofozoítos están expuestos a un ambiente rico en oxígeno lo cual requiere la regulación específica de ciertas proteínas para mantener sus funciones biológicas y sobrevivir (Akbar M. y cols. 2004).

*E. histolytica* podría contrarrestar el ROS producido por el estallido oxidativo a través de una gran variedad de enzimas antioxidantes tales como i) NADPH:flavin oxidoreductasas (Eh34) (Bruchhaus y cols. 1998), tioredoxin reductasa (Arias y cols. 2012) y EhNO<sub>2</sub> (Jeelani y cols. 2010), que reducen el O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ii) hierro-superóxido dismutasa (FeSOD) (Tannich y cols., 1991) que es capaz de detoxificar al O<sub>2</sub> • que es generado principalmente por auto-oxidación de proteínas (Olivos-García A. y cols. 2012); iii) rubrerytrin (Maralikova y cols. 2010) y peroxiredoxina (Bruchhaus, y cols. 1997) que son capaces de detoxificar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O; y iv) proteína flavodihierro (FDP) (Vicente, y cols. 2012) que reduce el O<sub>2</sub> directamente en H<sub>2</sub>O evitando de este modo la generación de ROS.

Se ha demostrado que las peroxirredoxinas (Eh29) de *E. histolytica* desempeñan un papel importante en la virulencia del parásito durante la infección, ayudándolo a sobrevivir al ataque de ROS y RNS (Especies Reactivas de Nitrógeno) producido por las células inflamatorias del hospedero. La inhibición de la expresión genética de Eh29 produjo abscesos hepáticos menores en hámsteres inoculados comparados con una cepa normal HM1:IMSS, lo que sugiere que Eh29 desempeña un papel de supervivencia en los trofozoítos en presencia de ROS (Zen A. y cols. 2007).

Otros estudios han demostrado que hay una sobreexpresión en los niveles de mRNA de Eh29, SOD, EhCP5 (cisteín proteínasa 5) y proteína G, en lisados de cultivos de *E. histolytica* expuestos a altas concentraciones de oxígeno comparados con cultivos normales del parásito (Akbar M. y cols. 2004).

## 1.4. Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas capaces de estabilizar o desactivar a los radicales libres antes de que causen daño a las células. Existen sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, y éstos pueden ser de naturaleza endógena o exógena. Algunos compuestos exógenos que podemos ingerir con la dieta, que no neutralizan a los radicales libres, pero, que mejoran la actividad antioxidante endógena pueden ser clasificados como antioxidantes indirectos (Rahman, 2007). Los humanos y los animales han desarrollado sistemas antioxidantes endógenos para protegerse de los radicales libres a) defensas enzimáticas: GPx (Glutathion peroxidasa), SOD y CAT, y b) defensas no enzimáticas: GSH, las proteínas transferrina y ferritina, la melatonina, los uratos y los tioles de las proteínas plasmáticas. Como ejemplos de antioxidantes exógenos podemos señalar a la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) y los flavonoides. A pesar de la presencia de defensas antioxidantes, algunas ROS escapan y causan daño celular, por ello los sistemas antioxidantes de los seres vivos también incluyen mecanismos de reparación del daño, basados en proteasas, lipasas, transferasas y enzimas reparadoras del ADN (Jaramillo Juárez, Rincón Sánchez y Martínez Saldaña, 2012).

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que cataliza la dismutación del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno y se representa por las siguientes reacciones:



Donde M = Cu (n = 1); Mn (n = 2); Fe (n = 2) y Ni (n = 2).

Existen varias formas comunes de SOD con cofactores como Cu, Zn, Mn, Fe y Ni. La SOD 1 se localiza en el citoplasma de todas las células eucariotas, es un homodímero de 32.5 KDa que contiene Cu y Zn; la SOD 2 se encuentra en matriz mitocondrial, es un homotetrámero que contiene Mn como cofactor en cada unidad y la SOD 3 (EC-SOD) se encuentra en el espacio extracelular, es un homotetrámero que contiene 1 Cu y 1 Zn en cada subunidad, el 99% de ésta enzima está anclada a los proteoglicanos en el intersticio del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tejido y el 1% se encuentra en el sistema vascular entre el plasma y el endotelio, se expresa en tejidos como vasos sanguíneos, corazón, pulmones, riñones y placenta. *Echerichia coli* y muchas bacterias tienen una variante de la enzima: Fe-SOD o Mn-SOD o ambas. La catalasa es una enzima oxidorreductasa que transforma el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular, es un tetrámero de 60 KDa que tiene como cofactores al grupo hemo y al Mn (Jaramillo-Juárez, 2012).

La apocinina es un antioxidante de origen natural de tipo fenólico y es capaz de inhibir la enzima NADPH oxidasa. Este compuesto se encuentra en las raíces de *Apocynum cannabinum* y *Picrorhiza kurroa*. Desde hace cientos de años, los extractos de estas plantas han sido utilizados para el tratamiento de la inflamación y ciertas enfermedades infecciosas (Engels F. y cols. 1992). En condiciones *in vivo* la apocinina convierte el fenol en metabolitos activos que inhiben a la enzima NADPH oxidasa, la cual es un complejo multienzimático presente en las membranas plasmáticas de las células del sistema inmune y leucocitos (Groemping y Rittinger, 2005) que cataliza la producción del anión superóxido. Wang Q. y cols. (2006) observaron que la apocinina protegió contra el estrés oxidante generado por isquemia cerebral global inducida en el hipocampo de hámsteres.

En otras infecciones parasitarias como la enfermedad de Chagas producida por el *Trypanosoma cruzi* se observó una disminución en la miocarditis que se caracteriza por la presencia de infiltrado inflamatorio, hipertofia y fibrosis en ratones que recibieron apocinina en el agua de beber. Histológicamente en esta infección se observó una disminución de infiltrado inflamatorio específicamente de macrófagos (CD68<sup>+</sup>), neutrófilos (Ly-6G<sup>+</sup>) y células T CD8<sup>+</sup> en tejido cardíaco (Dhiman M. y Garg N., 2011).

Otro antioxidante natural xantonóide polifenólico, la mangiferina (1,3,6,7-tetrahidroxantona C2-β-D glucoside), que se sugiere tiene propiedades farmacológicas como agente antimicrobiano, antidiabético, anti-inflamatorio y antioxidante, se ha visto que tiene un efecto protector contra varias enfermedades parasitarias. García D. y cols. (2003), estudiaron las propiedades antihelmínticas y antialérgicas de la mangiferina en ratones infectados con *Trichinella spiralis*, encontrando una disminución significativa en el número de larvas enquistadas en el músculo. En 2006, Perrucci y cols. evaluaron el efecto de la

mangiferina sobre el parásito *Cryptosporidium parvum* en un modelo de ratones neonatos, y encontraron que la mangiferina reduce de significativamente la colonización intestinal por oocistos de *C. parvum*.



## 2. ANTECEDENTES

Estudios *in vitro* han demostrado que el NO desempeña un papel importante en el control de parásitos protozoarios y en la muerte de trofozoítos de *E. histolytica*. En el año 2011, Namiduru y cols. observaron un aumento en los niveles séricos de NO y malondialdehído en suero de pacientes con amibiasis intestinal aguda.

En 2011 Muñoz-Ortega y cols. estudiaron los efectos de la vagotomía en la respuesta inmune innata en hámsteres con absceso hepático amibiano. En este estudio la vagotomía modificó la respuesta anti-inflamatoria, causando un decremento en la respuesta pro-inflamatoria y una disminución en la cantidad de neutrófilos y de trofozoítos.

Las ROS están implicadas en diversos aspectos de la inflamación intestinal y en el desarrollo de tumores.

La disminución de los niveles de ROS utilizando enzimas antioxidantes, como la catalasa (CAT) o superóxido dismutasa (SOD), ha mostrado ser útil en el tratamiento de algunas enfermedades intestinales. LeBlanc C. y cols. (2011) encontraron que las bacterias ácido lácticas (LAB) modificadas por ingeniería genética producen enzimas antioxidantes que pueden ser utilizadas para prevenir o disminuir la gravedad de ciertas enfermedades inflamatorias del intestino (IBD) causadas por la presencia de ROS, como la colitis ulcerativa (UC) y la enfermedad de Crohn (CD).

Experimentos previos en un modelo de amibiasis intestinal en nuestro laboratorio indican que *E. histolytica* induce la formación del anión superóxido en la parte proximal del ciego en hámsteres a las 10 horas posterior a la inoculación de trofozoítos de *E. histolytica*, así como un aumento en el número de macrófagos y neutrófilos en etapas tempranas de la infección. También se ha observado el aumento de la citocina anti-inflamatoria TGF- $\beta$  en mucosa y submucosa.

Diversos estudios han demostrado que la regulación de la respuesta del sistema inmune innato es crucial para controlar la inflamación y para la prevención o tratamiento de la enfermedad. Pavlov y Tracey (2005), demostraron que el nervio vago eferente inhibe la liberación de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 protegiendo así contra la inflamación sistémica, mediante la “vía colinérgica anti-inflamatoria”. Otros estudios mostraron que algunas citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  estimulan al nervio vago

desde sus ramas terminales en el intestino para inducir una respuesta moduladora anti-inflamatoria inhibiendo la activación de neutrófilos y macrófagos y por ende la disminución en la producción de estrés oxidante (Borovikova y cols. 2000).



### 3. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial la amibiasis es la tercera enfermedad parasitaria más frecuente. La mortalidad causada por esta enfermedad ha disminuido significativamente en los últimos años debido a la implementación de medidas sanitarias adecuadas y al uso de agentes terapéuticos eficaces. A pesar de la efectividad y disponibilidad de los agentes terapéuticos para el tratamiento de la amibiasis, ésta todavía constituye un problema de salud mundial. La prevalencia varía desde el 1% en países industrializados, hasta el 50 - 80% en los países con zonas tropicales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de Salud (OPS) recomiendan el tratamiento de todos los pacientes infectados con *E. histolytica*, independientemente de la presencia de síntomas.

Los trofozoitos de *E. histolytica* viven en el lumen del intestino grueso, donde se multiplican y se diferencian en quistes que son la forma infectante. Los trofozoitos pueden invadir la mucosa del colon y causar disentería, migrar y dar lugar a lesiones extraintestinales como el absceso hepático amibiano (AHA): aunque el cerebro, corazón, pulmones, piel y genitales también pueden verse afectados. Es de suma importancia la eliminación de *E. histolytica* dentro del intestino para evitar su migración a sitios extraintestinales.

El sistema nervioso a través del nervio vago puede inhibir de una manera rápida y significativa la liberación de TNF de macrófagos y bloquear la respuesta sistémica inflamatoria inhibiendo la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, evitando así la producción de ROS como el anión superóxido.

Debido a que en los animales vagotomizados no existe esta conexión neuroinmune que controle la respuesta anti-inflamatoria, en el presente trabajo se analiza la posible participación del nervio vago en el desarrollo de la amibiasis intestinal y en la generación del anión superóxido.

#### **4. HIPÓTESIS**

El sistema nervioso parasimpático, por medio del nervio vago, estimula la respuesta pro-inflamatoria en un modelo de amibiasis intestinal a través del aumento en la producción de ROS.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto del estrés oxidante sobre los tejidos intestinales en un modelo de amibiasis en hámsteres vagotomizados.

#### **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Estandarizar el procedimiento de vagotomía.
2. Desarrollar el modelo de amibiasis intestinal durante 10 h post-inoculación.
3. Localizar y cuantificar al anión superóxido *in vivo* en las lesiones amibianas.
4. Cuantificar la actividad de la superóxido dismutasa y catalasa en las lesiones amibianas.
5. Determinar si el uso de la apocinina reduce el estrés oxidante y/o daño intestinal.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Animales Experimentales

Se utilizaron hámsteres dorados machos (*Mesocricetus auratus*) de aproximadamente 8 semanas de edad con un peso de 130 – 170 g los cuáles se dividieron en cuatro grupos experimentales: animal Intacto (n=15), Control (n=40), SHAM (n=40) y Vagotomizado (n=40).

### 7.2. Cultivo axénico de trofozoítos de *E. histolytica*

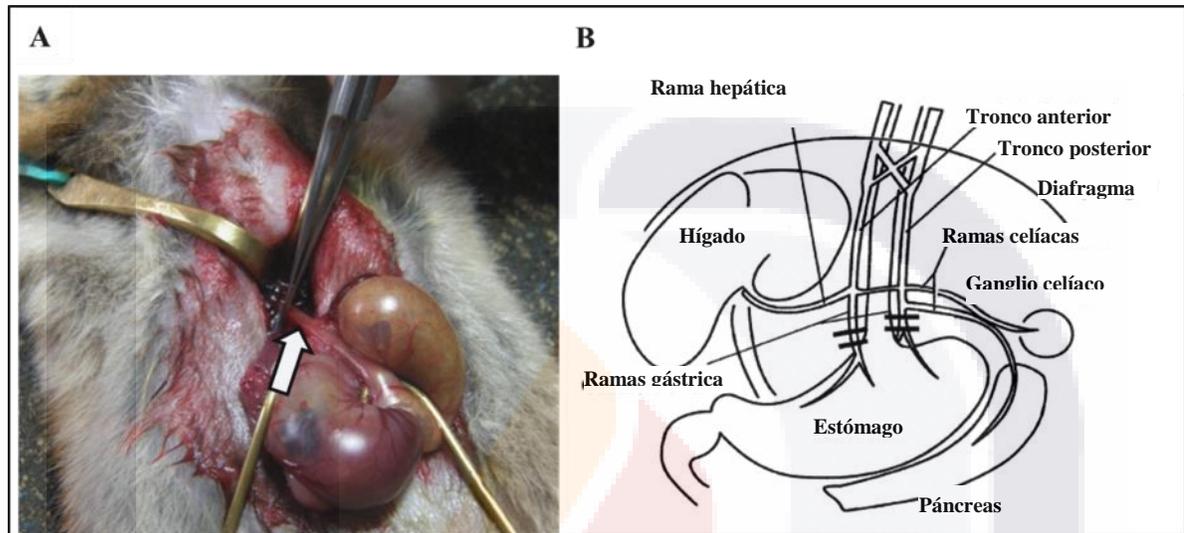
Trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS fueron cultivados axénicamente en medio TYI-S-33 (Diamond y cols. 1978). Para mantener la virulencia de este parásito a los trofozoítos se les cambió el medio y se les puso medio sin complementar, se colocaron 5 minutos a 4 °C y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm a 4°C durante 20 min, se decantó el sobrenadante y el pellet de trofozoítos se resuspendió en medio sin complementar para obtener una concentración de 500,000 a  $1 \times 10^6$  trofozoítos/100  $\mu$ L, los cuáles fueron inoculados en el lóbulo derecho del hámster. Después de 72 h y bajo condiciones de esterilidad se extrajeron los abscesos formados para recuperar la amiba, cultivarla y volverla a inocular en hígado de hámster varias veces hasta obtener abscesos de gran tamaño que indica que la amiba está en fase virulenta.

### 7.3. Vagotomía

A los hámsteres, después de 24 horas de ayuno, bajo anestesia general (pentobarbital, 63 mg/kg de peso) y condiciones de esterilidad, se les realizó la vagotomía gástrica. Se diseccionaron (Tanaka y cols. 1987) las dos ramas gástricas del nervio vago (anterior y posterior) que corren a lo largo del esófago hasta el estómago (Fig. 6B), (Kintaka Y., 2009). Por laparotomía y con la ayuda de un estereomicroscopio (Zeiss OPM119-FC) se procedió a realizar la disección de aproximadamente 1 cm. de longitud, de las dos ramas gástricas del nervio vago (Fig. 6A).

Posteriormente los animales fueron suturados y puestos en su ambiente habitual; las heridas fueron limpiadas a diario con isodine para evitar que se infectaran y se dejaron en

recuperación por un tiempo de 30 días antes de la realización del modelo de amibiasis intestinal. El grupo SHAM se manipuló de la misma forma que los animales vagotomizados: se exteriorizó el esófago y se separaron las dos ramas vagales, sólo que sin diseccionarlas.



**Fig. 6** Vagotomía gástrica en hámster macho (*Mesocricetus auratus*). A) La imagen muestra la exteriorización y separación del esófago, y la localización del nervio vago unido al esófago (flecha). B) Diagrama esquemático que muestra la innervación vagal abdominal, las dobles líneas representan la localización de la disección de las dos ramas gástricas del nervio vago (Kintaka, Y., 2009).

#### 7.4. Modelo de amibiasis intestinal

A los grupos experimentales: Intacto, Control, SHAM y Vagotomizado se les administró 0.1 g de sulfato de neomicina y 1 g de sulfadimetilpirimidina/ L de agua por vía oral durante 5 días, 3 días después se dejaron en ayuno durante 24 h. Los animales fueron anestesiados con dietil éter bajo condiciones de esterilidad y por laparotomía se procedió a exteriorizar el ciego. Se cerró la válvula íleo cecal con un hilo y se introdujo una aguja con calibre 18G dentro del lumen intestinal cerca de la parte proximal de la válvula íleo cecal y se aseguró con un hilo sobre la pared intestinal. Después se seccionó la región proximal del ciego y se introdujo una cánula de plástico dentro de la apertura final y se aseguró el lugar con un hilo. Se lavó el ciego con solución salina estéril al 0.9% a través de la aguja para eliminar totalmente el contenido intestinal, posteriormente la cánula fue removida y el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ciego se cerró. Enseguida a través de la aguja se procedió a realizar la inoculación (Anaya y cols. 1985) de 400 a 500 mil trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS en 100  $\mu$ L de medio TYI-S-33, y se cerró con un hilo el lugar de punción, a continuación se acomodaron los intestinos y se cerró la pared abdominal del hámster. A los grupos Control, SHAM y Vagotomizados sin infección se les administró 100  $\mu$ L de medio TYI-S-33 estéril. Transcurridas 10 h post-inoculación con *E. histolytica*, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico.

### **7.5. Obtención y preparación de muestras**

Los hámsteres fueron anestesiados con pentobarbital (63 mg/kg de peso) a las 10 h de haber realizado la inoculación de los trofozoítos de *E. histolytica* y se procedió a perfundir con PBS estéril por vía intracardiaca a 4°C. Después se abrió el abdomen y se seccionó la parte proximal del ciego, se colocó en una caja Petri y se lavó varias veces con solución salina (0.9 %) a 4°C. El tejido fue dividido en dos partes, la parte más grande se usó para el análisis de las enzimas (SOD y CAT) y rápidamente se pesaron y congelaron a -80°C para su análisis posterior (Dobashi Y. y cols. 2012). La parte restante del ciego se colocó y extendió cuidadosamente en una caja Petri con parafina que contenía paraformaldehído al 4% en PBS y se dejó durante 24 h a 4°C para su procesamiento posterior para inmunohistoquímica e histología.

### **7.6. Medición de la producción del anión superóxido**

El anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) se forma cuando el oxígeno molecular ( $O_2$ ) capta un electrón proveniente del medio, que puede ser generado por NADPH oxidasa ligada a la membrana utilizando NADPH, o como resultado de la fuga de electrones en la mitocondria por la cadena transportadora de electrones. El anión superóxido puede ser transformado (dismutado) rápidamente de manera espontánea o catalizado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) para formar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y  $O_2$ ; su tiempo de vida es relativamente corto, por lo cual en su detección se utilizan metodologías donde actúa como un sustrato (Burnaugh, 2007).

Las células son permeables a la Hidroetidina (HE) la cual puede ser directamente oxidada a etidio ( $E^+$ ) por el anión superóxido producido por la célula (Carter W. y cols. 1994). El cual tiene la facilidad de intercalarse en el ADN y emitir una fluorescencia rojo anaranjada (mayor a 580 nm) al ser excitada a longitudes de onda de 510 – 550 nm (Chan y cols. 1998).

Todos los grupos, controles y experimentales 8 h post-inoculación con *E. histolytica* fueron anestesiados con dietil éter y se les administró 1 mL de una solución de hidroetidina (D-1168, Invitrogen; 1 mg/mL en DMSO al 1%), por vía vena yugular (Gottlieb M. y cols. 2006) y se dejó circular durante dos h. Posteriormente los animales fueron anestesiados con dietil éter y perfundidos con 100 mL de solución salina estéril (0.9%) con heparina (10 U/mL) y enseguida con 50 mL de una solución de paraformaldehído al 4% en PBS. A continuación se extrajo la parte proximal del ciego y se lavó con solución salina estéril. El ciego se extendió en una placa con parafina que contenía paraformaldehído al 4% en PBS durante 1 h a 4°C. Posteriormente el ciego se colocó en una solución de sacarosa al 15% en PBS durante 24 h a 4°C. Finalmente las muestras de tejido se congelaron con isopentano (2-metil butano, M-32631, Sigma-Aldrich) y se almacenaron a -80°C. Las muestras fueron recubiertas con Tissue-Tek y se procedió a realizar cortes de 10  $\mu\text{m}$  de grosor en el crióstato (Hirax C25) y recolectados sobre laminillas silanizadas ((3-3Aminopropyl)triethoxysilane, A-3648, Sigma) y los núcleos contrastados con Hoechst (33258, Invitrogen; 5  $\mu\text{g/mL}$ ). Se cuantificaron las células etidio<sup>+</sup> (marcadas con fluorescencia rojo-anaranjada) en todo el corte de tejido en un microscopio Axioscop 40 de Zeiss, y se procedió a calcular el área total del tejido y se expresó como células etidio<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>.

### **7.7. Detección de la enzima endógena Superóxido Dismutasa**

La superóxido dismutasa (SOD) es una de las enzimas más importantes del sistema de defensa de antioxidante que detoxifica al anión superóxido. Esta enzima cataliza la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (Dobashi, Y. y cols. 2012).

El kit utilizado (Kit SOD 19160 de Sigma) emplea una sal de tetrazolium altamente soluble en agua (WST-1:2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfurofenil)-2H-

tetrazolium, sal monosódica) que produce un colorante de formazan soluble en agua después de haber reducido al anión superóxido (Fig. 7). La tasa de reducción con  $O_2$  está relacionado linealmente con la actividad de la xantina oxidasa (XO), y es inhibida por la SOD. La absorbancia a 440 nm es proporcional a la cantidad de anión superóxido, la actividad de la SOD como una inhibición de la actividad puede cuantificarse mediante la medición en la disminución en el desarrollo del color.

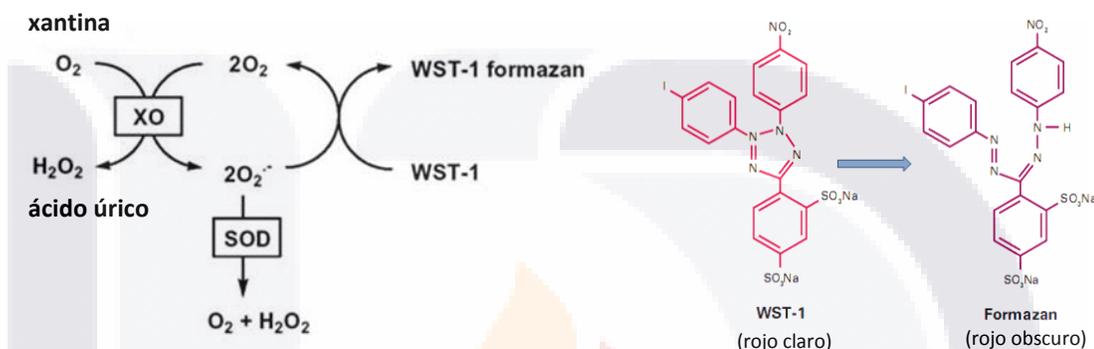


Fig. 7. Principio de la cuantificación de la actividad de la SOD (kit SOD 19160 de Sigma).

Se pesó 0.1 g de tejido y se adicionó 200  $\mu$ L de buffer de lisis para su homogenización (Tris/HCl 0.1 M. a pH 7.4, TRITON X-100 0.5%, PMSF 0.1 mg/mL y  $\beta$ -ME 5 mM) y la muestra se centrifugó a 14,000 x g durante 5 min a 4°C. La actividad total de la SOD fue determinada en el sobrenadante, que contiene tanto la fracción citosólica como la mitocondrial (Moukdar F., 2008). La absorbancia de las muestras fue determinada a 450 nm en un lector de microplacas iMark de Biorad, (ver apéndice C).

## 7.8. Determinación de la enzima endógena Catalasa

La catalasa (CAT) es una enzima antioxidante cuya función es la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua ( $H_2O$ ) y oxígeno molecular ( $O_2$ ) (Fig. 8). La catalasa está localizada en la matrix de los peroxisomas de las células de mamíferos incluyendo hepatocitos de ratas, bovinos, células de riñón y neuronas de rata y en neutrófilos humanos (Zhou Z. y Kang J., 2000).

El método utilizado (CAT100 de Sigma), se basa en la determinación del remanente de  $H_2O_2$ , (que se añadió como sustrato) después de la acción de la catalasa. Primero la

catalasa convierte el peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno, y a continuación, ésta reacción se detiene con azida de sodio. Después se tomó una alícuota de la mezcla de reacción para determinar la cantidad de peróxido de hidrógeno remanente por un método colorimétrico. Este método utiliza fenol sustituido (ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico) que mediante una oxidación en presencia de peróxido de hidrógeno y peroxidasa de rábano (HRP) se une a una 4-aminoantipirina, para formar un colorante de quinoneimina (N-(4-antipiryl)-3-cloro-5-sulfonato-p-benzoquinone-monoimina) que absorbe a 520 nm. La actividad de la catalasa se mide como una no saturación de la concentración de sustrato. A cantidades por encima de 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se produce una inactivación rápida de la catalasa por el sustrato.



**Fig. 8.** Reacción de la Catalasa.

Se tomó 0.1 g de tejido y se adicionaron 200 µL de buffer de lisis para su homogenización (100 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM a pH 7.0 y 100 µL de TRITON X-100). El homogenizado se centrifugó a 10,000 x g durante 15 min a 4°C, se recolectó el sobrenadante y se cuantificó la cantidad de proteína total por el método del Bradford. La muestra se ajustó a una concentración de proteína total de 2 mg/mL y se procedió a cuantificar la actividad de la catalasa usando el Kit de ensayo CAT100 de Sigma (Moukdar F. y cols. 2008). La absorbancia de las muestras fue determinada a 490 nm en un lector de microplacas iMark de Biorad (ver apéndice D).

## 7.9. Inmunohistoquímica

El tejido fijado en paraformaldehído que no se fuera a procesar dentro de los 3 días siguientes a su extracción, fue colocado en una solución de azida de sodio al 0.01% en PBS para su conservación a largo plazo. Antes de iniciar su proceso en el Histoquinet Thermo Scientific (MICROM STP 120) el tejido se lavó por dos horas en agua corriente. Posteriormente se procedió a realizar cortes de 5 µm de grosor en el microtomo LEICA RM 2125 R y los cortes fueron recolectados sobre laminillas silanizadas, se colocaron a 58°C en una estufa durante 6 h para eliminar el exceso de parafina, después se procedió a su desparafinización y rehidratación. Se realizó el desenmascaramiento de epítopes mediante

la técnica en olla express en un buffer de citratos, los cortes se colocaron en un buffer de fosfatos salino (PBS) y enseguida se inactivaron las peroxidases endógenas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% en metanol durante 1 h, se lavó con PBS y se hizo el bloqueo de uniones inespecíficas con leche Svelty al 1% en PBS-Tritón al 0.1%. A continuación se incubó con el anticuerpo anti-*Eh* (*E. histolytica*) de la cepa HM1:IMSS hecho en conejo en nuestro laboratorio a una dilución 1:200 y se dejó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente los cortes fueron lavados con PBS-Tritón al 0.1% y se utilizó el complejo Biotina-Avidina-Peroxidasa (DAKO) para la identificación de trofozoítos, se reveló con Diaminobencidina (DAB, D-8001, Sigma), los núcleos fueron contrastados con Hematoxilina de Harris (HYCEL), posteriormente se deshidrataron y se montaron con Entellán. A continuación se realizó la cuantificación de amibas en todo el corte de tejido en un microscopio Axioscop 40 de Carl Zeiss a 40x y se calculó el área total del tejido y se expresó como amibas/mm<sup>2</sup>.

#### **7.10. Histoquímica.**

Se tomaron laminillas de 5 µm de grosor de todas las muestras y se les realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina (HE) descrita por Prophet E. (1994). En los cortes teñidos se buscaron las zonas con lesión amibiana en un microscopio Axioscop 40 de Zeiss, y se tomaron fotografías a 10x, 20x y 40x.

#### **7.11. Tratamiento con apocinina**

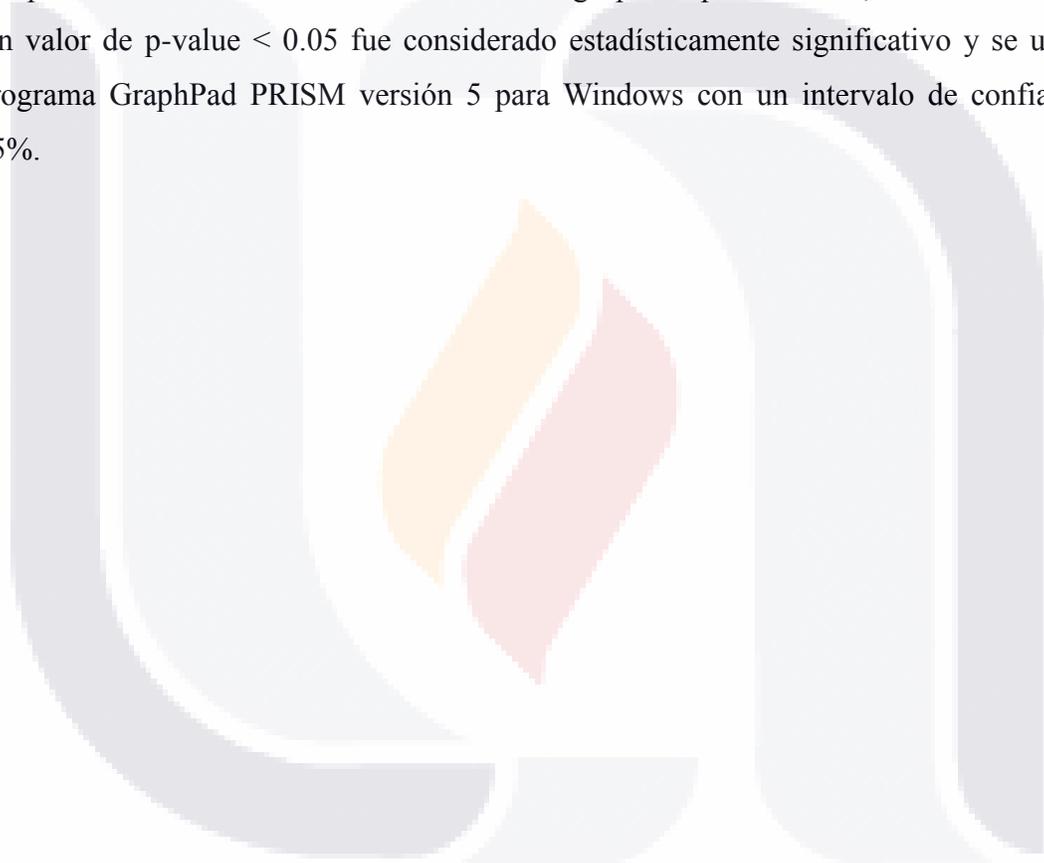
Se utilizaron 35 hámsters machos y se dividieron en 7 grupos experimentales: Intacto, Control, Control + AI, SHAM, SHAM + AI, Vx y VX + AI. Los grupos vagotomizados se procesaron de acuerdo al protocolo descrito anteriormente (1), y posteriormente se infectaron con amibas de acuerdo al modelo de amibiasis intestinal (2). Inmediatamente después, se les administró vía intraperitoneal una solución de apocinina a una concentración de 5 mg/Kg de peso (Wang y cols. 2008) disuelta en NaCl al 0.9%, repitiendo la dosis de apocinina a las 5 h.

Transcurridas 10 h post-inoculación con *E. histolytica*, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (63 mg/kg de peso) y se realizó el procedimiento descrito anteriormente para extraer las muestras de tejido para realizar la determinación de SOD (4).

De igual manera otra fracción de tejido se procesó para realizar la técnica de inmunohistoquímica anti-Eh (7) y la tinción con H-E (8).

## **ANÁLISIS DE DATOS**

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar (SEM). El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía, se utilizó el análisis de Tukey para comparar por pares todas las medias. En total fueron 7 grupos experimentales, cada uno con (n=5). Un valor de p-value  $< 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo y se utilizó el programa GraphPad PRISM versión 5 para Windows con un intervalo de confianza del 95%.

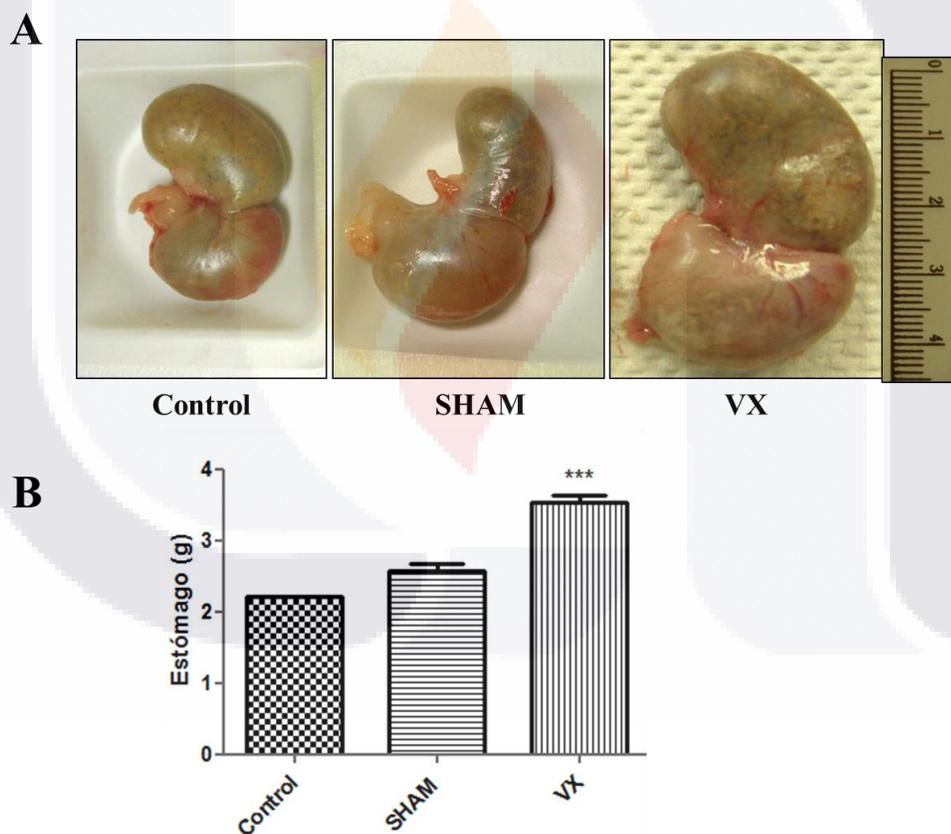


## 8. RESULTADOS

### 8.1. Aumento en el peso del estómago en animales vagotomizados

Los grupos experimentales Control (n=5), SHAM (n=6) y Vagotomizados (n=8) fueron sacrificados a los 30-33 días post-cirugía previo ayuno de 24 h, y se extrajo el estómago para confirmar la eficacia de la vagotomía.

Los resultados muestran que la vagotomía indujo un incremento en el tamaño del estómago con respecto al grupo SHAM y Control (Fig. 9A) así como un incremento significativo en el peso del estómago del grupo vagotomizado ( $3.5244 \pm 0.298$  g) comparado con los grupos SHAM ( $2.571 \pm 0.27$  g) y Control ( $2.2042 \pm 0.023$  g) (Fig. 9B).



**Fig.8:** Verificación de vagotomías. Los hámsteres con 24 h de ayuno a los 30-33 días post-cirugía. A) La imagen muestra la diferencia en tamaño de los estómagos entre los grupos Control, SHAM y VX, y B) La gráfica muestra la media  $\pm$  SEM de los pesos de los estómagos de los grupos, Control, SHAM y VX, \*\*\* *p*-value de 0.0001, con ANOVA de una sola vía.

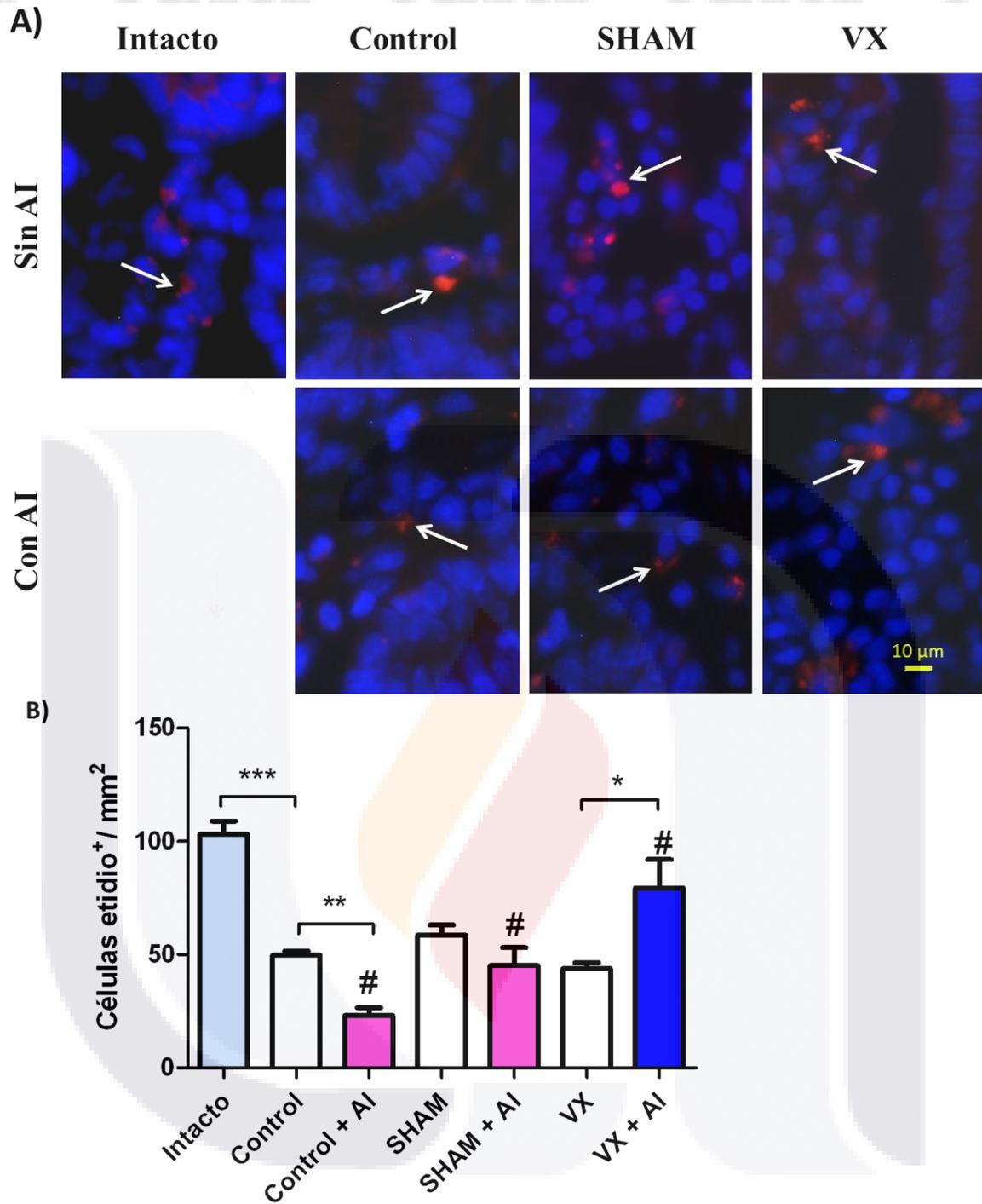
## 8.2. Efecto de la vagotomía en la producción del anión superóxido en amibiasis intestinal

Los tejidos obtenidos de la parte proximal del ciego marcados con hidroetidina se tiñeron con Hoechst (núcleo, azul) y se contaron todas las células anión superóxido positivas (fluorescencia roja; hidroetidina +). Posteriormente para expresar la cantidad de células etidio<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> se midió el área total de tejido.

Las muestras de tejido obtenido de la parte proximal del ciego de los grupos Intacto, Control, SHAM y VX sin y con amibiasis intestinal (AI), muestran células positivas al anión superóxido, abundantemente en la mucosa y en menor medida en la capa muscular del tejido. La presencia del anión superóxido se observó principalmente en el citosol (Fig. 9A). Morfológicamente no se observaron cambios significativos entre los grupos, Control, SHAM y VX.

En el grupo VX + AI se observó un incremento significativo en el número de células etidio<sup>+</sup> ( $79.48 \pm 12.52$  cel/mm<sup>2</sup>) con respecto al grupo VX ( $43.81 \pm 2.69$  cel/mm<sup>2</sup>), no obstante en los grupos Control + AI ( $23.23 \pm 3.36$  cel/mm<sup>2</sup>) y SHAM + AI ( $45.21 \pm 7.86$  cel/mm<sup>2</sup>) el número de células etidio<sup>+</sup> disminuyó significativamente con respecto a sus controles ( $56.79 \pm 2.69$  y  $58.54 \pm 4.54$  cel/mm<sup>2</sup> respectivamente). Sorpresivamente el grupo Intacto ( $103 \pm 5.87$  cel/mm<sup>2</sup>) obtuvo diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) con respecto a todos los grupos experimentales excepto con el grupo VX + AI.

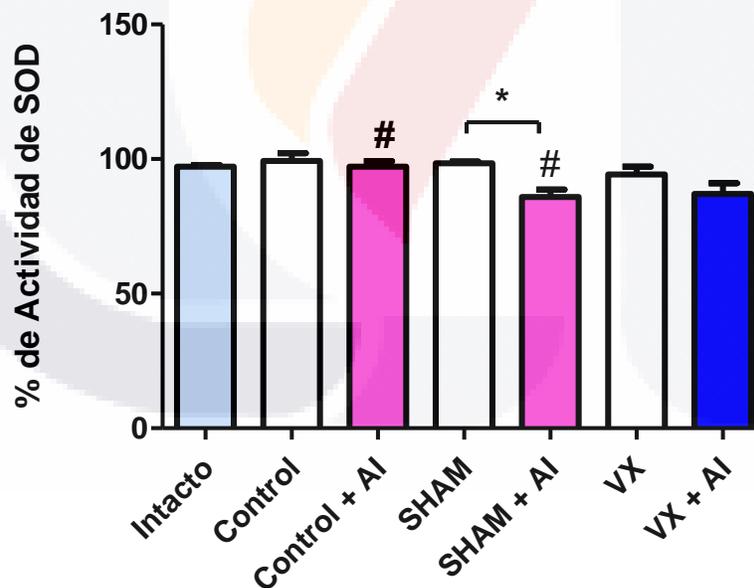
Comparando al grupo VX + AI, observamos que hay un aumento significativo ( $***p < 0.001$ ) en la producción del anión superóxido respecto al grupo Control + AI. Esto sugiere que en la amibiasis intestinal, la ausencia del nervio vago favorece el incremento de la producción del anión superóxido (Fig. 9 B).



**Fig. 9:** Aumento del anión superóxido en mucosa de la parte proximal del ciego en animales vagotomizados en un modelo de amebiasis intestinal 10 h. A) Las imágenes muestran la presencia del anión superóxido: fluorescencia roja-anaranjada marcados con hidroetidina, y los núcleos en azul teñidos con Hoechst, vistos en un microscopio Axioscop 40 de Zeiss. B) La gráfica muestra la media  $\pm$  SEM de células positivas del anión superóxido por  $\text{mm}^2$ , generado en los grupos experimentales en el modelo de amebiasis intestinal 10 h post-inoculación. Los datos se analizaron con ANOVA de una sola vía. El grupo Intacto muestra diferencias significativas ( $***p < 0.001$ ) con respecto a los grupos Control, SHAM y VX (vagotomizados) y con los grupos Control y SHAM con amebiasis intestinal (AI). Comparando los grupos con AI, entre el Control y SHAM no hubo diferencias, sin embargo entre el Control y VX si observamos diferencias ( $\# p < 0.01$ ) y entre SHAM y VX ( $\# p < 0.05$ ).

### 8.3. Actividad de superóxido dismutasa en animales vagotomizados inoculados con *E. histolytica*

El sobrenadante obtenido de los tejidos homogenizados (0.1 g.) se utilizó para determinar el % de actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) siguiendo el protocolo del Kit (SOD) de Sigma (19160), (ver apéndice C). Los grupos Control ( $99.34 \pm 2.82$  %), SHAM ( $98.46 \pm 0.56$  %), y VX ( $94.31 \pm 2.84$  %) sin amibas no mostraron cambios significativos respecto al grupo Intacto ( $97.14 \pm 0.68$  %). El grupo SHAM inoculado con amibas ( $85.89 \pm 2.81$  %) mostró una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo SHAM ( $98.46 \pm 0.56$  %) y al Control + AI ( $97.206 \pm 1.96$  %), el grupo VX + AI ( $87.07 \pm 3.95$  %) mostró una disminución no significativa respecto al grupo VX ( $94.31 \pm 2.84$  %) (Fig. 10). El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una sola vía. Nuestros resultados muestran de manera general que durante la amibiasis intestinal producida por *E. histolytica*, la actividad de la SOD no se modifica en los grupos Control y vagotomizados.



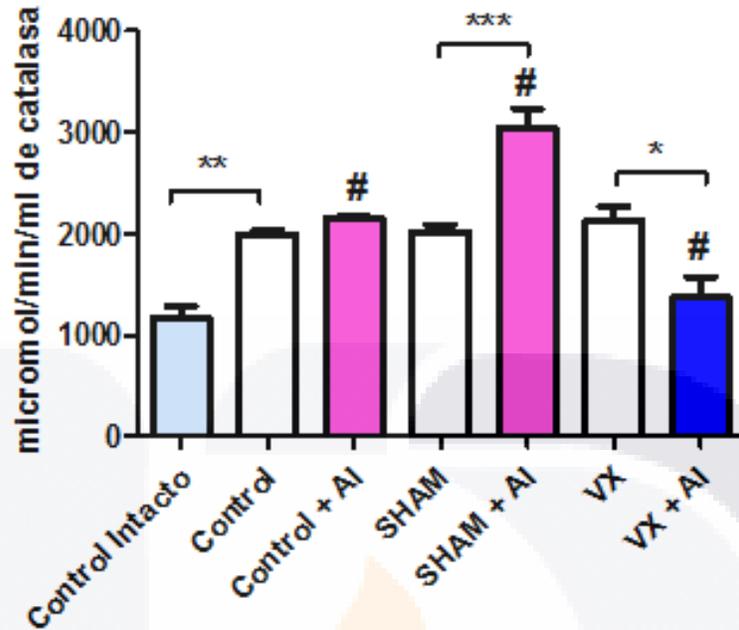
**Fig. 10:** Actividad de la enzima SOD durante la amibiasis en animales vagotomizados. La gráfica muestra la media  $\pm$  SEM del % de actividad de la enzima SOD cuantificada en 0.1 g de tejido de la parte proximal del ciego en los grupos experimentales en el modelo de amibiasis intestinal 10 h post-inoculación. Se utilizó el Kit de Sigma 19160. El grupo SHAM + AI mostró diferencia significativa respecto al grupo SHAM ( $*p < 0.05$ ) y respecto al grupo control + AI ( $\# p < 0.05$ ). Los resultados del % de actividad de la SOD se analizaron con ANOVA de una vía con una  $p < 0.05$ .

#### 8.4. Decremento de la actividad de catalasa en animales vagotomizados inoculados con *E. histolytica*

La actividad de la catalasa se determinó en el sobrenadante de tejido homogenizado (0.1 g) utilizando el kit SIGMA CAT-100. Previamente al homogenizado se le cuantificó la proteína total por el método del Bradford, (ver apéndice D) ajustándose la concentración de proteína total a 2 mg/mL. Para poder realizar la cuantificación de la actividad de la catalasa se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 11).

Una unidad de catalasa es aquella que puede descomponer 1.0 μmol de peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua por min a pH 7.0 a 25°C a una concentración de sustrato de 50 mM de peróxido de hidrógeno.

Los resultados indican que la actividad de la catalasa disminuyó de manera significativa en el grupo VX + AI (1369.77 ± 203.4 μmol/min/ml) con respecto al grupo VX (2131.52 ± 132 μmol/min/ml) con \**p* < 0.05; contrario a esto observamos un aumento significativo entre el grupo SHAM + AI (3043.663 ± 187) y SHAM (2022.25 ± 69.77) con \*\*\**p* < 0.001. También observamos una disminución significativa de la actividad de la catalasa en el grupo Intacto (1167.26 ± 115.3) comparado con el Control (1997.16 ± 35.97) con \*\**p* < 0.01; sin embargo, entre el grupo Control (1997.16 ± 35.97) y Control + AI (2157 ± 18.13 μmol/min/ml) no existe diferencia significativa. Además comparando los grupos inoculados con amibas, observamos diferencias significativas: entre el grupo Control y SHAM \*\**p* < 0.01; el Control vs. el VX \**p* < 0.05; y el SHAM vs. el VX \*\*\**p* < 0.001 (Fig. 11). Estos resultados indican que el nervio vago influye en la regulación de producción de la enzima catalasa durante la amibiasis intestinal.



**Fig. 11:** Actividad de la catalasa en animales vagotomizados. La gráfica muestra la media  $\pm$  SEM de la actividad de la enzima Catalasa en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$  (eje ordenadas), cuantificada en 0.1 g de tejido de la parte proximal del ciego en los grupos experimentales en el modelo de amibiasis intestinal 10 h post-inoculación.. Se observa una disminución significativa en la concentración de la catalasa en el grupo VX + AI respecto al VX (\* $p < 0.05$ ), comparado con el Control + AI (#  $p < 0.05$ ) y con el SHAM + AI (#  $p < 0.001$ ). Los resultados obtenidos fueron analizados con el estadístico ANOVA de una sola vía obteniendo un  $p \text{ value} < 0.0001$ , con una  $n=4$  por grupo.

### 8.5. La apocinina disminuye la respuesta inflamatoria en animales vagotomizados

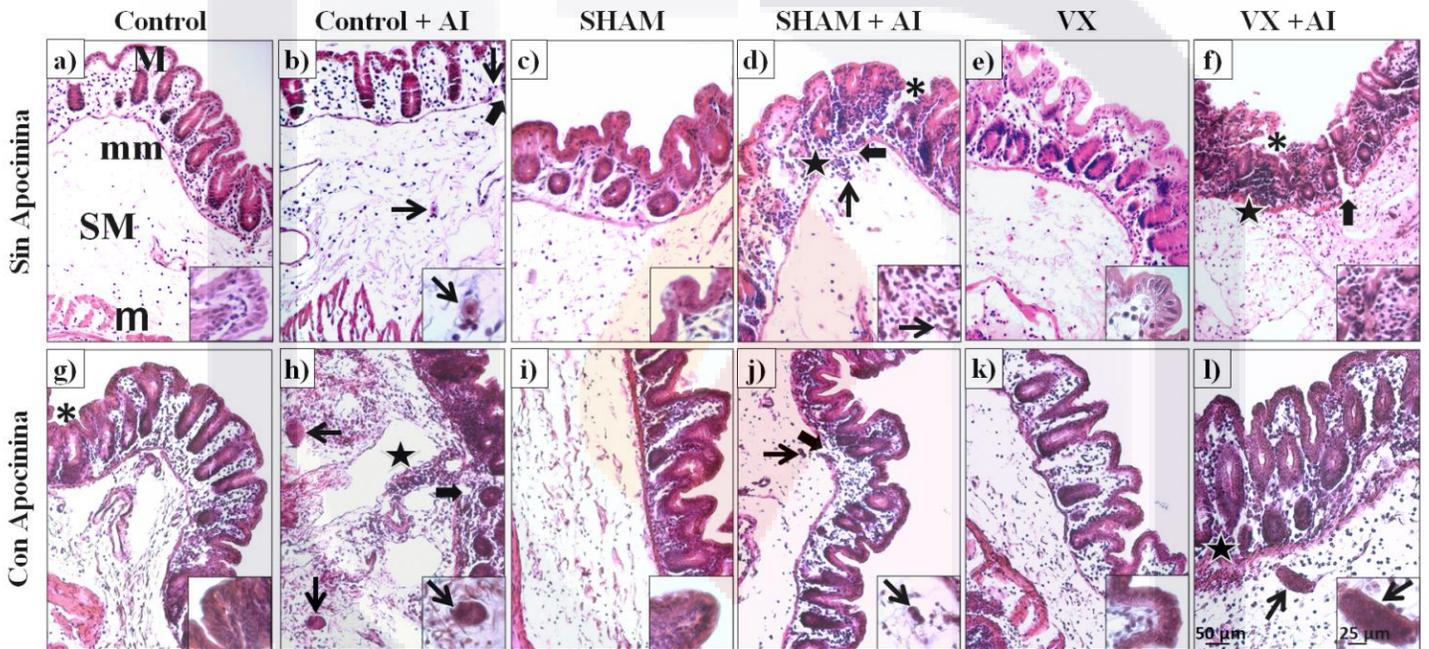
La apocinina es un fenol inhibidor de la enzima NADPH oxidasa, la cual cataliza la producción del anión superóxido a partir del oxígeno en neutrófilos y macrófagos durante la respuesta inmune innata.

En animales vagotomizados, la inoculación cecal de *E. histolytica* (flecha abierta), indujo mayor daño en la mucosa donde se aprecian erosiones clásicas inducidas por el parásito, fig. 12 d y f (asterisco), también se aprecia aumento del infiltrado inflamatorio en la submucosa fig. 12 d y f (flecha). En el grupo Control con amibiasis (fig.12-b) el daño producido por *E. histolytica* es menos severo con respecto a los vagotomizados.

En animales tratados con apocinina para inhibir la producción del anión superóxido, en general, observamos cualitativamente menor proceso inflamatorio en animales Control y

SHAM, esta disminución fue más evidente en VX no inoculados con *E. histolytica*, con y sin apocinina.

En animales VX con amiba y apocinina (fig. 12l) observamos cantidad similar de infiltrado inflamatorio que en animales control sin amibas con apocinina (fig. 12g). Este resultado muestra que la apocinina en animales vagotomizados inhibe con más eficacia el proceso inflamatorio, ya que en el animal control con amibas más apocinina detectamos cualitativamente más células inflamatorias y mayor daño tisular en mucosa y submucosa (fig. 12h).



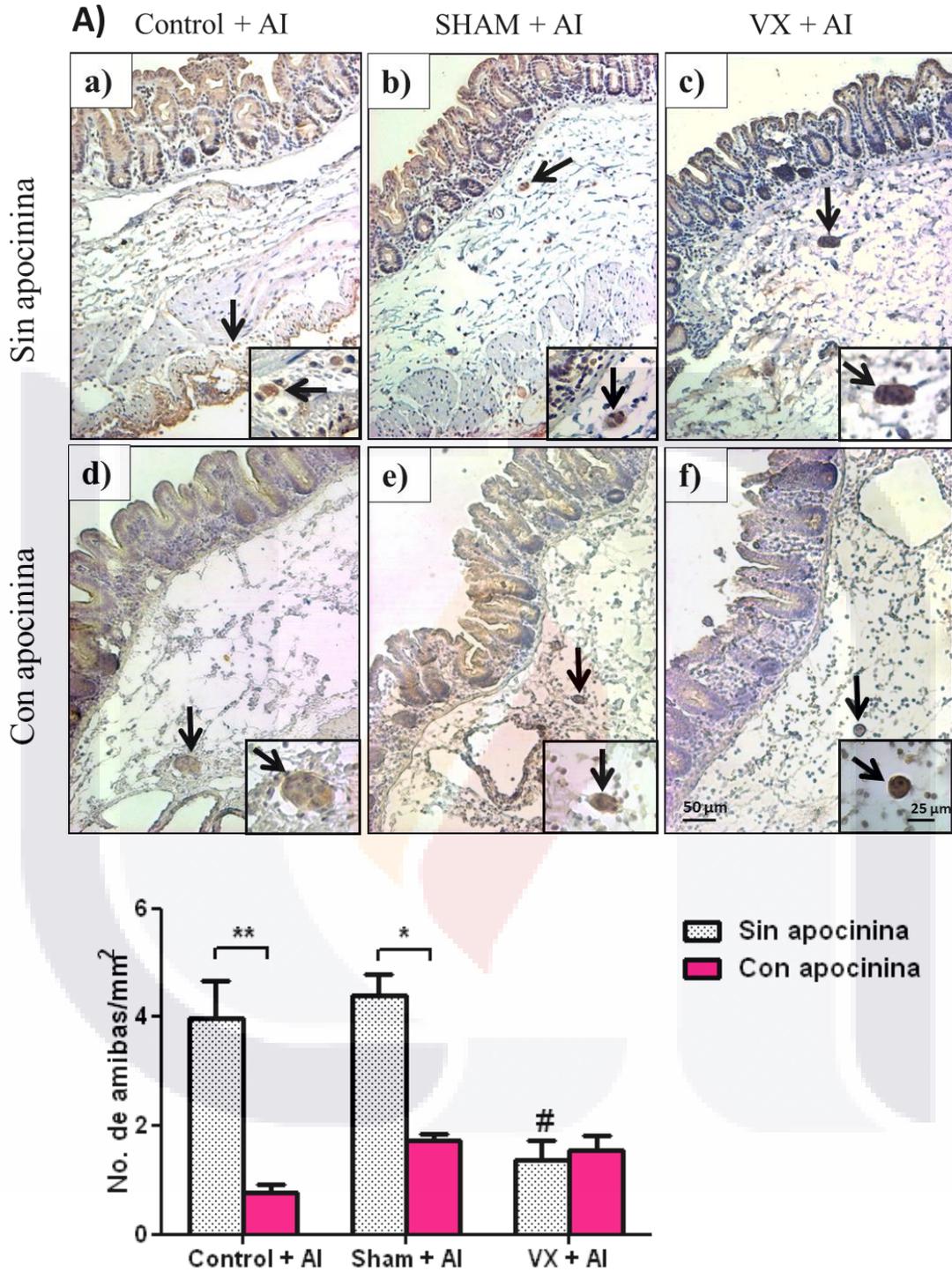
**Fig. 12:** Daño tisular en mucosa cecal en hámsteres vagotomizados por *E. histolytica*. e y f) animales vagotomizados inoculados con amiba muestran escaso infiltrado inflamatorio y poco daño tisular, comparado con animales control y sham que muestran mayor infiltrado y daño tisular en la mucosa (M) y submucosa (SM), muscular de la mucosa (mm)(a-d). Cuando se agrega la apocinina, los vagotomizados e inoculados con *E. histolytica*, muestran menor cantidad de infiltrado inflamatorio y escaso daño tisular (k, l), sin embargo, en los controles hay abundante infiltrado inflamatorio con áreas visibles de daño tisular (g y h), comparado incluso con los sham intactos y con *E. histolytica* (i,j).

## 8.6. La apocinina disminuye los trofozoítos en los grupos control y SHAM.

Mediante inmunohistoquímica anti-*Eh*, se detectaron específicamente a trofozoítos de *E. histolytica*: su ubicación frecuente fue en la submucosa cecal.

Identificamos a los parásitos por su forma amiboide entremezclados con las células de la submucosa (fig. 15-Aa-f). En los recuadros inferiores se destaca la identificación plena de los trofozoítos en color café oscuro. Se muestran cortes histológicos de tejido de los grupos Control, SHAM y VX inoculados con amibas. Cabe destacar que después de la cuantificación de amibas por área, comparando los grupos que no fueron tratados con apocinina observamos una disminución significativa en el promedio de amibas/mm<sup>2</sup> en los tejidos del grupo VX (\* $p < 0.05$ ,  $1.9 \pm 0.61$ ) con respecto al control y SHAM ( $3.97 \pm .0.7$  y  $4.41 \pm 0.39$  respectivamente) fig. 13a, 13b y 13c.

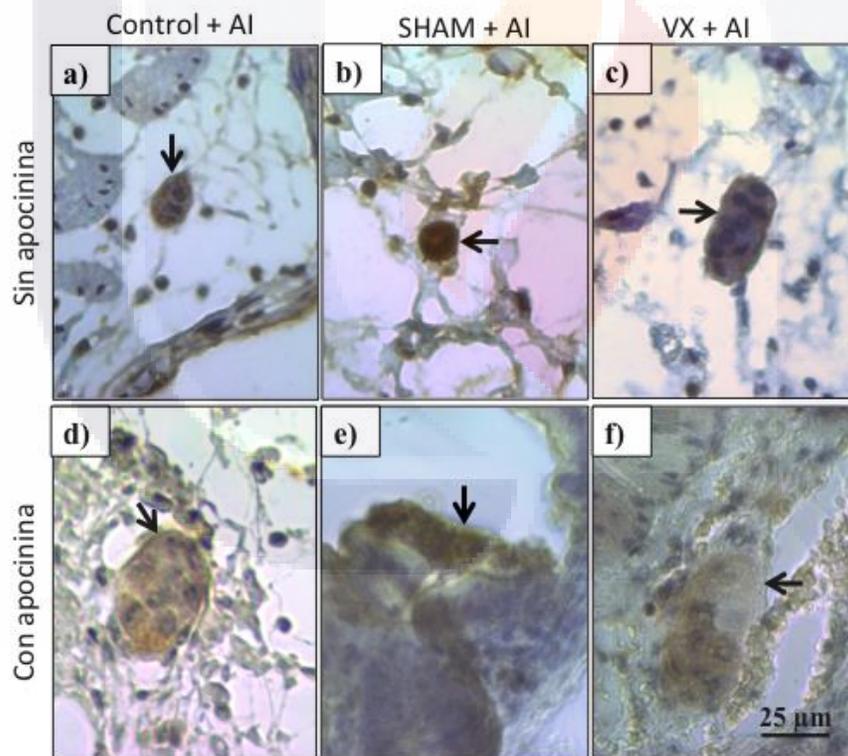
Al determinar el número de trofozoítos en animales tratados con apocinina, observamos una disminución significativa en el promedio de amibas/mm<sup>2</sup> (\*\*  $p < 0.001$ ) entre el grupo Control + AI con apocinina ( $0.76 \pm 0.16$ ) comparado con el Control + AI sin apocinina ( $3.97 \pm 0.7$ ). De manera similar el grupo SHAM con amibas y apocinina también disminuyó de manera significativa (\*\*  $p < 0.001$ ) el promedio de amibas/mm<sup>2</sup> ( $1.73 \pm 0.13$ ) comparado con el grupo SHAM con amibas y sin apocinina ( $4.41 \pm 0.39$ ) fig. 13b y 13e, flechas; mientras que no se observan diferencias significativas en la cantidad de amibas entre los animales VX tratados y no tratados con apocinina (fig. 13-B).



**Fig. 13:Disminución de trofozoítos de *E. histolytica* en hámsteres vagotomizados.** A) Trofozoítos de *E. histolytica* (flecha) en submucosa de ciego a las 10 h post-inoculación; las imágenes a, b y c corresponden a hámsteres sin tratamiento, y las d, e y f a animales tratados con apocinina (immunoperoxidasa 10 y 40x) y B) Representación gráfica de los promedios  $\pm$  SEM del número de amibas en los tejidos del ciego de hámsteres, donde se observa una disminución significativa en el número de trofozoítos que recibieron el tratamiento en los grupos Control (\*\* $p < 0.01$ ) y SHAM (\* $p < 0.05$ ). Comparando los grupos sin tratamiento se observa una disminución significativa en el grupo VX (#  $p < 0.05$ ). ANOVA de una sola vía con  $p < 0.05$ .

### 8.7. La apocinina estimula la fagocitosis de células de la respuesta inmune por *E. histolytica*

La morfología de los trofozoítos se modifica en los grupos de animales tratados con apocinina (Control, SHAM y VX). Por la naturaleza fagocítica de la amiba, se observaron pocas células inflamatorias en el interior de los trofozoítos en los tejidos que invade (fig. a y b); sin embargo, los trofozoítos inoculados en animales tratados con apocinina mostraron un mayor tamaño y en su interior se observaron mayor cantidad de núcleos de células inflamatorias (fig. d, e y f), aunque en el grupo VX sin tratamiento se observó una amiba fagocitando células de la respuesta inmune, por lo tanto, la apocinina induce que la amiba incremente la fagocitosis de éstas células inflamatorias, debido a que se encuentran inactivas y/o indefensas por efecto tanto de la apocinina como de la vagotomía. Las amibas se localizaron en la submucosa.

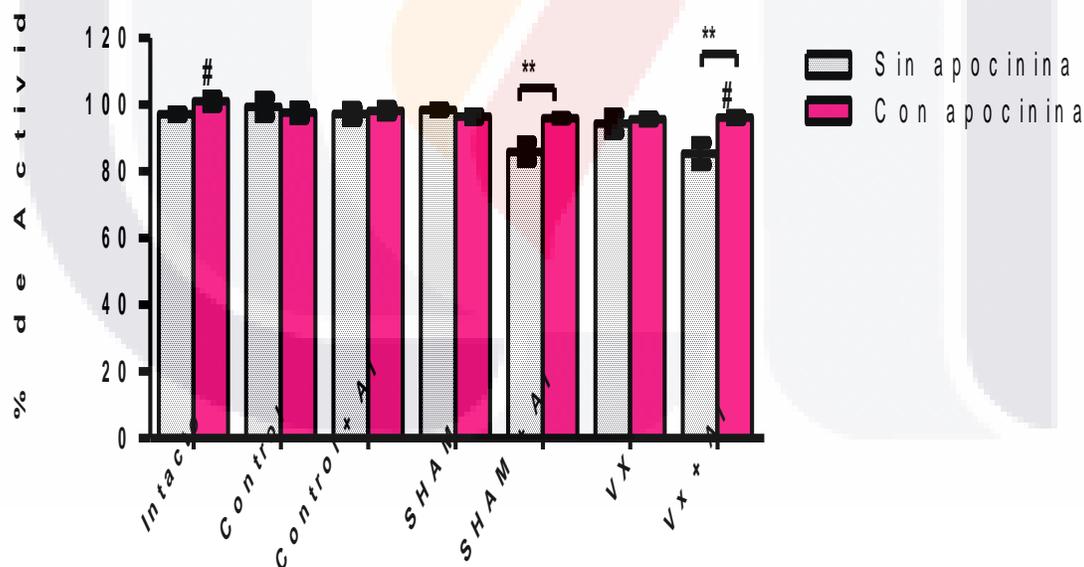


**Fig. 14:** Aumento en el tamaño de trofozoítos de *E. histolytica* en hámsteres tratados con apocinina. a, b y c) Trofozoítos de *E. histolytica* fagocitando células de la respuesta inmune innata (flecha) en submucosa y epitelio de ciego a las 10 h post-inoculación sin tratamiento con apocinina d, e y f) trofozoítos de *E. histolytica* en submucosa de ciego de animales tratados con apocinina (immunoperoxidasa con el anticuerpo policlonal Anti-*E. histolytica* 40x).

### 8.8. La apocinina incrementa la actividad de la enzima superóxido dismutasa en animales vagotomizados inoculados con trofozoítos de *E. histolytica*

Se determinó el % de actividad de SOD en todos los grupos experimentales que fueron tratados con apocinina y se comparó con sus homólogos que no recibieron éste antioxidante (fig. 15). Se observó que en los grupos Intacto, Control, Control + AI, SHAM y VX con y sin tratamiento no existen diferencias significativas en el porcentaje de actividad de SOD.

Sin embargo, con el tratamiento de apocinina se observó un incremento significativo (\*\* $p < 0.01$ ) en la expresión del porcentaje de actividad de SOD en los grupos SHAM con amibiasis ( $95.97 \pm 0.186$ ) y VX con amibiasis ( $96.15 \pm 0.58$ ) comparados con los grupos SHAM y VX con trofozoítos que no recibieron tratamiento con apocinina ( $85.89 \pm 2.81$ ;  $87.07 \pm 3.95$ , respectivamente). Por otra parte comparando sólo los grupos tratados con apocinina, sólo hubo diferencia significativa ( $\#p < 0.05$ ) entre el grupo Intacto ( $101.1 \pm 1.48$ ) y el VX con amibas ( $96.15 \pm 0.58$ ).



**Fig. 15** La apocinina estimula el incremento de la actividad de SOD en animales vagotomizados inoculados con trofozoítos de *E. histolytica*. La gráfica muestra el % de actividad de la enzima SOD durante la amibiasis intestinal (10 h post-inoculación). La gráfica nos muestra la media  $\pm$  SEM del % de actividad de la SOD/0.1 g de tejido de la parte proximal del ciego. Se observa que con la administración de apocinina, el % de actividad de SOD incrementa en los animales VX + AI (\*\* $p < 0.01$ ). Entre los grupos con apocinina sólo hubo diferencia significativa ( $\# p < 0.05$ ) entre los grupos VX con amibas y el Intacto. Los datos se analizaron con un análisis no paramétrico de Bonferroni.

GRUPO	Intacto	Control	Control + AI	SHAM	SHAM + AI	VX	VX + AI
Células + etidio /mm <sup>2</sup>	103 ± 5.87	56.79 ± 2.69	23.23 ± 3.36 <sup>###</sup>	58.54 ± 4.54	45.21 ± 3.36	43.81 ± 2.69	79.48 ± 12.52 <sup>#</sup>
% Actividad SOD	97.14 ± 0.68	99.34 ± 2.82	97.206 ± 1.97	98.46 ± 0.56	85.89 ± 2.81 <sup>#</sup>	94.31 ± 2.84	87.07 ± 3.95
% Actividad SOD con apocinina	101.1 ± 1.48	97.64 ± 1.64	98.19 ± 1.21	96.46 ± 0.78	95.97 ± 0.186 <sup>&amp;&amp;</sup>	95.69 ± 0.57	96.15 ± 0.58 <sup>&amp;&amp;</sup>
Actividad CAT μmol/min/mL	1167.26 ± 115.3	1997.16 ± 35.97	2156.6 ± 31.4	2022.3 ± 69.77	3043.663 ± 187 <sup>###</sup>	2131.52 ± 132 ΔΔΔ <sup>\$</sup>	1369.77 ± 203.4 <sup>#</sup> *** <sup>%</sup>
Amibas/mm <sup>2</sup>			3.97 ± .70		4.41 ± 0.39		1.9 ± 0.61 <sup>* %</sup>
Amibas/mm <sup>2</sup> con apocinina			1.21 ± 1.07 <sup>&amp;&amp;</sup>		1.73 ± .25 <sup>&amp;</sup>		1.55 ± .53
Infiltrado inflamatorio		-	+	-	+++	-	+++++
Infiltrado inflamatorio con apocinina		-	++	-	+	-	-
Lesión tisular		-	+	-	++++	-	+++++
Lesión tisular con apocinina		-	+++	-	-	-	-

**Tabla 1.** Resumen de los ensayos experimentales. Se incluyeron los grupos experimentales: animales sanos sin manipular (Intacto); animales con lavado de asa cecal (Control); animales con lavado de asa cecal con inoculación de amibas (Control + AI); animales con una falsa vagotomía y lavado de asa cecal sin inoculación de amibas (SHAM); animales con vagotomía falsa, el lavado de asa cecal y la inoculación de amibas (SHAM + AI); animales con vagotomía gástrica y el lavado de asa cecal (VX); finalmente se incluyó un grupo al que se le hizo la vagotomía gástrica y lavado de asa cecal y que además se les inoculó amibas (VX + AI). Las diferencias significativas se muestran con símbolos como subíndices: #, muestra las diferencias de los grupos con amibiasis comparados con su propio control; &, nos indica las diferencias significativas entre grupos homólogos con y sin apocinina; \*, indica las diferencias entre el grupo VX + AI respecto al SHAM + AI; %, indica las diferencias entre el grupo VX + AI comparado con el Control + AI; Δ, muestra las diferencias entre el grupo vagotomizado y el SHAM; \$, muestra las diferencias entre VX vs. Control. Un símbolo indica una p < 0.05, dos símbolos indican una p < 0.01 y tres símbolos indican una p < 0.001. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una sola vía con una p < 0.05

## 9. DISCUSIÓN

El nervio vago es esencial para una función gastrointestinal normal como la homeostasis, saciedad, náuseas, detección de dolor visceral y funciones de esfínteres. Por lo tanto es concebible que los trastornos en la motilidad gastroesofágica, tales como reflujo gastroesofágico, vaciado gástrico retardado y la intolerancia alimentaria, puede tener sus raíces de anomalías en la mala función de la inervación vagal entérica (Ratcliffe M. y cols. 2011).

El incremento en el tamaño y peso de los estómagos en los hámsteres vagotomizados se debe a que la vagotomía disminuye la motilidad y actividad peristáltica, que da como resultado una dilatación gástrica (Ratcliffe E.M. y cols. 2011) y el vaciado intestinal es más lento provocando una acumulación del bolo alimenticio en el estómago.

Estudios previos (Espinoza-Cantellano y Martínez Palomo, 2000) refieren que durante la invasión de la amiba al intestino en conejillo de india, ocurre una gran infiltración de neutrófilos al lugar de invasión, los cuáles son activados por la citocina pro-inflamatoria IL-8, liberando enzimas y ROS que incrementan el daño al tejido. En un estudio, se ha demostrado que el anión superóxido es un marcador del estrés oxidante generado en varias enfermedades que provocan la inflamación de la mucosa intestinal (Bouzzid D. y cols. 2013), asimismo, otros estudios en infecciones parasitarias como la enfermedad de Chagas la apocinina indujo disminución en la miocarditis que se caracteriza por la presencia de infiltrado inflamatorio, hipertofia y fibrosis en ratones, específicamente, disminución de macrófagos (CD68<sup>+</sup>), neutrófilos (Ly-6G<sup>+</sup>) y células T CD8<sup>+</sup> en tejido cardiaco (Dhiman M. y Garg N., 2011). Otra sustancia antioxidante como la mangiferina, indujo disminución de radicales libres en parasitosis en ratones con *Trichinella spiralis* y en consecuencia disminuyeron las larvas en músculo (García D. y cols. 2003). En 2006, Perrucci y cols. también evaluaron el efecto de la mangiferina sobre el parásito *Cryptosporidium parvum* en un modelo de ratones neonatos y encontraron que esta sustancia reduce significativamente la colonización intestinal por oocistos de *C. parvum*. Sin embargo, en nuestro modelo de amibiasis intestinal 10 h post-inoculación, se observó una disminución del anión superóxido en los grupos control y SHAM con amibas, probablemente debido al poderoso mecanismo de defensa antioxidante que tiene la amiba. Akbar M. y cols. (2004)

demostraron que *E. histolytica* aumenta la expresión genética de mRNA para la producción de enzimas antioxidantes como la peroxirredoxina y SOD cuando se encuentra en un ambiente con altas concentraciones de oxígeno. Se sabe que *E. histolytica* es un parásito microaerofílico que no soporta concentraciones de oxígeno mayores al 5%, sin embargo, durante la invasión tisular se enfrenta a NOS y a concentraciones de oxígeno que oscilan entre el 4 y el 14% (Olivos-García y cols. 2012).

Se sabe que la regulación de la respuesta inmune innata es fundamental para controlar la inflamación. Se ha reportado que el nervio vago desempeña un papel anti-inflamatorio (Pavlov V. A., y Tracey K.J., 2005) a través de la vía colinérgica (Rosas-Ballina M. y Tracey K.J., 2009), un mecanismo que involucra a la acetilcolina liberada de la parte distal y final del nervio vago, que interactúa con receptores  $\alpha$ -7 nicotínicos ( $\alpha$ 7nAChR) de los macrófagos humanos para inhibir la liberación de citocinas pro-inflamatorias como TNF (Rosas-Ballina M. y Tracey K. 2009), en nuestros experimentos observamos que la vagotomía permite un estado pro-inflamatorio, manifestado por el aumento del anión superóxido contomitadamente con la disminución de la cantidad de SOD, probablemente debido a que no existe el control anti-inflamatorio que proporciona el nervio vago, lo que impide que se activen mecanismos antioxidantes para inactivar al anión superóxido producido.

Se ha observado que la estimulación del nervio vago aumenta la expresión de SOD1 y SOD2 en miocardio de rata lesionada, disminuyendo significativamente la producción del anión superóxido, aliviando el daño al miocardio y atenuando la disfunción cardiaca (Shan-Shan, K. y cols. 2012). La inervación vagal del tracto gastrointestinal desempeña un papel importante en el control o en la activación inmune intestinal. Se ha reportado que la estimulación eléctrica del nervio vago reduce significativamente la inflamación intestinal, restaurando la homeostasis, mientras que la vagotomía tiene el efecto contrario (Matteoli, G. y Boecxstaens, G.E., 2013). El nervio vago así, ejerce funciones inmunomoduladoras al inhibir la sobreproducción de citocinas proinflamatorias; Mitsui T. y cols. (2013) encontraron una disminución temporal de citocinas pro- y anti-inflamatorias en intestino delgado de ratones vagotomizados a los 14 días post-operación y un aumento significativo de IL-10, IL 12p70, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y MCP-1 a los 20 días post-operación.

Se sabe que las enzimas antioxidantes desempeñan un papel muy importante en la prevención del estrés oxidante actuando sobre las ROS generadas en la mucosa intestinal de ratones libres de gérmenes (Dobashi Y. y cols. 2012). En 2004 Rawal S. y cols. observaron que un aumento en el nivel de ROS en las células Henle-407 estimuladas con la lectina Gal/GalNAc (factor de virulencia de *E. histolytica*) condujo a la reducción de la actividad de enzimas antioxidantes.

En nuestros resultados observamos una disminución de las ROS y un aumento en la actividad de SOD y CAT en los grupos Control inoculados con *E. histolytica* respecto al Control sin amibas. Este resultado indica la eficacia de la amiba para contrarrestar el estrés oxidante generado por las células del sistema inmune innato del hospedero, lo cuál ha sido descrito anteriormente. Bruchhaus y cols. (1998) utilizaron lisados de *E. histolytica* para aislar una proteína amibiana de 29 kDa (Eh29) y encontraron que tenía una actividad tiol peroxidasa, evaluada mediante la adición directa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observando que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> remanente disminuyó significativamente.

También encontramos disminución no significativa en la actividad de la enzima SOD, pero si fue significativa en CAT en los animales vagotomizados con amibiasis comparados con el grupo vagotomizado sin amibiasis, lo cual podría deberse a que no existe la conexión neuroinmune del nervio vago, por lo tanto, se genera un estado proinflamatorio que aumenta la concentración de ROS en el tejido dañado, también en los hámsteres vagotomizados observamos disminución significativa en el número de trofozoítos localizados en el tejido respecto a los grupos Control y SHAM, lo cual pudo haber sido porque las células de la respuesta inmune innata expresaron una actividad proinflamatoria mayor (mayor cantidad de anión superóxido), haciendo de esta manera mas amebicidas a las células de la respuesta inflamatoria en animales vagotomizados.

En los animales VX con amibiasis sin apocinina, se observó disminución significativa de trofozoítos comparado con animales control y SHAM, sin embargo, cuando se agregó la apocinina, observamos descenso significativo de amibas en los grupos control y SHAM pero no en los VX, lo que sugiere que la apocinina no tiene efecto en las funciones de las amibas y esto lo observamos en un ensayo de toxicidad in vitro (no se muestran resultados). En relación al daño tisular, en animales vagotomizados quizá la ausencia del nervio vago permitió mayor actividad de la SOD que indirectamente

disminuyó a las ROS; la apocinina también inhibió a la NADPH oxidasa que coopero a la disminución de la generación de ROS lo cual evitó el daño tisular. Estos resultados son similares a los realizados por Olivos-García y cols. (2004) en hámsteres leucopénicos en ausencia de células inflamatorias y daño tisular, las amibas desaparecieron a las 24 horas sin causar daño al hígado. Contrario a esto, en el Control con amibas tratado con apocinina, se observó mayor infiltrado inflamatorio y daño al tejido, originado muy probablemente por un desequilibrio entre la producción de ROS y la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD.

Nuestros resultados de animales VX + apocinina y amiba, mostraron a trofozoítos de mayor volumen y mayor cantidad de leucocitos fagocitados. Esto puede explicarse con el hecho de que la apocinina indujo aumento de la SOD, así como inhibición de la NADPH oxidasa, combinando estos efectos, los neutrófilos fueron incapaces de producir especies reactivas de oxígeno y por lo tanto, indefensos ante los trofozoítos, este fenómeno es contrario a un escenario donde los neutrófilos y macrófagos son activados con INF gamma e IL-8 dándoles un efecto amebicida (Lin JY, Chadee K, 1992; Espinoza-Cantellano y Martínez Palomo, 2000).

## **10. CONCLUSIÓN**

En conjunto, estos resultados demuestran en el modelo de amibiasis intestinal en hámsteres vagotomizados, que la vagotomía induce estrés oxidativo y eliminación de *Entamoeba histolytica*, mientras que la apocina incrementa, la actividad enzimática de la superóxido dismutasa y la fagocitosis de *Entamoeba histolytica* sugiriendo que el uso de antioxidantes en estas condiciones no es recomendable, pero si en animales controles con amibiasis intestinal.

## REFERENCIAS

Akbar, M., Chatterjee, S. N., Sen, P., Debnath, A., Pal A. Bera, T. & Das, P. (2004). Genes induced by a high-oxygen environment in *Entamoeba histolytica*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 133, 187-196.

Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V, & González-Robles A. (1985). Intestinal invasive amebiasis: an experimental model in rodents using axenic or monoxenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg*. 34(4):723-30

Arias, D.G., Regner, E.L., Iglesias, A.A. & Guerrero, S.A. (2012). *Entamoeba histolytica* thioredoxin reductase: molecular and functional characterization of its atypical properties. *Biochim Biophys Acta*. Dec;1820(12):1859-66. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.08.020.

Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I. & Watkins, L.R. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin, *Nature*, 405 (6785), 458-462.

Bouzig, D, Gargouri, B., Ben Mansour, R., Amouri, A., Tahri, N., & Lassoued S. (2013). Oxidative Stress Markers in Intestinal Mucosa of Tunisian Inflammatory Bowel Disease Patients. *Saudi Journal of Gastroenterology* 19(3):131-5. DOI: 10.4103/1319-3767.111956

Bruchhaus, I., Richter, S. & Tannich, E. (1997). Characterization of two *E. histolytica* proteins that inactivate reactive oxygen species. *Arch. Med. Res*, 28, 91-92.

Bruchhaus, I., Richter, S. & Tannich, E. (1998). Recombinant expression and biochemical characterization of an NADPH:Flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J*, 330, 1217-1221.

Burnaugh, L., Sabeur, K, & Ball, B.A. (2007). Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology*. 67(3):580-9

Campos-Rodríguez, R., Jarillo-Luna, R.A., Larsen, B.A., Rivera-Aguilar, V. & Ventura-Juárez, J. (2009). Invasive amebiasis: A microcirculatory disorder?. *Medical Hypotheses*, 73, 687-697.

Carter, W., Narayanan, P. & Robinson, Paul. (1994). Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 55, 253-258.

Chan P., Kawase, M., Murakami, K., Chen, S., Li Y., Calagui, B., Reola, L., Carlson, & E., Epstein Ch. (1998). Overexpression of SOD1 in transgenic rats protects Vulnerable neurons against ischemic damage after global cerebral ischemia and reperfusion. *The Journal of Neuroscience*, 18(20), 8292-8299.

Dhiman, M. & Garg, N.J. (2011). NADPH oxidase inhibition ameliorates *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis during Chagas disease. *J Pathol*, 225(4), 583-596.

Dobashi, Y., Yoshimura, H., Atarashi, E., Takahashi, K., Tohei, A. & Amao, H. (2012). Upregulation of Superoxide Dismutase Activity in the Intestinal Tract Mucosa of Germ-Free Mice. *Journal Veterinary Medic Science*, 49-54.

Diamond, L.S., Harlow, D.R. & Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 72(4):431-2.

Eckmann, L., Reed, S. L., Smith, J. R. & Kagnoff, M. F. (1995). *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 $\alpha$ . *J. Clin. Invest.*, 96, 1269–1279.

Engels, F., Renirie, B.F., Hart, B.A., Labadie, R.P. & Nijkamp, F.P. (1992). Effects of apocynin, a drug isolated from the roots of *Picrorhiza kurroa*, on arachidonic acid metabolism. *FEBS Lett*, 305, 254–256.

Espinoza-Cantellano, & Martínez-Palomo (2000). Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 318-331.

García D, Escalante M., Delgado R., Ubeira F. M. & J. Leiro. (2012). Anthelmintic and Antiallergic Activities of *Mangifera indica* L. Stem Bark Components Vimang and Mangiferin. *Phytother. Res.* 17, 1203–1208.

Gottlieb, M., Leal-Campanario, R., Campos-Esparza, M.R., Sánchez –Gómez, M.V., Alberdi, E., Arranz, A., Delgado-García, J.M., Gruart A. & Matute C. (2006). Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. *Neurobiology of Disease*, 23, 374-386.

Groemping, Y. & Rittinger, K. (2005). Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem. Journal*, 386, 401–416.

Jaramillo, F.; Rincón, A. R.; & Martínez, M.C. (2012). Estrés oxidativo y su impacto en la salud. ISBN 978-607- 8227-95-2 Aguascalientes: UAA, , 382 p

Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Ali, V., Suematsu, M., Soga, T., & Nozaki, T. (2010). Two atypical L-cysteine-regulated NADPH-dependent oxidoreductases involved in redox maintenance, L-cystine and iron reduction, and metronidazole activation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.*, 285, 26889-26899.

Khan, R., Hamid, S., Abid, S., Jafri, W., Abbas, Z., Islam, M., Shah, H. & Beg, S. (2008). Predictive factors for early aspiration in liver abscess. *World Journal of Gastroenterology*, 2089-2093.

Kintaka, Y., Osaka, T., Suzuki, Y., Hashiguchi, T., Niijima, A., Kageyama, H., Fumiko, T., Shioda, S. & Inoue, S. (2009). Effects of Gastric Vagotomy on Visceral Cell Proliferation Induced by Ventromedial Hypothalamic Lesions: Role of Vagal Hyperactivity. *Journal Molecular Neuroscience*, 243-249.

Kretschmer, R., Collado, ML., Pacheco, MG., Salinas, M. C., López-Osuna, M., Lecuona, M., Castro, M. & Arellano, J. (1985). Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol*, 7, 527-535.

LeBlanc, J. G., Del Carmen S., Miyoshi A., Azevedo V., Sesma F., Langella P., Bermúdez-Humarán L.G., Watterlot L., Perdigon G. & de Moreno de LeBlanc A. (2011). Use of superoxide dismutase and catalase producing lactic acid bacteria in TNBS induced Crohn's disease in mice. *Journal of Biotechnology*, 151, 287-293.

Lin, J.Y. & Chadee K. (1992). Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol*, 148, 3999-4005.

Maralikova, B., Ali, V., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., van der Giezen, M., Henze, K. & Tovar, J. (2010). Bacterial-type oxygen detoxification and iron-sulfur cluster assembly in amoebal relict mitochondria. *Cell. Microbiol.*, 12, 331-342.

Matteoli, G. & Boecxstaens, G.E. (2013). The vagal innervation on the gut and immune homeostasis. *Recent advances in basic sciences*, 62, 1214-1222.

Mitsui, T., Fukatsu, K., Yanagawa, M., Amenomori, S., Ogawa, E., Fukuda, T., Murakoshi, S., Moriya, T., Yasuhara, H. & Seto, Y. (2013). Truncal vagotomy temporarily decreases the pro- and anti-inflammatory cytokine levels in the small intestine. *Surgery Today*, 44 (6), 1123-1127.

Moukdar, F., Robidoux, J., Lyght, O., Pi, J., Daniel, K. & Collins, S. (2008). Reduced antioxidant capacity and diet-induced atherosclerosis in uncoupling protein-2-deficient

mice. *Journal of Lipid Research*, 50, 59-70.

Muñoz-Ortega, M., Quintanar-Stephano, A., García Lorenzana, M. R., Campos-Esparza, R., Silva-Briano, M., Adabache-Ortiz, A., Campos-Rodríguez, R., Rodríguez, M.G. & Ventura-Juárez, J. (2011). Modulation of amoebic hepatic abscess by the parasympathetic system. *Parasite Immunology*, 33, 65-72.

Namiduru, ES., TarakCloglu, M., Namiduru, M., Kocabas, R., Erbagci, B., Meram, I., Karaoglan, I., Yilmaz, N. & Cekmen, M. (2011). Increased serum nitric oxide and malondialdehyde levels in patients with acute intestinal amebiasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 478-481.

Netter F H. (2006). Atlas of Human Anatomy / Edition 4. *Elsevier Health Sciences*. ISBN-13: 9780808923848.

Olivos-García, A., Nequiz-Avenidaño, M., Tello, E., Martínez, R., González-Canto, A., López-Vancell, R., García de León, M.C., Montford, I. & Pérez-Tamayo R. (2004). Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. *Exp Mol Patol.*, 77 (1), 66-71.

Olivos-García, A., Saavedra, E., Avenidaño, M. & Pérez- Tamayo, R. (2011). Amibiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 54 (2) Marzo-Abril,10-20.

Olivos-García A., Saavedra E., Luis-García E., Nequiz M. & Pérez-Tamayo R. (2012). Stress Response in *Entamoeba histolytica*. Stress Response in Microbiology. *Caister Academic Press*. Cap. 17: 405-427.

Pavlov, V. A. & Tracey, K. J. (2005). The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain, Behavior, and Immunity*, 19, 493-499.

Pavlov, V. A. & Tracey, K. J. (2012). The vagus nerve and the inflammatory reflex-linking immunity and metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. Dec;8(12):743-54. doi: 10.1038/nrendo.2012.189.

Perrucci, S., Fichi, G., Buggiani, C., Rossi, G. & Flamini, G. (2006). Efficacy of mangiferin against *Cryptosporidium parvum* in a neonatal mouse model. *Parasitol Res*. 99(2):184-8. Epub 2006 Mar 18.

Prophet, E., Mills, B., Arrington, J. & Sobin, L. (1994). Laboratory Methods in Histotechnology. *Armed Forces Institute of Pathology*, 56-57.

Rahman, Khalid (2007). Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clinical interventions in aging*, 2, 219-236

Ratcliffe, E.M., Farrar, N.R., & Fox, F.A. (2011). Development of the Vagal Innervation of the GUT: Steering the Wandering Nerve. *Neurogastroenterol Motil*, 898-911.

Rawal, S., Majundar, S., Dhawan, V. & Vohra, H. (2004). Entamoeba histolytica Gal/GalNAc lectin depletes antioxidant defenses of target epithelial cells. *Parasitology*. 128, (6), 617-624.

Roberts, Ch. & Sindhu, K. (2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*, 84, 705-712.

Sánchez-Alemán, E., Quintanar-Stephano, A., Escobedo-González, E.G., Campos-Esparza, M. R., Campos-Rodríguez, R. & Ventura-Juárez, J. (2015). Vagotomy Induces Deregulation of the Inflammatory Response during the Development of Amoebic Liver Abscess in Hamsters. *NeuroImmunoModulation*, 22(3):166-80. doi: 10.1159/000362240. Epub 2014 May 6.

Sargeant, P., Williams, J. E. & Greene, J. D. (1978). The differentiation of invasive and noninvasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72, 519-521.

Shan-Shan, K., Jin-Jun, L., Xiao-Jiang, Y., Yi L. & Wei-Jin, Z. (2012). Protection against Ischemia Induced Oxidative Stress Conferred by Vagal Stimulation in the Rat Heart: Involvement of the AMPK-PCK Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 13,14311-14325.

Tanaka K, Ohkawa S, Nishino T, Nijima A, Inoue S. (1987). Role of the hepatic branch of the vagus nerve in liver regeneration in rats. *Am J Physiol.* 253(4 Pt 1):G439-44.

Tannich E, Bruchhaus I, Walter RD, Horstmann RD. (1991). Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. *Mol Biochem Parasitol.* 49(1):61-71.

Van Der Zanden, E.P., Boecxstaens, G.E. & De Jonge, W.J. (2009). The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil*, 21, 6-17.

Wang, Q., Tompkins, K., Simoni, A., Korthuis, R., Sun, A. & Sun, G. (2006). Apocynin protects against global cerebral ischemia-reperfusion-induced oxidative stress and injury in the gerbil hippocampus. *Brain Research*, 1090, 182-189.

Wang, Q., Smith, R., Luchtefeld, R., Sun, A., Simonyi, A., Lou, R. & Sun, Y. (2008). Bioavailability of apocynin through its conversion to glycoconjugate but not to diapoynin. *Phytomedicine*, 15, 496-503.

Wong-Baeza, I. (2010). The role of Lipopeptidophosphoglycan in the Immune Response to *Entamoeba histolytica*. *Journal of biomedicine and Biotechnology*, 1-12.

Zhou, Z. & Kang, Y.J. (2000). Cellular and subcellular localization of catalase in the heart of transgenic mice. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48, (5), 585-594.



## Apéndice A

### Tinción de núcleos

1. Realizar cortes de tejidos de 10  $\mu\text{m}$  de la parte proximal del ciego y fijarlas en las laminillas silanizadas.
2. Dejar 30 min a temperatura ambiente (todo bajo obscuridad), para que el tejido se adhiriera a la laminilla.
3. Lavar 3 veces con PBS 1x durante 5 min en cada ocasión.
4. Escurrir las laminillas y colocarlas en una cámara húmeda, añadir una gota de colorante de Hoechst (33258, Invitrogen) 1x [5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] sobre cada tejido e incubaron por 10 minutos bajo oscuridad.
5. Lavar 3 veces con PBS 1x durante 5 min en cada ocasión.
6. Escurrir perfectamente y colocar 50  $\mu\text{L}$  de Inmovilon sobre los tejidos y colocar un cubreobjetos evitando la formación de burbujas.
7. Guardar las laminillas a 4°C.

## Apéndice B

### Silanización de laminillas

1. Limpiar las laminillas perfectamente con una sanita humedecida con etanol al 70%; dejarlas secar y se colocarlas en un portalaminillas de tinción.
2. Después sumergirlas en una solución de 3,3,dimetiltritoxysilane (silano) (A3648; Sigma-Aldrich) al 2% en acetona durante 5 min.
3. Escurrirlas y lavarlas dos veces con agua destilada por 2 min cada vez.
4. Colocarlas en una estufa a 56°C durante 4 h para quitar la humedad; y se guardarlas en una caja previamente rotulada.

## Apéndice C

### Determinación de la *Superóxido Dismutasa* (SOD) Sigma Kit 19160

1. Anestesiarse al animal con pentobarbital y perfundir con PBS o una solución de KCl 150 mM para remover los eritrocitos.
2. Homogenizar el tejido con buffer de lisis y colocarlo sobre hielo.
3. Centrifugar el homogenizado a 14,000 x g durante 5 min a 4°C.
4. Separar el sobrenadante en otro tubo limpio que contiene a la SOD tanto de la fracción citosólica como mitocondrial.
5. Colocar en los pocillos de la placa las soluciones como lo marca la siguiente tabla:

Solución	Muestra	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3
Solución Muestra	20 µL		20 µL	
H <sub>2</sub> O destilada		20 µL		20 µL
Solución de trabajo (WST)	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Solución de Enzima de Trabajo	20 µL	20 µL		
Buffer de dilución			20 µL	20 µL

6. Mezclar.

NOTA: Debido a que el anión superóxido se genera inmediatamente después de la adición de la solución de trabajo de enzima, utilizar una micropipeta multicanal para añadir la solución de enzima a los pocillos para evitar desfase de la reacción.

7. Incubar la placa a 37°C por 20 min.
8. Leer la absorbancia a 450 nm en un lector de placas.
9. Calcular la actividad de la SOD (% de inhibición de velocidad) usando la siguiente ecuación:

$$\text{SOD Activity (inhibition rate \%)} = \frac{(A_{\text{blanco1}} - A_{\text{blanco3}}) - (A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco2}})}{(A_{\text{blanco1}} - A_{\text{blanco3}})} \times 100$$

Donde A = Absorbancia

**Buffer de lisis:**

Reactivo	Para 100 mL
1) Tris/HCl 0.1 M, pH 7.4	1.576 g
2) TRITON X-100, 0.5%	0.5 mL
3) PMSF 0.1 mg/mL	0.01 g
4) β-ME 5mM	35.21 μL

Apéndice D

**Determinación de *Catalasa* (CAT); SIGMA CAT-100**

1. Homogenizar sobre hielo 0.1 g de tejido en 200 μl del Buffer de dilución de enzima.
2. Centrifugar a 10,000 x g por 15 min a 4°C.
3. Recolectar el sobrenadante para su análisis y colocarlo sobre hielo.
4. Cuantificar la cantidad de proteína por el método del Bradford.
5. Diluir la concentración de proteína total a 2 mg/mL.
6. Si la muestra no se va a procesar en el momento almacenarla a -80°C (Biovision).
7. Tomar de 10 a 20 μL de muestra y colocarlo en un tubo Eppendorf limpio.
8. Adicionar Buffer de ensayo para completar un volumen total de 75 μL.
9. Iniciar la reacción adicionando 25 μL del Colorimetric Assay Substrate Solution (solución de sustrato del ensayo colorimétrico).
10. Mezclar por inversión e incubar de 1 a 5 min.

11. Adicionar 900  $\mu\text{L}$  de la solución parar e invertir el tubo.
12. Preparar un blanco que contenga las mismas cantidades de reactivos, excepto la solución muestra.
13. **Reacción Colorimétrica:** tomar una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción enzimática de catalasa y pasar a otro tubo eppendorf limpio. Añadir 1 mL del Reactivo de Color y mezclar por inversión.

NOTA: Realizar este paso dentro de los 15 min de haber parado la reacción enzimática.

14. Esperar al menos 15 min para que se desarrolle la reacción de color y medir la absorbancia a 520 nm.

15. **Cálculos :**

- a) Determinar la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\mu\text{moles}$ ) que quedan en la mezcla de reacción usando la curva estándar (ver figura 1). Por ejemplo una  $\text{DO}_{520}$  de 1.4 es equivalente a 0.082  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

$$A_{520}(\text{Blanco}) = \mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ en el Blanco}$$

$$A_{520}(\text{Muestra}) = \mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ en la Muestra}$$

$$\Delta\mu\text{moles (H}_2\text{O}_2) = \mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ (Blanco)} - \mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ (Muestra)}$$

$\Delta\mu\text{moles}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es la diferencia en la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  adicionada a la Reacción Colorimétrica entre el blanco y la muestra tomada.

- b) El valor calculado anteriormente puede ser usado para determinar la actividad de la catalasa

$$\text{Actividad } (\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}) = \frac{\Delta\mu\text{moles (H}_2\text{O}_2) \times d \times 100}{V \times t}$$

$$V \times t$$

$\Delta\mu\text{moles (H}_2\text{O}_2)$  = Es la diferencia en la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  adicionada a la Reacción Colorimétrica entre el blanco y la muestra tomada.

d = Dilución de la muestra original por la reacción de la catalasa.

T = Duración de la Reacción de la catalasa (min).

V = Volumen de muestra en la reacción de la catalasa ( $x \mu\text{L} = 0.00x \text{ mL}$ ).

100 = Dilución de la alícuota de la reacción de catalasa en la reacción colorimétrica (10  $\mu\text{L}$  de 1 mL).

**Definición de Unidad:** Una unidad de catalasa es aquella que puede descomponer 1.0  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua por min a pH 7.0 a 25° C a una concentración de sustrato de 50 mM de peróxido de hidrógeno.

**SOLUCIONES**

**1. Buffer de ensayo 1x :** Pesar las siguientes cantidades de reactivos, disolver en 90 mL de H<sub>2</sub>O destilada, ajustar el pH a 7.0 y aforar a 100 mL.

Reactivo	Para 100 mL
1) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM	0.6804 g
2) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 50 mM	0.7098 g

**2. Solución Stop :** 15 mM de azida de sodio en agua.

**3. Buffer de dilución de enzima:** Tomar 100 mL de Buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.0 y añadir 100 $\mu\text{L}$  de TRITON X-100.

**4. Preparación de la Curva Estándar:**

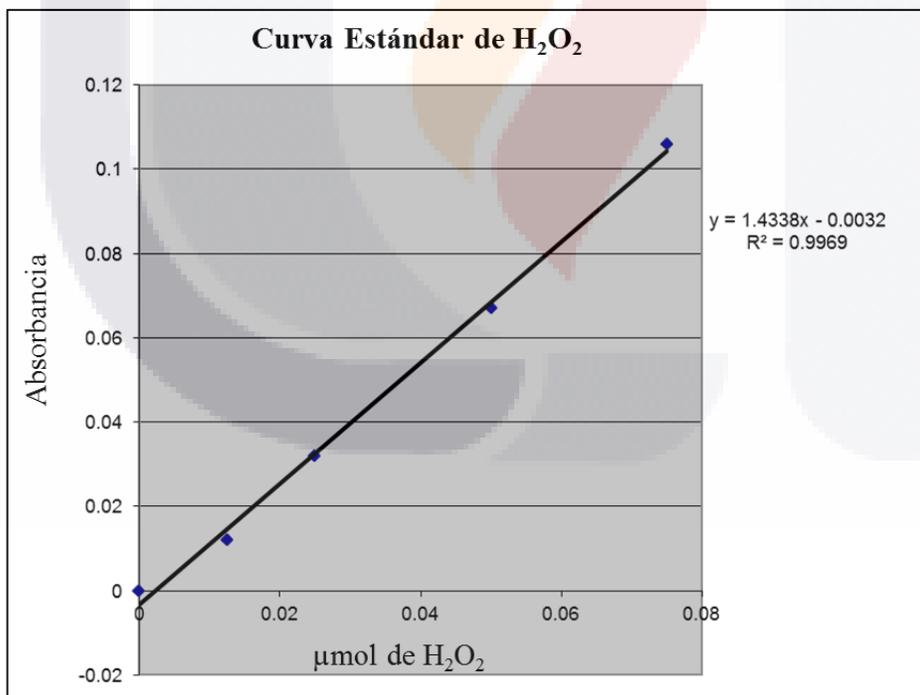
1. Preparar una serie de diluciones estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y añadir los reactivos que se indican en la siguiente tabla:

Volumen de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 mM	Buffer de Ensayo 1x	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM] en la solución estándar	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM] en la mezcla de Reacción  <b>Eje X</b>
0 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$	0	0

125 $\mu\text{L}$	875 $\mu\text{L}$	1.25	0.0125
250 $\mu\text{L}$	750 $\mu\text{L}$	2.5	0.0250
500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	5.0	0.0500
750 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	7.5	0.0750

**NOTA:** La concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mostrada en la tabla está basada partiendo de una concentración exacta de 10 mM.

- Transferir una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de cada solución a un segundo tubo y añadir 1 mL del Reactivo de Color. Esperar 15 min y leer la absorbancia a 520 nm. Las soluciones estándar de  $\text{H}_2\text{O}_2$  deben ser preparadas al día.
- Graficar en la curva estándar la absorbancia a 520 nm (**eje ordenadas**), la cantidad final de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la mezcla de reacción como lo muestra la figura 1.



**Fig. 1:** Curva estándar realizada para cuantificar la absorbancia de la coloración de rojo de quinoneimina con varias cantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .