



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

Centro De Ciencias Básicas
Departamento De Morfología

TESIS

**“ESTUDIO DE UNA PROTEÍNA SEMEJANTE AL
RECEPTOR 1 A IFN- γ HUMANO EN *Entamoeba
histolytica*”**

PRESENTA

M. en C. Julieta Pulido Ortega

PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORES

Dr. Javier Ventura Juárez

Dr. Kris Chadee

Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega

Aguascalientes, Ags. A 22 de Octubre de 2019



Aguascalientes, Aqa a 22 de Octubre, 2019

M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas y presidente del
CONSEJO ACADÉMICO DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS,
Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes

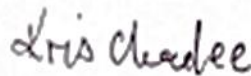
Presente:

Por este conducto hacemos de su conocimiento que la aspirante a Doctor en Ciencias del doctorado en Ciencias Biológicas Julieta Pulido Ortega, ha cumplido con los objetivos y metas del proyecto doctoral titulado: "Estudio de una proteína semejante al receptor a IFN- γ en Entamoeba histolytica", adicionalmente, los resultados de este proyecto se enviaron a publicación a la revista Infection and Immunity "Functional characterization of an IFN- γ like receptor on Entamoeba histolytica", el cual ha sido aceptado para publicación con número de doi:10.1128/IAI.00540-19, y será publicado en Noviembre del 2019, por lo que cumple con los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Los abajo firmantes hemos revisado el contenido de la tesis y estamos de acuerdo con el contenido de la misma, por lo que damos nuestro voto aprobatorio para que continúe con los trámites para presenta el examen de grado reglamentario.

Atte:



Dr. Javier Ventura Juárez



Dr. Kris Chadee

TUTORES

Martin Humberto Muñoz O.
Dr. Martin Humberto Muñoz Ortega
MIEMBRO DEL COMITÉ TUTORIAL



AUTORIZACIONES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

JULIETA PULIDO ORTEGA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

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: **"ESTUDIO DE UNA PROTEÍNA SEMEJANTE AL RECEPTOR A IFN- γ EN ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS"** 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., a 29 de Octubre de 2019

"Se lumen proferre"

EL DECANO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Ruiz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

AUTORIZACIONES

Manuscrito aceptado el 07 de Agosto 2019, en la revista *INFECTION AND IMMUNITY*

Accepted Manuscript Posted Online

mmunity

IAI Accepted Manuscript Posted Online 19 August 2019

Infect. Immun. doi:10.1128/IAI.00540-19

Copyright © 2019 Pulido-Ortega et al.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

1 **Functional characterization of an IFN- γ -like receptor on *Entamoeba histolytica***

2 **Running title: *E. histolytica* IFN- γ receptor-like protein function**

3 Julieta Pulido-Ortega¹, Patricia Talamás-Rohana², Martín Humberto Muñoz-Ortega³, Liseth

4 Rubí Aldaba-Muruato⁴, Sandra Luz Martínez-Hernández¹, María del Rosario Campos-

5 Esparza¹, Daniel Cervantes-García⁵, Aralia Leon-Coria⁶, France Moreau⁶, Kris Chadee^{6#},

6 Javier Ventura-Juárez^{1#}.

7 ¹Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de

8 Aguascalientes, Aguascalientes, Ags. México. CP 20131. ²Departamento de Infectómica y

9 Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto

10 Politécnico Nacional. CDMX. CP 07360. ³Departamento de Química, Centro de Ciencias

11 Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags. México. CP

Downloaded from <http://iai.asm.org/> on

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar a esta etapa, por darme la fuerza necesaria para cumplir con cada una de mis metas, por mostrarme a lo largo de mi vida que día con día es una lucha y que al final todo tiene su recompensa.

Dr. Javier Ventura, por su gran dedicación para el desarrollo de este trabajo, especialmente por permitirme formar parte de este excelente grupo de personas y grandes investigadores. Agradezco también a los demás miembros de mi comité por sus consejos y observaciones en el desarrollo de este trabajo, a la **Dra.**

Patricia Talamás Rohana, al **Dr. Adolfo Martínez Palomo** por su amable donación de trofozoítos de *E. dispar* y al **Dr. Kris** por su gran apoyo y atenciones durante mi estancia en sus respectivos laboratorios.

Dr. Martín Muñoz (Martincito) por siempre estar para sacarme de apuros, muchas gracias Martín por ser mi amigo, mi maestro y un gran apoyo, muchas gracias.

Quiero agradecer a todos los grandes amigos que hice: a la **Dra. Liseth**, amiga gracias infinitas por todo y por tanto, eres una gran investigadora y una gran amiga te quiero muchísimo, gracias por todos tus consejos siempre. A la **Dra. Sandra Luz** gracias amiga por siempre estar para mí y apoyarme siempre. Gracias a mis bellas amigas **Michelle, Letys, Marina** por amistad y por todos los momentos chidos que pasamos. Gracias a todos mis compañeros y amigos.

Miles de gracias al **Dr. Marcelo y Arita**, por ser mis amigos, por sus consejos, por siempre invitarme a comer.

Agradezco de manera especial a mi **Mamá** por TODISIMO su apoyo a lo largo de mi vida, por ser siempre mi mayor sustento, mi mejor amiga. Por todo su sacrificio para que hoy yo sea la persona que soy, por alentarme siempre a luchar por lo que quiero y enseñarme tanto de la vida. Te amo. Gracias también a mi **hermano** por todos sus consejos, su cariño y apoyo, te quieee...tecito siempre. En general a toda mi familia por siempre ser mi apoyo.

A Dani, gracias amor por siempre estar para mí, entenderme y apoyarme a lo largo de esta etapa. Por ser mí amigo, mi compañero y alentarme a ser mejor día con día, Te amo.

A CONACYT por otorgar la beca doctoral a Julieta Pulido-Ortega (número 290934).

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a:

Mi mamá: **María Ortega**

Con todo mi amor y admiración.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ACRÓNIMOS	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 <i>Entamoeba histolytica</i>	4
1.2 Morfología	5
1.3 Ciclo de vida	8
1.4 Factores de patogenicidad	9
1.5 Respuesta inmune	13
1.6 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune	17
1.7 IFN- γ	20
1.8 Receptor a IFN- γ	20
2. ANTECEDENTES	24
2.1 Importancia del IFN- γ en la respuesta inmune a <i>E. histolytica</i>	24
2.2 Nuevos Factores de Patogenicidad	25
2. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	30
5.1 Objetivo General:	30
5.2 Objetivos específicos:	30
6. METODOLOGÍA	31
6.1 Cultivo de <i>E. histolytica</i>	31
6.2 Detección por inmunofluorescencia de IFN- γ y de la proteína similar al receptor a IFN- γ R1	31
6.3 Análisis Western Blot para la detección de una proteína similar al Receptor 1 de IFN- γ en <i>E. histolytica</i>	32
6.4 Espectrometría de masas	33
6.5 Aislamiento de RNA total y qPCR	35
6.6 Eritrofagocitosis	36
6.7 Inmunoprecipitación.	37

6.8 Quimiotaxis	38
6.9 Ensayo de citotoxicidad.....	39
6.10 Animales.....	39
6.11 Amebiasis hepática experimental	40
6.12 Tinción con hematoxilina y eosina (H&E).	40
6.13 Inmunohistoquímica.....	40
6.14. Expresión de Math1-GFP en un modelo experimental de colitis	41
6.15 Análisis estadístico	41
7. RESULTADOS	42
7.1 Detección de IFN- γ y IFN- γ R1 en <i>E. histolytica</i>	42
7.2 Análisis de espectrometría de masas.....	48
7.3 El IFN- γ regula positivamente la expresión de factores de virulencia de <i>E. histolytica</i>	50
7.4 El pre-tratamiento con IFN- γ aumenta la eritrofagocitosis en <i>E. histolytica</i>	52
7.5 El pre-tratamiento con IFN- γ aumenta la quimiotáxis en <i>E. histolytica</i>	54
7.6 IFN- γ aumenta la actividad citopática de <i>E. histolytica</i> hacia las células Caco-2 y HepG2.	56
7.7 Efecto <i>in vivo</i> de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> estimulados con IFN- γ .	57
7.8 Expresión de Math1-GFP en un modelo de colitis amebiana.....	61
8. DISCUSIONES	64
9. CONCLUSIONES	69
10. GLOSARIO	70
11. BIBLIOGRAFÍA	73
12. APÉNDICE.....	A
12. 1 APÉNDICE A. Medio de cultivo Diamond	A
12.2 APÉNDICE B. Resiembra (tubos stock).....	B
12. 3 APÉNDICE C. Aislamiento de proteínas de membrana de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	C
12. 4 APÉNDICE D. Cuantificación de proteína por el método de Bradford. D	D
12. 5 APÉNDICE E. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	E
12. 6 APÉNDICE F. Electrotransferencia	F
12.7 APÉNDICE G. Tinción de Hematoxilina – Eosina	G
12.8 APÉNDICE H. Inmunohistoquímica.....	H

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Trofozoíto y quiste de <i>E. histolytica</i> .	6
Figura 2	Predicción de mecanismo de transducción de señales de <i>E. histolytica</i> basado en el análisis de su secuencia genómica.	7
Figura 3	Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .	9
Figura 4	Establecimiento dinámico de la unión y adherencia de <i>E. histolytica</i> a las células epiteliales del colon.	10
Figura 5	A. Respuesta inmune del huésped a la amebiasis intestinal. B. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune.	13
Figura 6	Inmunidad del hospedero y patología durante la infección por <i>E. histolytica</i> .	17
Figura 7	Receptor a IFN- γ .	21
Figura 8	Representación esquemática del receptor de interferón- γ (IFN- γ) y su vía de señalización.	23
Figura 9	Localización de IFN- γ en la superficie de <i>E. histolytica</i> .	43
Figura 10	Co-localización e interacción del receptor similar a IFN- γ e IFN- γ en <i>E. histolytica</i> .	44
Figura 11	Doble inmunofluorescencia en trofozoítos de <i>E. dispar</i> .	46
Figura 12	Western blot de fracciones de membrana de <i>E. histolytica</i> usando un anticuerpo anti-IFN- γ R1 humano.	47
Figura 13	Análisis de la proteína de 200 kDa detectada por el anticuerpo anti-IFN- γ R1 humano en <i>E. histolytica</i> .	49
Figura 14	Expresión de cisteína proteasas reguladas por IFN- γ en <i>E. histolytica</i> .	50
Figura 15	IFN- γ regula la expresión de otros genes de virulencia en <i>E. histolytica</i> conforme al tiempo.	51

Figura 16	El IFN-γ incrementa la eritrofagocitosis en <i>E. histolytica</i>.	52
Figura 17	Quimiotaxis de <i>E. histolytica</i> hacia el IFN-γ humano.	55
Figura 18	El IFN-γ mejoró la actividad citopática de <i>E. histolytica</i> en las células Caco-2 y HepG2.	57
Figura 19	Abscesos hepáticos amebianos 4 días después de la inoculación.	58
Figura 20	Tinción de Hematoxilina y Eosina.	60
Figura 21	Detección de trofozoítos <i>E. histolytica</i> en AHA en hámster por inmunohistoquímica.	61
Figura 22	<i>E. histolytica</i> suprime la expresión diferencial Math1 (GC) en un modelo de colitis ex vivo.	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos para inmunofluorescencia.	32
Tabla 1. Anticuerpos usados en inmunodetección por Westn Blot	33
Tabla 2. Oligonucleótidos usados para qPCR	35



ACRÓNIMOS

IFN-γ	Interferón Gamma
R1IFN-γ	Receptor 1 a Interferón Gamma
<i>Eh</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
IL-8	Interleucina 8
Caco-2	Línea celular de Adenocarcinoma de Colon humano
Hep-G2	Línea celular de Cáncer de hígado
CP	Cisteína Proteasa
<i>EhCP</i>	Cisteína proteasa de <i>Entamoeba histolytica</i>
COX-1	Ciclooxygenasa 1 ó prostaglandina-endoperóxido sintasa
AHA	Absceso hepático amebiano
APA	Amoebaporo
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ADN	Ácido desoxirribonucleico
kDa	KiloDaltones
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
NO	Óxido nítrico
CXCR-1	Receptor tipo CXC 1
IL-1β	Interleucina 1 Beta
Th1	Linfocitos T cooperadores (helper) 1
CD	Cluster de diferenciación
TLR	Receptores tipo Toll
IgA	Inmunoglobulina tipo A
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
JAK	Quinasa tipo Janus
STAT	Traductor de señal y activador de la transcripción
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (Reducida)
MAC	Complejo de Ataque a Membrana
SiRNA	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia

SH2	Dominio de la Tirosina quinasa específica de Leucocitos
PGE2	Prostaglandina E 2
MB	Millón de pares de bases
NETs	Trampas Extracelulares de Neutrófilos
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
Rab	Familia de GTPasas de fusión de membrana
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante Beta
ATCC	American Type Culture Collection
DAB	Diaminobencidina
DAPI	Marcador fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol
H&E	Hematoxilina Eosina
MS	Espectrometría de Masas
TBS-T	Buffer salino Tris + polisorbato
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimeraza (cuantitativa)
PBS	Buffer Salino Fosfato

RESUMEN

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) es un protozoo parásito anaerobio causante de amebiasis. La virulencia amebiana es el resultado de la compleja interacción huésped-parásito que implica la producción de diversos conjuntos de factores de virulencia, que se atenúan por el cultivo *in vitro* prolongado. Además, *E. histolytica* expresa proteínas que son homólogas a proteínas humanas, utilizándolas como factores de virulencia, de interés a nosotros estas proteínas de *E. histolytica* son semejantes a receptores a citocinas humanas. Hemos demostrado previamente que *E. histolytica* puede fijar el interferón gamma exógeno (IFN- γ) posiblemente mediado por un receptor similar a la proteína del receptor IFN- γ humano 1. En este estudio, determinamos si el IFN- γ exógeno modula la virulencia del parásito *E. histolytica*. La proteína similar receptora a IFN- γ se identificó en la superficie de *E. histolytica* por inmunofluorescencia, análisis inmunoblot en fracciones de membranas de amebas usando un anticuerpo anti IFN- γ R1, espectrometría de masas y análisis *in silico*. La interacción del IFN- γ recombinante con *E. histolytica* aumentó significativamente la expresión de Cisteína proteinasa A1 (EhCP-A1), EhCP-A2, EhCP-A4, EhCP-A5, Amebapore A (AP-A), Ciclooxygenasa 1 (Cox-1), Gal-lectina (Hgl) y peroxiredoxina (Prx) de forma dependiente del tiempo. Funcionalmente la interacción con esta citosina mejoró la eritrofagocitosis por de *E. histolytica* fue abrogada con el inhibidor de STAT-1, fludarabina. De igual manera mejoró la quimiotaxis de *E. histolytica*, de forma similar a la IL-8 y la destrucción de las monocapas de células Caco-2 y HepG2. Por ultimo *in vivo* se observó mayor daño en el absceso hepático amebiano en los hámsters, generado por las amibas interactuadas previamente con IFN- γ . Estos resultados demuestran que los trofozoítos de *E. histolytica* expresan un receptor tipo IFN- γ , que es funcional y pueden desempeñar un papel en la patogénesis de la enfermedad y/o en la evasión de la respuesta inmune.

Palabras clave: *Entamoeba histolytica*, amebiasis, cisteína proteasas, IFN- γ Receptor 1, eritrofagocitosis, efecto citopático.

ABSTRACT

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) is an anaerobic parasitic protozoan that causes amebiasis. The amoebic virulence is the result of the complex host-parasite interaction that involves the production of various sets of virulence factors, which are attenuated by prolonged in vitro culture. In addition, *E. histolytica* expresses proteins that are homologous to human proteins, using them as virulence factors, of interest to us these *E. histolytica* proteins are similar to human cytosine receptors. We have previously shown that *E. histolytica* can fix exogenous gamma interferon (IFN- γ) possibly mediated by a receptor similar to the human IFN- γ receptor protein 1. In this study, we determine whether exogenous IFN- γ modulates the virulence of *E. histolytica* parasite. The IFN- γ receptor-like protein was identified on the surface of *E. histolytica* by immunofluorescence, immunoblot analysis in amoebae membrane fractions using an anti IFN- γ R1 antibody, mass spectrometry and in silico analysis. The interaction of recombinant IFN- γ with *E. histolytica* significantly increased the expression of Cysteine Proteinase A1 (EhCP-A1), EhCP-A2, EhCP-A4, EhCP-A5, Amebapore A (AP-A), Cyclooxygenase 1 (Cox- 1), Gal-lectin (Hgl) and peroxiredoxin (Prx) in a time-dependent manner. Functionally the interaction with this cytosine improved erythrophagocytosis due to *E. histolytica* was abrogated with the STAT-1 inhibitor, fludarabine. Similarly, the chemotaxis of *E. histolytica* improved, similar to IL-8 and the destruction of the Caco-2 and HepG2 cell monolayers. Finally, in vivo, greater damage was observed in amoebic liver abscess in hamsters, generated by the amoebae previously interacting with IFN- γ . These results demonstrate that *E. histolytica* trophozoites express an IFN- γ type receptor, which is functional and may play a role in the pathogenesis of the disease and / or in evading the immune response.

Keywords: *Entamoeba histolytica*, amoebiasis, cysteine proteases, IFN- γ Receptor 1, erythrophagocytosis, Cytopathic effect.

1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos inmemoriales el hombre ha estado en contacto con diversos microorganismos, formando así las llamadas asociaciones biológicas; con el tiempo se les clasificó a estas asociaciones de acuerdo a los efectos provocados en el hombre, de entre ellas surgió el llamado parasitismo. El parasitismo es un tipo de simbiosis, una estrecha relación en la cual uno de los participantes, depende del otro y obtiene algún beneficio. Sin embargo, en la mayoría de los casos de parasitismo el hospedador percibe un daño o perjuicio por parte del parásito en algún momento del ciclo de vida (Amador, N. 1971).

La humanidad ha venido padeciendo el azote de la disentería, la cual fue descrita por Celso e Hipócrates con el nombre de “Flujo de vientre” (477 a 377 AC). Sin embargo, no fue hasta 1875 que Feder Lósch, en San Petersburgo, encontró amebas en las heces de un agricultor, siendo este hallazgo la pauta para la descripción de este parásito (Goncalves *et al.* 2004; Mitchell 2017), como el agente causal de la amebiasis.

Éste parásito infecta el intestino grueso humano, colonizando de manera asintomática en el 90% de los casos. La razón exacta de porque *E. histolytica* ocasionalmente invade el epitelio mucoso y que factores huésped-parásito están involucrados en la invasión, no está claro. El resultado de la infección por *E. histolytica* es variable; puede provocar diarrea ó colitis amebiana, y/o diseminarse a través de la circulación portal para causar absceso hepático (Ralston and Petri 2011), en casos más severos y que tan solo en 2013, fue el responsable de aproximadamente 11,300 muertes a nivel mundial (Bruckner 1992; Lozano *et al.* 2012; Lancet *et al.*, 2015).

La invasión por *E. histolytica* induce una robusta respuesta pro-inflamatoria y la destrucción del tejido del huésped que exacerba la enfermedad (Mortimer *et al.* 2015). No existe una vacuna efectiva para esta enfermedad, sin embargo los

nitroimidazoles (metronidazol) son efectivos para tratar con este parásito, a su vez, el Metronidazol puede causar un efecto tóxico y potenciar la probabilidad de desarrollar resistencia a la droga (Ralston and Petri 2011; Ali, Clark, and Petri 2008).

La capacidad de *E. histolytica* para sobrevivir en el huésped humano se ha relacionado en parte con la notable movilidad de los antígenos de superficie después de la interacción con los anticuerpos, por lo tanto, los complejos de antígeno-anticuerpo resultantes se eliminan mediante el recubrimiento (Chávez-Munguía *et al.* 2012). *E. histolytica* puede protegerse de las especies reactivas de oxígeno producidas por los neutrófilos con peroxiredoxina, una proteína de superficie de 29 kDa, que tiene una potente actividad antioxidante (Davis, Zhang, Guo, *et al.* 2006).

E. histolytica supera las defensas innatas del huésped, como el moco con cisteína proteinasas (Moncada, Keller, and Chadee 2003) y algunas proteínas o componentes solubles de *E. histolytica* estimulan a las células epiteliales aumentando la expresión de ARNm de IL-8, una citocina quimio-atrayente para neutrófilos (Dey and Chadee 2008). Varios factores de virulencia actúan en diferentes etapas del proceso de invasión, como la lectina Gal/GalNAc para la adhesión a las células huésped (Gilchrist and Petri 1999), la citólisis de células inmunes (K Chadee *et al.* 1987), la degradación de las inmunoglobulinas como la IgA (Lidell *et al.* 2006), y destrucción de tejidos (Gilmartin, Ralston, and Petri 2017).

1.1 *Entamoeba histolytica*

E. histolytica, es un protozooario parásito que coloniza el lumen intestinal y es el agente causal de la amebiasis y disentería, y en casos avanzados, produce abscesos hepáticos amebianos, lo que lleva a la muerte de casi 55 mil personas en todo el mundo anualmente (Lozano *et al.*, 2012). Este parásito ha estado compartiendo su vida con el humano durante al menos 5300 años (Goncalves *et al.*, 2004; Mitchell 2017) y desde 1875 se describió como un parásito entérico.

Se presenta de manera asintomática en la mayoría de los casos, sin embargo, *E. histolytica* causa dos principales síndromes clínicos: colitis amebiana fulminante y el absceso hepático amebiano (AHA), esto afectando a solo el 1% de las personas infectadas (Haque *et al.*, 2007; Pinilla, López, and Viasus 2008). Se ha descrito que la amebiasis es la tercera causa de muerte por enfermedad parasitaria, después de la malaria y la esquistosomiasis, a nivel mundial (Pinilla, López, and Viasus 2008).

1.2 Morfología

E. histolytica presenta 2 fases principales en su ciclo de vida: el quiste y el trofozoíto. El quiste es la forma infectante en la naturaleza, sobrevive al suelo húmedo durante una semana por lo menos si la temperatura fluctúa entre los 28 y 34 °C, y hasta un mes, si la temperatura es de 10 °C. Es esférico y mide aproximadamente entre 5 y 20 micras; tiene cuatro núcleos y una pared gruesa de quitina, y en ocasiones presenta una vacuola con glucógeno. El trofozoíto corresponde a la forma invasiva, vegetativa, es móvil, pleomórfico, de forma alargada, un núcleo con endosoma central y cromatina periférica fina, distribuida regularmente, sus dimensiones varían entre 10 a 60 micras. Presentan movilidad direccional, progresiva, mediante la emisión de pseudópodos digitiformes explosivos (lobópodos). En el extremo posterior del organismo se encuentra el uroide, que contiene el motor de actina/miosina, el cual impulsa a la amiba hacia adelante. Emergen en el íleon terminal, tras el desenquistamiento, en la forma de trofozoítos con 4 núcleos, que darán lugar a 8 trofozoítos uninucleados. La multiplicación se lleva a cabo por división binaria (Martínez-Palomo 1987) y se encuentra en las materias fecales recién emitidas. El citoplasma presenta dos zonas que no están separadas físicamente, pero sí bien diferenciadas: el ectoplasma y el endoplasma (Fig. 1) (Martínez-Palomo 1991).

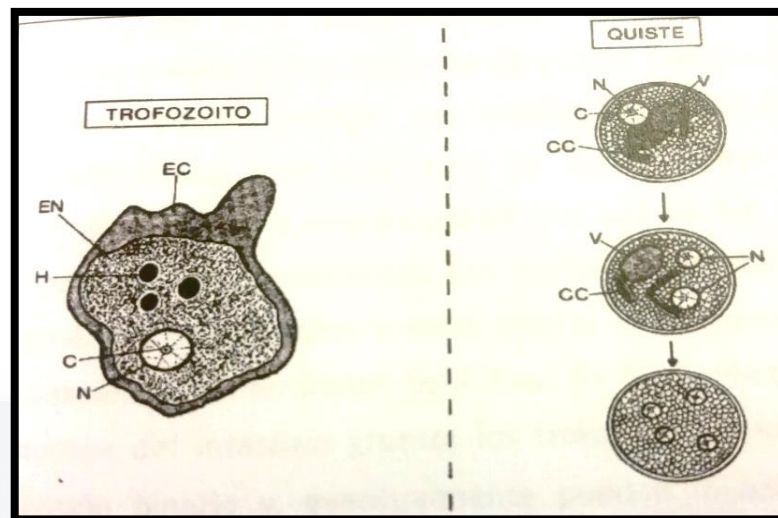


Figura 1. Trofozoito y quiste de *E. histolytica*. C, cariosoma; N, núcleo; EN, endoplasma; EC, ectoplasma; H, hematíe; CC, cuerpos cromáticos; V, vacuola. (Pumarola A., Rodríguez-Torres A., and García-Rodríguez A. 1999).

La membrana plasmática de los trofozoítos mide aproximadamente 10 nm de espesor y es semejante en composición a las membranas celulares de eucariontes superiores. Una de las características que presenta la membrana celular es la dinámica de sus componentes por su interacción con varios ligandos externos, como carbohidratos complejos, anticuerpos poliespecíficos, ferritina catiónica y células que le sirven de sustento nutricional al trofozoito, como bacterias y eritrocitos. Existen varios eventos que puntualizan la importancia de la membrana plasmática en la subsistencia de la ameba, como lo es la producción de pseudópodos para su motilidad, la fagocitosis y la distribución de antígenos y receptores. El citoplasma amebiano presenta ribosomas libres y ADN extracelular, contenido en estructuras citoplásmicas (denominadas EhKOs) (Orozco *et al.*, 1997); también se sugiere la existencia de organelos derivados de mitocondrias que contienen ADN (criptones) (Ghosh *et al.*, 2000). Además Bredston *et al.*, (2005) mediante herramientas bioinformáticas, de biología celular y bioquímicas, obtuvieron evidencias de la presencia de un aparato de Golgi y de funciones derivadas del Retículo Endoplásmico en el parásito que sugieren que los glicoconjugados que este microorganismo posee (lectinas, glicoproteínas,

glicolípidos) se puedan sintetizar de una manera análoga a como ocurre en eucariotas superiores.

El genoma de *E. histolytica* ha sido nuevamente analizado, incorporando modificaciones importantes en estructura y función a los modelos de genes ya existentes. El tamaño del genoma se estima en aproximadamente 20 Mb conteniendo 8,201 genes predichos. El genoma cromosómico contiene también una variedad de elementos repetidos que incluyen elementos similares a los transposones (Charles R. Sterling and Adam D. 2004).

Loftus *et al.*, 2005 describieron con base en su genoma, que *E. histolytica* usa un sistema complejo de transducción de señales para interactuar con diferentes ambientes. Se describen al menos 270 proteína cinasas hipotéticas en *E. histolytica* (Fig. 2), representado a miembros de las siete familias proteína-cinasas eucarióticas.

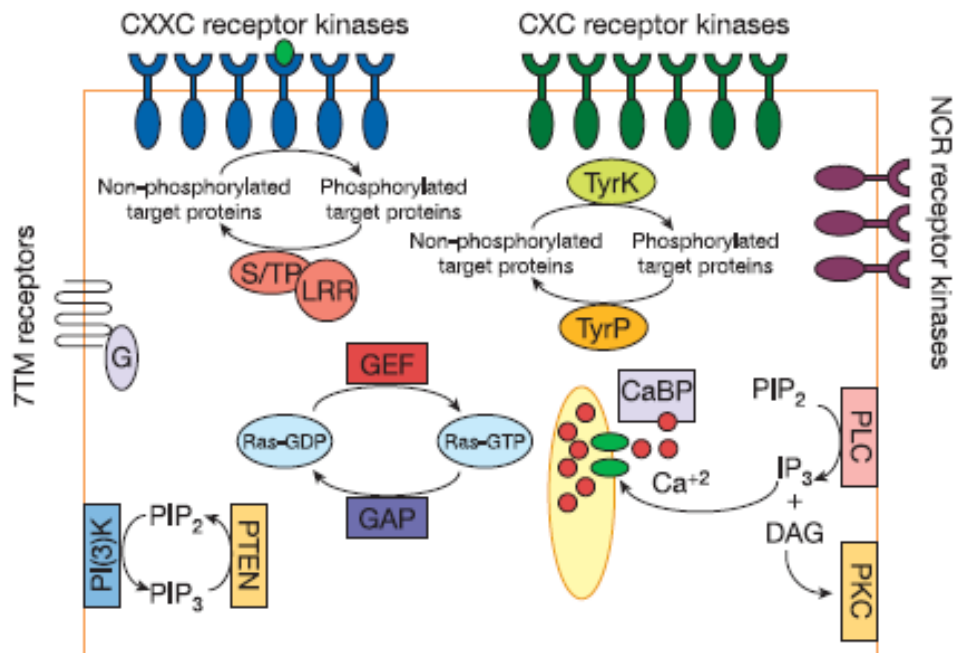


Figura 2. Predicción de mecanismo de transducción de señales de *E. histolytica* basado en el análisis de su secuencia genómica. *E. histolytica* posee tres tipos de

receptores serina/treonina cinasas, un grupo de repetidos CXXC en el dominio extracelular, además de repetidos CXC y repetidos ricos en no-cisteína (NCR). (Loftus *et al.*, 2005).

1.3 Ciclo de vida

La carencia de etapas sexuales y de hospederos intermediarios, que sí están presentes en el desarrollo ontogénico de otros parásitos, evidencia la sencillez del ciclo evolutivo de *E. histolytica*. La infección se da por la ingesta del quiste maduro, a través de agua o alimentos contaminados en áreas con poca sanidad (Ralston and Petri 2011). En el intestino delgado el parásito sufre el desenquistamiento, donde surge un trofozoíto, el cual termina su proceso de división y da lugar a 4 trofozoítos metaquísticos multiplicando sus núcleos (Adedayo and Nasiiro 2004). Éstas se transforman en los trofozoítos que finalmente se establecen en el colon, donde se alimentan de bacterias y restos celulares, reproduciéndose por fisión binaria (Pinilla, López, and Viasus 2008).

Los trofozoítos migran al ciego y se adhieren a la mucosa intestinal. Los trofozoítos pueden invadir la mucosa intestinal y producir desde síntomas leves hasta disentería grave; Incluso tienen la capacidad de inducir la secreción de un moco de composición diferente a la ya existente en la mucosa por las células caliciformes del epitelio intestinal (Kris Chadee, Keller, Forstner, Innes, & Ravdin, 1991). Cuando ha invadido el epitelio intestinal, el parásito puede diseminarse a través de la sangre, originando lesiones extraintestinales principalmente en hígado y, con menos frecuencia, en pulmón, cerebro, piel, órganos genitales, bazo y riñón (Fig. 3). Alternativamente, bajo condiciones aún no determinadas, los trofozoítos pueden enquistarse, salir al ambiente con las heces y así contaminar agua y alimentos, para infectar nuevamente a otros individuos, completando su ciclo de vida (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000; A. Martínez-Palomo, Tsutsumi, Anaya-Velazquez, & Gonzalez-Robles, 1989).

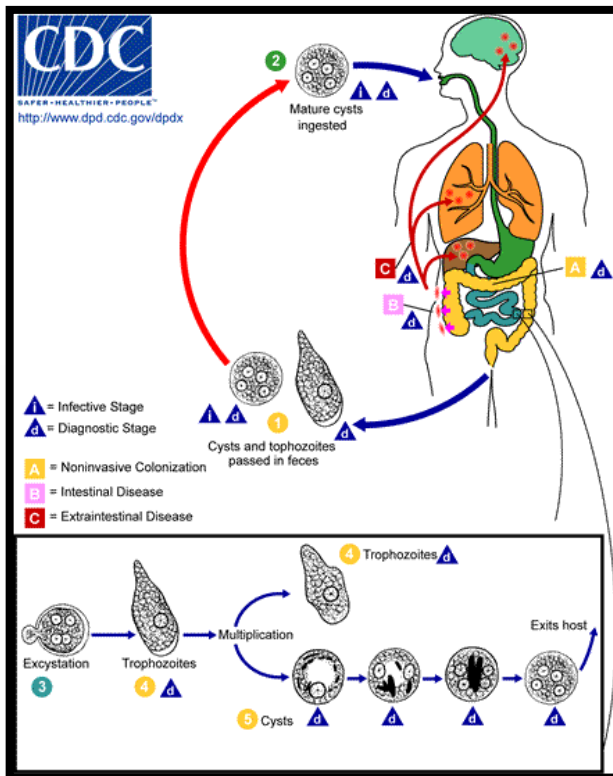


Figura 3. Ciclo de vida de *E. histolytica*.

1. Quistes y trofozoítos en heces. 2. Ingesta de quiste maduro. 3. Desenquistamiento. 4. Trofozoíto multiplicación, colonización de intestino. (<http://www.parasitesinhumans.org>)

1.4 Factores de patogenicidad

E. histolytica posee diversos factores que le permiten llevar a cabo su proceso de invasión y destrucción del tejido intestinal. Estos le permiten al parásito tener capacidad de adhesión, degradación y disrupción de los componentes que constituyen el tejido del hospedero. Dentro de estos factores se encuentran las adhesinas tipo lectina (como la Galactosa/N-acetil-D-Galactosamina (Petri, Haque, and Mann 2002), lectina de 220 kDa (Rosales-Encina *et al.*, 1987), entre otras, el amebaporo, cisteín-proteasas, colagenasas, hialuronidasas, neuraminidasas, toxinas, lipopeptidofosfoglicanos y lipo-proteofosfoglicanos (Moncada, Keller, and Chadee 2003).

Las moléculas de superficie controlan la adherencia, la señalización, la ingestión y la modulación inmune en la interfaz del parásito anfitrión. Los trofozoítos, al estar en contacto con el hospedero, se adhieren primero a las células epiteliales de la mucosa intestinal vía lectina Gal/GalNac de 170 kDa, posteriormente y si hay

un proceso invasivo, se adhieren a las células endoteliales de los vasos sanguíneos; además, en respuesta a la infección, también se une a las células efectoras del sistema inmune, como polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos (Huston *et al.*, 2003; Leroy *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1994). Muchas proteínas de superficie amebianas tienen diversidad funcional en estos procesos, incluida la lectina heterotrimérica Gal / GalNAc (Petri, Haque, and Mann 2002). Presenta afinidad por azúcares como N-acetil D-galactosamina y N-acetil D-glucosamina Figura 4, los cuales son azúcares de membrana de los eritrocitos, células inmunes y de matriz extracelular; actúa principalmente como adhesina y activa a la caspasa 3 humana que lleva a las células blanco a la apoptosis, misma que puede inhibirse por la galactosa (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000; Petri & Schnaar, 1995).

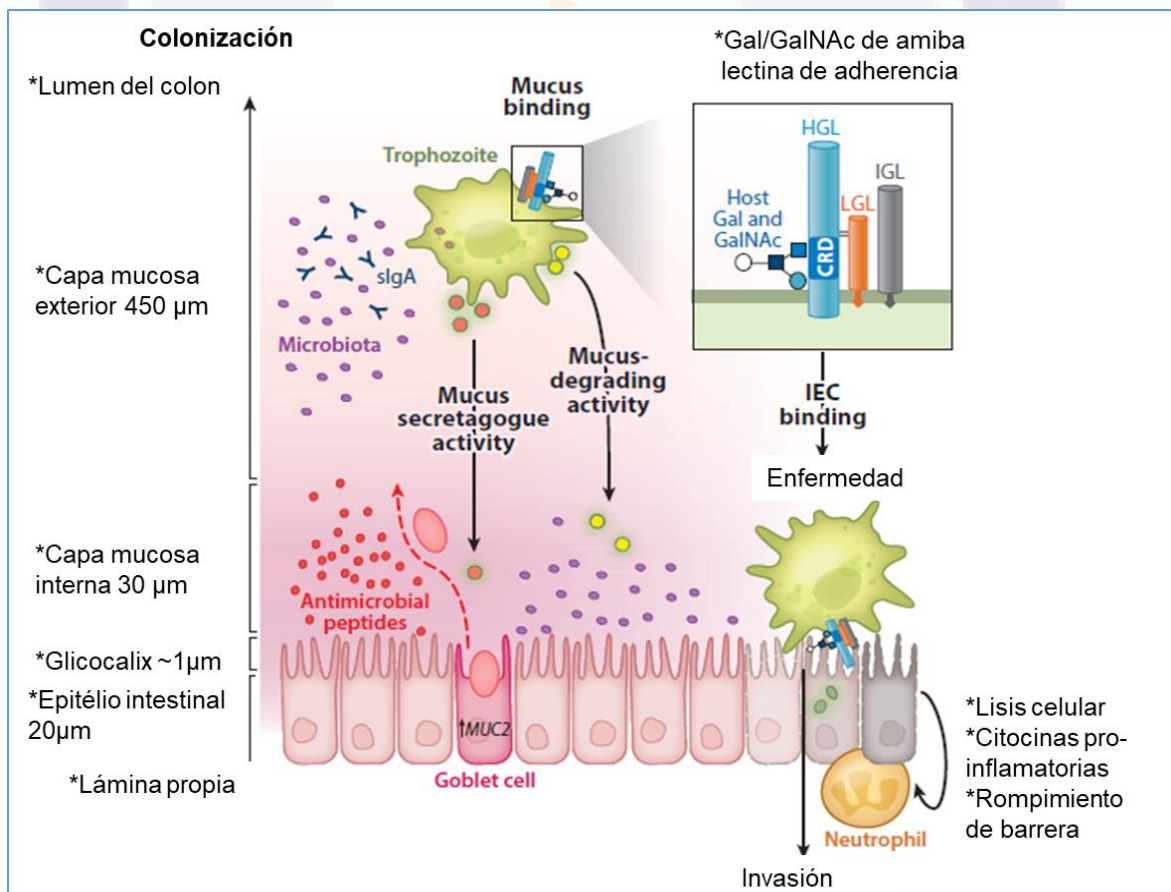


Figura 4.- Establecimiento dinámico de la unión y adherencia de *E. histolytica* a las células epiteliales del colon. Para establecer la infección, *E. histolytica* debe unirse y

adherirse al colon del huésped. La adherencia es mediada por una lectina amebiana Gal/GalNAc compuesta por subunidades pesadas (HGL), intermedias (IGL) y ligeras (LGL). Los trofozoítos también inducen la secreción de mucina por las células caliciformes; sin embargo, estos polímeros de mucina pueden ser degradados por las proteasas amebianas destruyendo así la barrera mucosa y permitiendo la colonización y con ello permitir la invasión del parásito (Marie and Petri 2014).

Existen otro tipo de lectinas llamadas tipo integrinas que participan en la migración (E.C. Martinez-Palomo, 1991) y otras como la lectina de 220 kDa que tiene afinidad principalmente por células inmunes y se caracteriza por su actividad inmunomoduladora (Bekker-Mendez *et al.* 2006); esta unión célula-células es el primer paso para iniciar la fagocitosis o la lisis de las células por mecanismos dependientes de contacto. La lisis de las células del hospedero se lleva a cabo por diversos factores entre los que se incluyen fosfolipasas amebianas, activación de caspasa 3, cisteín-proteasas, entre otras (Huston *et al.*, 2003).

Por otro lado, existen maneras indirectas de causar la lisis de las células del hospedero, una en la cual intervienen citolisinas leucocitarias resultantes de la lisis de leucocitos por el mecanismo anteriormente descrito y otra la presencia de amebaporos, los cuales son proteínas ubicadas dentro de vesículas citoplasmáticas, formadas por 4 hélices alfa, con 3 isoformas denominadas A, B y C. La isoforma C es la más activa, produciendo estructuras tipo canal que permiten el paso de iones, agua y moléculas pequeñas provocando cambios osmóticos a nivel de membrana celular de las células del huésped (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000; Petri, Haque, & Mann, 2002). En este caso, las células polimorfonucleares que constituyen la respuesta inicial del hospedero contra los trofozoítos son invariablemente destruidas por éstos y los productos de la lisis incrementan el daño a los tejidos (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000).

La amiba también secreta enzimas proteolíticas, entre las que se incluyen cisteín proteasas, las más abundantes en los trofozoítos; proteinasas de unión a

membrana, la amebapainina, la catepsina B; proteinasas ácidas; histolisinas, colagenasas y proteinasas neutras, muchas de las cuales están implicadas en la destrucción de la matriz extracelular, y ayudan a los trofozoítos a infiltrarse en los tejidos (Huston *et al.*, 2003).

Las cisteín proteasas de *E. histolytica* son consideradas como factores de virulencia muy importantes, ya que son enzimas con capacidad para digerir constituyentes de la matriz extracelular, tales como la fibronectina, laminina, colágeno tipo I y IV (Gómez *et al.*, 2007). Existen al menos 50 cisteín-proteasas, sin embargo, sólo EhCP2, EhCP1 y EhCP5 son responsables de aproximadamente el 90% de la actividad proteasa de este parásito, donde la de mayor importancia es la EhCP5 debido a que se ha sido descrito que la sobre-expresión de esta CP es capaz de compensar la patogenicidad de *E. histolytica* cuando han sido silenciados otros genes como los de amebaporos incluso incrementa la formación de AHA en hámster (Casados-Vázquez, Lara-González, and Brieba 2011; Tillack *et al.* 2006).

Existen diferentes moléculas de superficie que tienen gran importancia en las interacciones parásito-hospedero para la invasión de los tejidos, inducción de colitis y formación del absceso hepático. Estudios previos han permitido determinar la expresión de varios genes de EhCP durante la formación del absceso hepático amebiano en modelos animales. El incremento de cuatro genes (EhCP-A3, EhCP-A4, EhCP-A10, y EhCP-C13) fue detectado en modelos de ratón y hámster. Interesantemente, la sobreexpresión de tres de éstas CPs en cepas no patogénicas fue suficiente para conferirle patogenicidad (Matthiesen *et al.*, 2013).

En general estas enzimas: 1) rompen la capa de mucina en su dominio carboxiterminal, 2) degradan directamente la IgA y realizan disrupción de IgG, 3) confieren resistencia a la lisis mediada por el complemento, interrumpiendo la amplificación de la respuesta inmune a través de la degradación de las anafilotoxinas C3a, C5a (Que and Reed 2000). Finalmente los lipofosfoglucanos y lipopeptidofosfoglucanos son un complejo de macromoléculas encontradas en la

superficie de los trofozoítos, tienen la capacidad de interactuar con células dendríticas y macrófagos permitiendo activar la respuesta inmune del huésped (Vivanco-Cid *et al.*, 2007).

1.5 Respuesta inmune

Durante la respuesta inmune se da una serie de interacciones entre los mecanismos de defensa del huésped, para expulsar el patógeno, y las estrategias desarrolladas por el parásito para modular la respuesta del huésped y favorecer su supervivencia. Luego de la ingesta del parásito, la inmunidad innata o los mecanismos inespecíficos quizá desempeñen un papel esencial en la defensa frente a la infección y la diseminación de *E. histolytica*, como el ácido estomacal o la liberación de mucina, que constituyen las primeras barreras de defensa contra la invasión amebiana (Stuart and Ezekowitz 2005; Tse and Chadee 1992), ya que previene que los trofozoítos se pongan en contacto con la capa de células epiteliales del intestino (Fig. 5) (Moonah, Jiang, and Petri 2013).

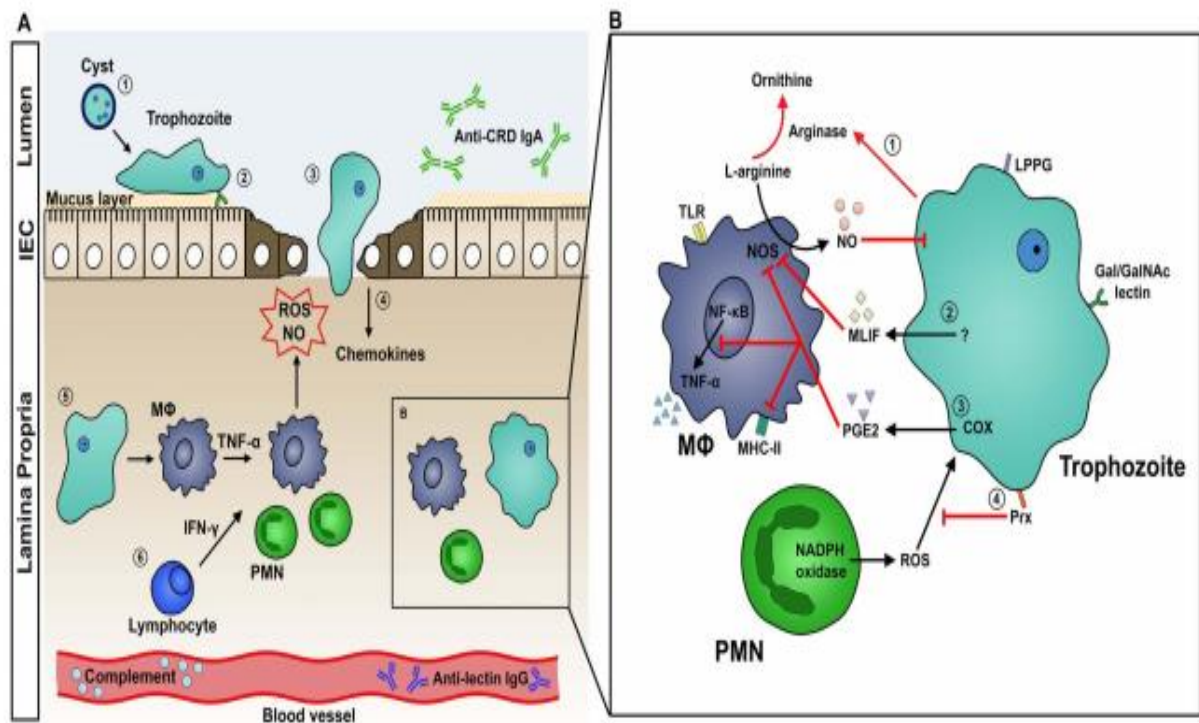


Figura 5. A. Respuesta inmune del huésped a la amebiasis intestinal. B. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Interacción dinámica del parásito con el hospedero y su importancia en la patogénesis de la amebiasis.

Las barreras naturales, además de actuar aislando al individuo del exterior, también cuentan con función bactericida y promotora de la inflamación. La mucina el principal constituyente de la capa mucosa del intestino (Fig. 5), es una glicoproteína secretada por las células Goblet y glándulas submucosas; este componente se une y evita la adherencia de la Lectina Gal/GalNac del parásito a las células del epitelio intestinal (Chadee *et al.*, 1987).

El intestino humano del hospedero tiene aproximadamente 100 trillones de microorganismos, principalmente bacterias, que forman la microbiota regulando la homeostasis y promoviendo la salud digestiva, así como estimulan el balance del sistema inmune (Sabeti *et al.*, 2006). Respecto a las interacciones entre la flora bacteriana residente en el intestino y *E. histolytica*, se ha señalado que pueden ser factores decisivos para la defensa del huésped, o la virulencia del parásito. En efecto, algunos estudios han demostrado que los trofozoítos aumentan su virulencia en respuesta a su asociación con bacterias (Anaya-Velázquez & Padilla-Vaca, 1992; Bhattacharya *et al.*, 1998). Mientras que otros reportan la reducción de la virulencia del trofozoíto, y sugieren que esta reducción puede estar asociada con una disminución de la lectina Gal/GalNac (Padilla-Vaca, Koole, & Mirelman, 1999). Estudios han mostrado claramente que la microbiota colónica tiene un papel importante para la formación de la primera línea de defensa innata del huésped contra *E. histolytica*, independiente de la capa mucosa Muc2 que es la mucina principalmente secretada en el tracto gastrointestinal (Leon-Coria *et al.*, 2018).

Cuando *E. histolytica* sobrepasa la defensa innata del hospedero y entra en contacto con las células epiteliales del intestino, se producen una variedad de mediadores pro-inflamatorios (citocinas y quimiocinas), como IL-1 β , IL-8 y TNF- α , iniciando una inflamación aguda. La IL-8 se expresa en las células intestinales,

producto de la inducción de la respuesta Th1 y la producción de interferón gama (IFN- γ) (Seydel *et al.*, 1998). Varios de estos mediadores tienen como objeto el reclutamiento de células incluyendo neutrófilos y macrófagos al sitio de la invasión (Yu and Chadee 1997). Los macrófagos activados con citocinas tales como IFN- γ o TNF- α eliminan trofozoítos *in vitro* por la producción de óxido nítrico a partir de L-arginina mediado por la inducción de la óxido nítrico sintasa (Fig. 5B) (Lin *et al.*, 1994). Ratones deficientes de iNOS son más vulnerables a presentar absceso hepático amebiano y apoptosis de hepatocitos (Seydel, Smith, and Stanley 2000). De las dos citocinas mencionadas, el IFN- γ es la principal citocina que activa neutrófilos y macrófagos para iniciar su actividad amebicida.

El sistema de complemento es una barrera del sistema inmune; algunos estudios han demostrado que los trofozoítos responden a esta defensa activando la vía clásica y alterna del complemento en la ausencia de anticuerpos antiamebianos a través de la cisteína proteasas de 56 kDa. Por otra parte, la lectina Gal/ GalNac inhibe a su vez el ensamble de C8 y C9 en el complejo de ataque a la membrana, impidiendo la lisis del parásito mediada por el complemento (Reed *et al.*, 1986). Otro grupo de trabajo (Ventura-Juárez *et al.* 2009) demostró la presencia de moléculas similares a CD59 (inhibidor del MAC), en trofozoítos de *E. histolytica* encontradas en lesiones de colitis amebiana y en lisados del parásito por medio de un anticuerpo monoconal anti CD59 humano, sugiriendo que *E. histolytica* utiliza esta proteína similar a CD59 en contra de la acción lítica del complejo de ataque a membrana (Flores-Romo *et al.*, 1994).

El modelo experimental de amibiasis en hámster ha mostrado que la etapa temprana de la infección se caracteriza por una infiltración predominante de los neutrófilos. Esta activación conlleva a la liberación de especies reactivas de oxígeno y péptidos antimicrobianos. Al igual que los neutrófilos, los macrófagos adquieren actividad amebicida después de ser estimulados con IFN- γ (Salata, Pearson, and Ravdin 1985; Sim *et al.* 2005). Además se demostró que el componente de membrana de *E. histolytica*, lipopéptidofosfolipiano induce a los neutrófilos a la

formación de trampas extracelulares (NETs) como un mecanismo de respuesta inmune innata temprana en contra del parásito (Ávila *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que diversos componentes de la superficie de los trofozoítos son reconocidos por los macrófagos a través de los receptores tipo Toll, los TLR-2 y TLR-4 (Ghadirian and Denis 1992). El contacto directo con macrófagos humanos activados y con linfocitos T citotóxicos implica un efecto letal significativo sobre *E. histolytica* (Salata *et al.*, 1986). La actividad citotóxica de los macrófagos es atribuida a la producción del óxido nítrico a partir de L-arginina y que es capaz de inhibir las CP y la enzima alcohol deshidrogenasa 2 del parásito. La modulación de esta respuesta, por parte de la amiba, ha sido suprimir el estallido respiratorio en macrófagos y disminuir los niveles de NO, TNF e IFN- γ (Elnekave, Siman-Tov, and Ankri 2003; Wang, Keller, and Chadee 1994).

Por parte de la respuesta humoral del huésped, aproximadamente 81-100% de los pacientes con amibiasis invasiva responden desarrollando anticuerpos específicos contra la lectina Gal/GalNac. Además se observó que la respuesta de la IgA de mucosas está vinculada a la protección contra la infección (Haque *et al.*, 2001).

Los eventos que marcan la progresión de la amebiasis invasiva a nivel intestinal y extraintestinal (hígado) están bien caracterizados en pacientes y en modelos animales a nivel de tejido (Fig. 6). Sin embargo, nuestro entendimiento de los mecanismos inmunes que median la relación huésped-parásito está incompleta (Mortimer and Chadee 2010).

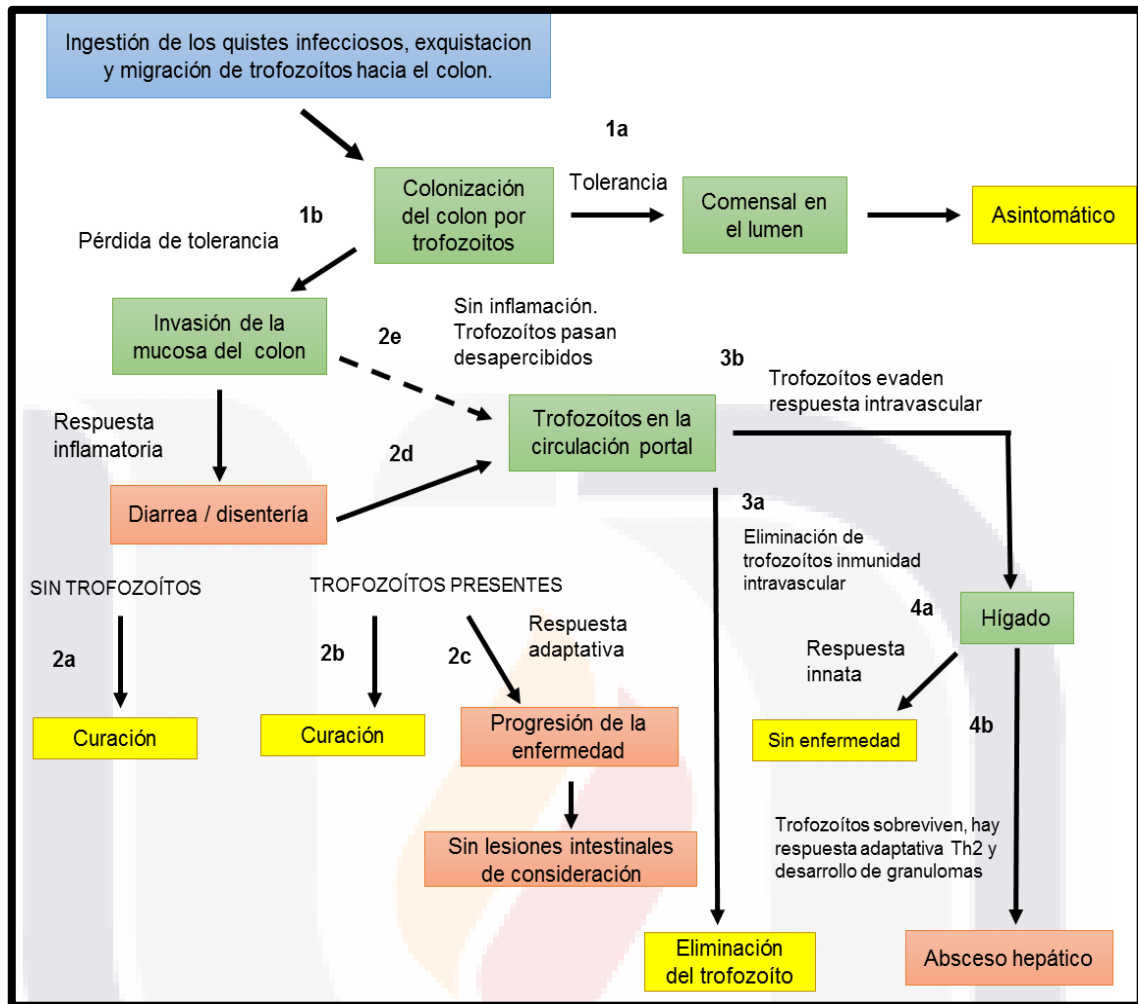


Figura 6. Inmunidad del hospedero y patología durante la infección por *E. histolytica*.

Los eventos en la progresión de la amebiasis invasiva desde intestinal hasta extra-intestinal (hígado), inicio de la infección (azul), progresión y movimiento de los trofozoítos a los tejidos para su invasión (verde), eliminación del parásito/asintomático (amarillo), enfermedad (rosa) (Mortimer and Chadee 2010).

1.6 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune.

Los estudios sobre la relación huésped-parásito han establecido que la *E. histolytica* ha desarrollado estrategias para escapar de la respuesta inmune del huésped (García-Nieto *et al.*, 2008; Talamás-Rohana *et al.*, 1995; Wang and Chadee 1995). Este fenómeno se conoce como una selección natural positiva, promoviendo el aumento en la prevalencia de rasgos ventajosos, y ha desempeñado un papel

central en el desarrollo de *E. histolytica* como un parásito humano (Sabeti *et al.*, 2006). Por otro lado, podría tomarse como una coevolución a nivel bioquímico, y se define como el proceso de cambio genético recíproco y adaptativo entre las especies que interactúan (Woolhouse *et al.*, 2002).

Durante la amebiasis hay una respuesta mixta Th1 / Th2 con una polarización hacia Th2 durante la etapa temprana (Rafiei *et al.* 2009). Una vez que *E. histolytica* evade la respuesta inmune, desarrolla estrategias para producir daño por medio de factores de virulencia. Estos factores de virulencia actúan en diferentes etapas del proceso de invasión, como la adhesión (Welter, Goldston, and Temesvari 2011), la citólisis de las células inmunes (Andrä, Berninghausen, and Leippe 2004), la degradación de inmunoglobulinas como la IgA (Garcia-Nieto *et al.*, 2008; Lidell *et al.*, 2006) y destrucción tisular (Betanzos *et al.*, 2013). Después de que *E. histolytica* ha inducido la lisis de la capa epitelial (Zhang *et al.*, 2004), estas células comienzan a producir IL-8, un quimioatrayente para los neutrófilos (Dey and Chadee 2008) y para la ameba (Diaz-Valencia, *et al.*, 2015). Además, los macrófagos estimulados por la galactosa-lectina de *E. histolytica* producen el factor de necrosis tumoral alfa, implicado en el reclutamiento y la activación de neutrófilos. Estos neutrófilos activados potencian su expresión génica y producen óxido nítrico sintasa inducible y, posteriormente, producción de óxido nítrico (Peterson *et al.*, 2010; Séguin *et al.*, 1997), que destruirá los trofozoítos.

La capacidad de los trofozoítos de *E. histolytica* para sobrevivir en el huésped humano se ha relacionado en parte con la notable movilidad de los antígenos de superficie después de la interacción con anticuerpos, por lo tanto, los complejos antígeno-anticuerpo resultantes se eliminan mediante el fenómeno de encapsulación (Chávez-Munguía *et al.*, 2012). Los trofozoítos de *E. histolytica* pueden protegerse de las especies de oxígeno reactivo (ROS) producidas por los neutrófilos con la peroxirredoxina, una proteína de superficie de 29 kDa, que posee una potente actividad antioxidante (Davis *et al.*, 2006). Los estudios han demostrado que *E. histolytica* puede inducir la apoptosis de neutrófilos a través de la activación

de ERK1 / 2 por la generación de ROS derivada de la actividad NADPH oxidasa (Sim *et al.*, 2005).

Otros factores de patogenicidad incluyen la presencia de una proteína similar a CD59 expresada en la membrana de los trofozoítos de *E. histolytica*, que impide la polimerización de la proteína del complemento C9 (Ventura-Juárez *et al.*, 2009). *E. histolytica* también expresa una proteína de 55 kDa, similar a la de los bucles extracelulares de la ocludina humana, que le permite unirse a las células epiteliales del intestino (Goplen *et al.*, 2013). Además, a través de un análisis bioinformático, dos proteínas, una GTPasa de la familia Rab y una tioredoxina en la que se ha identificado la presencia de un dominio TIR similar al receptor de IL-1 y los TLR humanos (Mancilla-Herrera *et al.*, 2012). Los informes también han demostrado que los trofozoítos de *E. histolytica* captan a la citocina inflamatoria IL-8, a través de una proteína amebiana de 29 kDa asociada a la membrana, desencadenando la quimiotaxis del parásito hacia la fuente de IL-8. Sería un factor importante para ayudar a la llegada de los trofozoítos a una zona inflamatoria en el huésped, en la que el daño celular podría facilitar la invasión del parásito por los tejidos (Diaz-Valencia *et al.*, 2015). Los ensayos de quimiotaxis *in vitro*, utilizando gradientes de TNF, han demostrado que los trofozoítos se atraen hacia esta citocina (Blazquez *et al.*, 2006). Se ha demostrado que el IFN- γ se puede fijar en la superficie del parásito mediante mecanismos desconocidos y reduce la síntesis de proteínas y ADN en trofozoítos cultivados de *E. histolytica* (Castellanos, Ramos, and Ortiz-Ortiz 1989).

Más recientemente, se ha demostrado que los trofozoítos en el tejido colónico de pacientes con colitis amebiana fulminante son altamente positivos para IFN- γ (Sierra-Puente *et al.*, 2009b). En este estudio, se demuestra la unión del IFN- γ a una proteína similar al receptor de interferón- γ en *E. histolytica*, como parte de un mecanismo a través del cual los trofozoítos muestran una regulación positiva en sus factores de virulencia incrementando la fagocitosis, el efecto citopático en células de colon e hígado y en la formación del absceso hepático en hámster.

1.7 IFN- γ

La producción de Interferón Gamma (IFN- γ) también llamado interferón inmunitario o de tipo II, es inducida por patógenos, por el entrecruzamiento de moléculas de superficie, por antígenos específicos, activando el receptor de células T o células NK en respuesta a un estímulo inmune o inflamatorio. El IFN- γ no comparte receptores como los interferones de tipo I y su estructura proteica es distinta (Pestka, Krause, and Walter 2004).

En el sistema inmunológico el IFN- γ es la principal citocina que estimula la actividad citotóxica y fagocítica de macrófagos e induce la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC II) en células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno. El IFN- γ también incrementa el desarrollo y diferenciación de células T cooperadoras 1. Debido a esto, el IFN- γ tiene un papel clave en el control de infecciones bacterianas, fúngicas, virales y parasitarias. Además, posee un papel dual, es pro y anti-inflamatorio, lo cual lo convierte en una proteína singular debido a que su comportamiento depende del medio en el que se encuentre (Mata-Espinosa and Hernández-Pando 2008).

La actividad biológica del IFN- γ es mediada por un receptor específico, este receptor de IFN- γ se expresa en todas las células con excepción de los eritrocitos maduros y es específico en la capacidad de unión a su ligando. El IFN- γ potencia la transcripción de varios genes involucrados en actividades inmunomoduladoras, antivirales y antiproliferativas (apoptosis) (Bach *et al.*, 1997).

1.8 Receptor a IFN- γ

El receptor funcional de IFN- γ (Fig. 7) está constituido por dos proteínas R1IFN- γ (cadena de 90 kDa, denominada cadena α , cadena de unión al ligando o CD119W) y dos proteínas de R2IFN- γ (cadena de 60 kDa, denominada cadena β cadena de transducción de señales o factor accesorio-1). La porción extracelular de R1IFN- γ contiene el dominio de unión al ligando y la porción intracelular contiene los

dominios necesarios para la transducción de señales y el reciclamiento del receptor. La porción extracelular de R2IFN- γ interacciona con el complejo R1IFN- γ /IFN- γ y la porción intracelular es necesaria para la transducción de señales (Bach, Aguet, and Schreiber 1997).

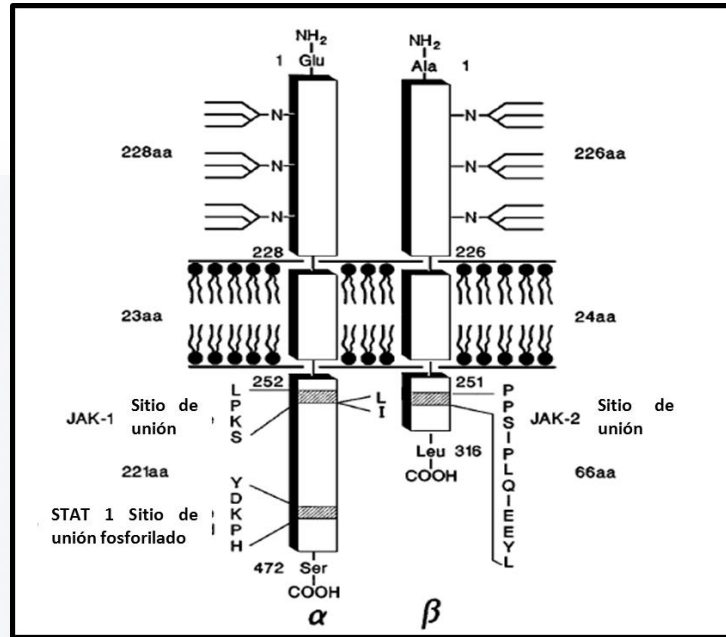


Figura 7.- Receptor α IFN- γ . El receptor α IFN- γ consiste en dos especies de polipéptidos. La cadena α del receptor α IFN- γ es requerida para la unión al ligando y la señalización. La cadena β del receptor es requerida esencialmente para la señalización y solo juega un rol menor en la unión del ligando. El dominio intracelular del receptor, posee dos secuencias de importancia funcional: (1) una secuencia LPKS requerida para la asociación con la tirosina cinasa Jak 1, y (2) una secuencia YDKPH que cuando se fosforila forma un sitio de unión latente para Stat 1. Además, contiene dos secuencias box1/box2 requeridas para la asociación de Jak 2 (Bach, Aguet, and Schreiber 1997).

El ligando IFN- γ es un homodímero que se une a las dos cadenas R1IFN- γ , facilitando la unión de las dos proteínas del R2IFN- γ al complejo R1IFN- γ /IFN- γ . Este evento permite que los dominios intracelulares de los receptores se aproximen induciendo la asociación de las JAK cinasas (tirosinas cinasas de la familia de las cinasas Janus). La unión del ligando resulta en una transfosforilación de las JAK cinasas y la subsecuente fosforilación de la tirosina 440 de R1IFN- γ . A través de su

dominio SH2, una STAT1 (transductores de señales y activadores de la transcripción) reconoce y une cada sitio de tirosina fosforilada del R1IFN- γ . El receptor R1IFN- γ asociado a STAT1 se fosforila en tirosina y se activa, se forman homodímeros de STAT1 que se translocan al núcleo donde se unen a secuencias de activación, presente en los promotores de los genes estimulados por IFN- γ (Fig. 8). Después de la señalización, las cadenas de unión se internan y se disocian. Las cadenas son recicladas a la superficie celular (Maher *et al.*, 2007).



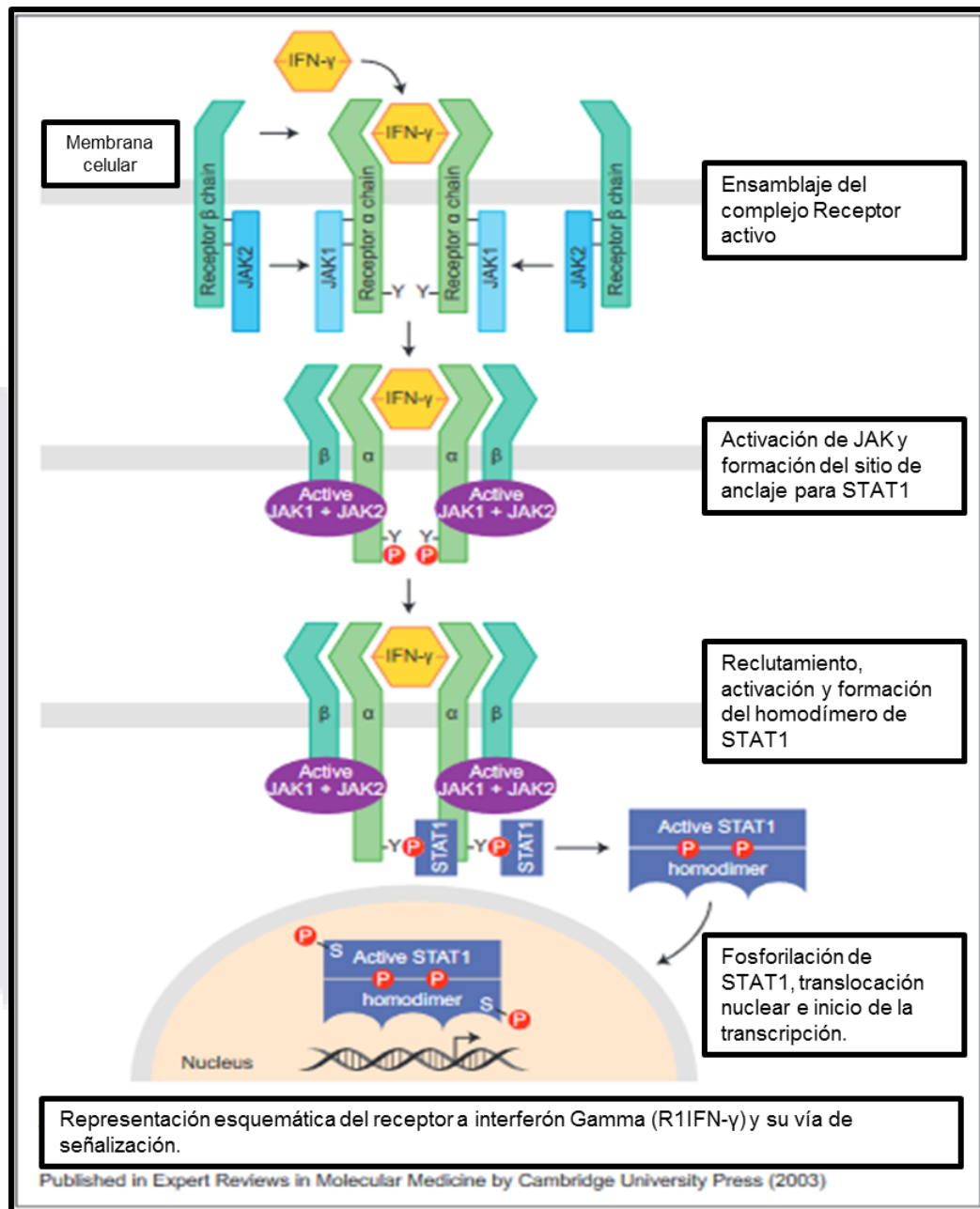


Figura 8. Representación esquemática del receptor de interferón-γ (IFN- γ) y su vía de señalización. El receptor a IFN-γ posee dos subunidades: R1 (cadena α) y R2 (cadena β). Al interactuar el IFN-γ con la cadena de unión, se asocia a dos cadenas de transducción de señales, conduciendo a la activación de JAK1 y JAK2, y a la fosforilación de un residuo de tirosina en el dominio intracelular del IFN-γ R1. Esto a su vez permite el reclutamiento y la fosforilación de STAT1, el cual forma homodímeros que se translocan al núcleo para activar una amplia variedad de genes de respuesta al IFN-γ (Modificado de Melanie Newport Cambridge Institute., 2003).

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia del IFN- γ en la respuesta inmune a *E. histolytica*

En trabajos anteriores se ha demostrado la participación de la inmunidad mediada por células durante la infección por *E. histolytica in vivo* e *in vitro* (Ortiz y Avella, 1984). Esto, a través de la influencia de los mediadores solubles o linfocinas, que en la actualidad conocemos como citocinas; Castellanos y colaboradores (1989) realizaron un estudio en el cual examinaron el efecto de citocinas, particularmente el IFN- γ el cual ha sido implicado en el mecanismo de resistencia a otros parásitos; donde observaron un efecto inhibitorio sobre la síntesis de ADN y proteínas por *E. histolytica*; otro hallazgo interesante en este trabajo fue la observación de que los trofozoítos eran capaces de interactuar con el IFN- γ . Esta observación dio lugar debido a que ante la presencia del IFN- γ , el crecimiento del virus de estomatitis vesicular es inhibida, y que al agregar trofozoítos de *E. histolytica* al medio donde está presente el virus y IFN- γ , se observó el crecimiento de este virus; mostrando que los trofozoítos de *E. histolytica* de alguna manera, eran capaces de absorber IFN- γ de ambos, sobrenadantes ricos en citocinas e IFN- γ recombinante (Castellanos, Ramos, and Ortiz-Ortiz 1989).

En 1997 se encontró que el TNF- α por sí solo no induce a los macrófagos a la producción de óxido nítrico en contra de *E. histolytica*; sin embargo, en combinación con concentraciones crecientes de IFN- γ la actividad amebicida de macrófagos y la producción de NO aumentaron progresivamente (Séguin *et al.*, 1997).

El grupo de Haque y colaboradores (2007) probaron la capacidad de células mononucleares de sangre periférica para producir IFN- γ en respuesta al antígeno amebiano en niños de la comunidad de Dhaka, Bangladesh, observando que aquellos niños con mayor producción de IFN- γ tenían mayor probabilidad de sobrevivencia y presentaron una reducción en la susceptibilidad a amebiasis sintomática.

Guo y colaboradores (2008) estudiaron los mecanismos por los cuales ciertas cepas de ratones desarrollan una infección persistente con *E. histolytica*; observando que la infección intracecal llevó al rápido incremento del perfil Th2, suprimiendo a su vez el perfil Th1 por lo tanto las citocinas IL-12 e IFN- γ se vieron suprimidas, evitando con ello la activación de los macrófagos y neutrófilos para la eliminación del parásito. Mediante inmunohistoquímica se determinó la expresión de IL-4, IL-8, IL-10, TGF- β e IFN- γ en muestras de colon de pacientes con colitis amebiana fulminante; encontrando que el IFN- γ no se expresó en células inflamatorias, sin embargo, interesantemente se detectó por medio del anticuerpo anti-IFN- γ en la mayoría de los trofozoítos localizados en las zonas de daño. En relación a esta positividad de los trofozoítos al anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ , los autores mencionan que quizá sea debido a una reacción cruzada con alguna molécula desconocida de la ameba (Sierra-Puente et al. 2009).

2.2 Nuevos Factores de Patogenicidad

Hasta ahora se han descrito diferentes mecanismos que *E. histolytica* utiliza para causar daño al hospedero, algunos muy conocidos como sus diferentes adhesinas, diferentes proteasas de cisteína, proteínas amebaporos, fosfolipasas, neuraminidasas, entre otros (Petri and Schnaar 1995; Espinosa-Cantellano and Martínez-Palomo 2000; Bekker-Mendez et al., 2006; Matthiesen et al., 2013) y otros que se han descrito recientemente en donde se han encontrado, en éste parásito, proteínas similares a las propias del hombre, como se describe a continuación.

Ventura-Juárez y colaboradores (2009) reportaron la presencia de una proteína similar a CD59 expresada en la membrana de los trofozoítos de *E. histolytica* en lesiones por amebiasis en colon, esto por medio del uso de anticuerpos monoclonales contra la molécula CD59 humana. Se sabe que CD59 es una molécula que previene la polimerización de la proteína C9 durante la fase final de la formación del complejo de ataque a membrana (MAC), impidiendo su unión a

C5-8. Por lo tanto, la proteína tipo CD59 en la superficie de los trofozoítos que invaden el colon humano probablemente es un importante mecanismo de protección contra la acción de MAC y por lo tanto un mecanismo de patogenicidad.

Uno de los puntos más importantes para la invasión de este parásito es la unión a las células epiteliales del intestino, con base a esto, se documentó que *E. histolytica* expresa una proteína de 55 kDa semejante a uno de los bucles extracelulares de la ocludina humana, por medio de un anticuerpo monoclonal anti-occludina humano (Goplen *et al.*, 2013).

A través de un análisis bioinformático se sugirió que *E. histolytica* posee dos proteínas en las cuales se detecta la presencia de un dominio tipo TIR, que son, una GTPasa de la familia Rab y la tiorredoxina, determinando, que esta última proteína juega un papel importante en los mecanismos de fagocitosis como reguladores negativos de este proceso, ya que por medio del silenciamiento del transcrito de la tiorredoxina con pequeños RNA de interferencia (siRNA) observaron un decremento en la eritrofagocitosis y fagocitosis de *E. coli* (Mancilla-Herrera *et al.*, 2012).

En un trabajo reciente se identificó en bacterias un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta inmune, que involucra proteínas bacterianas con un dominio TIR. Los dominios individuales de diferentes bacterias patógenas como *Salmonella enterica*, *E. coli* y *Yersinia pestis* han sido analizados en detalle, observando que difieren en sus modos de acción y sus roles en su virulencia (Rana R. *et al.*, 2013).

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una citocina pro-inflamatoria, la cual se ha demostrado que participa en el proceso inflamatorio durante la invasión amebiana. Un grupo de trabajo demostró que esta citocina promueve un efecto quimiotáctico en *E. histolytica* y que además activa una vía de señalización en los trofozoítos dependiente de PI3K permitiendo así la reorganización del citoesqueleto y la

migración del parásito hacia el sitio de mayor concentración de TNF (Blazquez *et al.*, 2006).

Díaz-Valencia y colaboradores reportaron en 2015 que la IL-8 se une a la membrana de los trofozoítos de *E. histolytica*, provocando una respuesta que activa vías de señalización las cuales regulan la organización del citoesqueleto de actina/miosina iniciando la migración hacia el sitio donde se encuentra la quimiocina. El anticuerpo anti receptor a IL-8 (CXCR1) reconoció específicamente una proteína de 29 kDa en la fracción membrana de trofozoítos de *E. histolytica*. Esta proteína se inmunoprecipitó con el mismo anticuerpo; un análisis de péptidos reveló una secuencia homologa a un motivo de CXCR1 la cual es un sitio importante para la unión de IL-8, sugiriendo la presencia de un receptor para IL-8 en el parásito.

2. JUSTIFICACIÓN

Entamoeba histolytica es un parásito causal de la amebiasis, una enfermedad intestinal que infecta alrededor de 50 millones personas a nivel mundial. Aunque únicamente el 10% de las personas infectadas muestran síntomas desde molestias leves hasta lesiones graves como colitis amebiana fulminante y enfermedades extraintestinales como el absceso hepático amebiano (AHA), las cuales pueden llegar a causar la muerte.

Se ha descrito la participación de la inmunidad mediada por células y citocinas en respuesta a diversos factores de patogenicidad descritos en el parásito para su eliminación. Los macrófagos poseen un papel muy importante en respuesta a la amebiasis, viéndose potenciada su actividad amebicida bajo la acción del IFN- γ . Existen reportes de que el IFN- γ producido durante la infección no es detectado en las células del sistema inmune, sin embargo, si se localiza en los trofozoítos presentes en la lesión. Sierra-Puente y colaboradores en 2009 encontraron también en muestras de colon humano con colitis amebiana fulminante que los trofozoítos eran positivas a IFN- γ mediante el uso de técnicas de inmunohistoquímica.

Con base a la evidencia de que *E. histolytica* disminuye los niveles de IFN- γ en el huésped la cual es una citocina protectora, y los reportes de la presencia de proteínas semejantes a proteínas humanas; es de interés para nosotros observar la capacidad posible para fijar IFN- γ mediante el estudio la proteína hipotética similar al receptor 1 IFN- γ humano, su papel como posible factor de patogenicidad y su relación con la posible modulación de la respuesta del hospedero.

4. HIPÓTESIS

Entamoeba histolytica posee una proteína hipotética semejante al receptor 1 a IFN- γ humano, cuya función sea fijar IFN- γ . Esta proteína podría estar participando como mecanismo de virulencia de *E. histolytica* en la interacción con el hospedero.



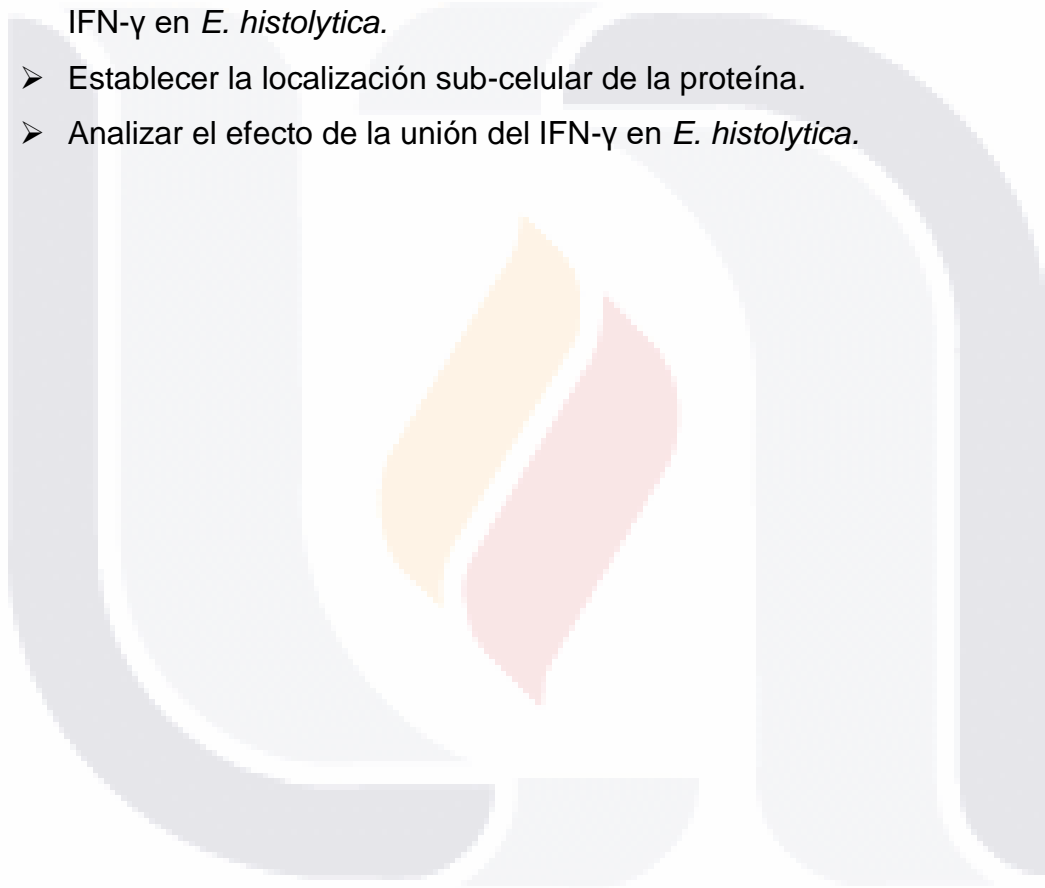
5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

- Identificación de una proteína hipotética semejante al receptor 1 IFN- γ humano en *E. histolytica*.

5.2 Objetivos específicos:

- Establecer la identidad de una proteína con posible actividad de receptor a IFN- γ en *E. histolytica*.
- Establecer la localización sub-celular de la proteína.
- Analizar el efecto de la unión del IFN- γ en *E. histolytica*.



6. METODOLOGÍA

6.1 Cultivo de *E. histolytica*

E. histolytica HM-1:IMSS se cultivó axénicamente en medio TYI-S-33 que contenía un 10% de suero bovino suplementado con penicilina (100 U / mL), estreptomina (100 mg / mL) y 10% de suero bovino adulto inactivado por calor. como ya se ha descrito (Diamond, Harlow, and Cunnick 1978). Para mantener la virulencia, los trofozoitos se pasaron regularmente a través de hígados de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) como se describe (Tsutsumi *et al.*, 1984). Los trofozoitos se recogieron en la fase logarítmica de crecimiento (48–72 h) enfriando los tubos de cultivo en hielo y centrifugando la suspensión celular a 300 xg durante 15 min. Los trofozoitos recuperados se suspendieron en medio de cultivo sin suero, pH 7.2, para los ensayos.

6.2 Detección por inmunofluorescencia de IFN- γ y de la proteína similar al receptor a IFN- γ R1

Para la inmunofluorescencia, se cultivaron trofozoitos de *E. histolytica* o de *E. dispar* (2×10^5) en cubreobjetos en una placa de Petri con medio TYI-S-33 durante 15 minutos a 37°C. Los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS y se añadieron medios suplementados con IFN- γ (100 ng / ml; Peprotech, Rocky Hill, NJ, EE. UU.), y se incubaron durante 20, 60 y 180 minutos a 37 °C. Los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS, y los trofozoitos se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y los sitios reactivos libres se bloquearon con suero bovino fetal al 10% en PBS durante 1 hora a 37°C. Las preparaciones se incubaron con anticuerpos primarios (Tabla 1) durante toda la noche a 4 °C. Después de tres lavados con PBS, se incubaron con los anticuerpos secundarios Tabla 1 durante la noche a 4 °C. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (1 μ g/ml) (Thermo Fisher Scientific) en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.) y se analizaron en un microscopio

LMS700 (Zeiss). Las imágenes se procesaron con un software ZEN 2009 Light Edition (Zeiss). Para cuantificar la co-localización, se analizaron en z-stacks de 1 µm de células completas o un área alrededor de la membrana plasmática según la metodología de Costes que incluye la eliminación de la autofluorescencia con el complemento Coloc2 del software de Fiji (ImageJ). El gráfico se realizó con el software GraphPad Prism 7 (Schneider, Rasband, and Eliceiri 2012).

Tabla 1. Anticuerpos usados en inmunofluorescencia:

	Anticuerpo	Datos
PRIMARIOS	anti-IFN-γ	(1:100, Preprotech Cat # 500-P32)
	anti-IFN-γR1	(1:100, Thermo Fisher Scientific, Cat# MA5-16583)
SECUNDARIOS	Alexa-Fluor 594 cabra anti IgG-ratón (H + L)	(1:1000, Thermo Fisher Scientific, Cat#A11005)
	Alexa Fluor 488 cabra anti IgG-conejo (H + L)	(1:1000, Thermo Fisher Scientific, Cat#A11008)

6.3 Análisis Western Blot para la detección de una proteína similar al Receptor 1 de IFN-γ en *E. histolytica*

Para analizar la presencia de IFN-γ en la superficie celular, se cultivaron 1×10^6 trofozoítos en presencia o ausencia de 100 ng/ml de IFN-γ (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EE. UU.) durante 20 minutos a 37 °C. A continuación, se realizó una extracción total de proteínas (ver Apéndice C). Los sobrenadantes y sedimentos correspondieron a las fracciones citosólica y de membrana, respectivamente, se suspendieron en 200 µl de tampón de lisis y Triton X-100 al 1%. La cuantificación de proteínas se realizó con el método de Bradford (Bradford, 1976) ver Apéndice D. Para la electroforesis, se separaron 50 µg de cada extracto de proteína en un gel de SDS-PAGE al 10%, ver Apéndice E y las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.), ver Apéndice F. La membrana se bloqueó con TBST (solución salina tamponada con Tris/Tween-20 al 0,05%) y leche desnatada al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la inmunodetección del IFN-γ fijado en la membrana de *E. histolytica* y el posible

receptor, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario, Tabla 2. Las transferencias se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario Tabla 2 conjugado durante 1 hora a 37°C. Después de tres lavados con PBS, la transferencia se desarrolló mediante quimioluminiscencia con el sustrato ECL Clarity Western (Bio-Rad, Hercules CA, EE. UU.). Para la membrana que se reveló con el anticuerpo anti-IFN- γ R1 se identificó una banda de 200 kDa en *E. histolytica* la cual se analizó mediante espectrometría de masas (MS) para identificarla y determinar mediante análisis *in silico* su similitud con el receptor a IFN- γ humano (University Laboratory of Proteomics IBT / UNAM México). Como control positivo para el IFN- γ R1 se utilizó un extracto de membrana de linfocitos. La purificación de la proteína *E. histolytica* se realizó en base a la metodología de Talamás-Rohana *et al.*, 1995.

Tabla 2. Anticuerpos usados en inmunodetección por Westn Blot:

	Anticuerpo	Datos
PRIMARIOS	anti-IFN- γ R1	(1:1000, Thermo Fisher Scientific, Cat# MA5-16583)
	Anti-lectina 220 kDa	1:1000 (Talamás-Rohana <i>et al.</i> , 95)
	anti-IFN- γ	(1:1000, Preprotech Cat # 500-P32)
SECUNDARIOS	Cabra anti-ratón IgG conjugado	(1:5000 Millipore, Burlington, Massachusetts, USA.)
	Cabra anti-conejo IgG conjugado	(1:2000, Sigma Aldrich)

6.4 Espectrometría de masas

Las muestras se redujeron con ditiotreitól (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), Se alquilaron con yodoacetamida (Sigma-Aldrich) y se digirieron "en gel" con Glu C (Sequencing Grade Roche, número de catálogo 11047817001). En la digestión de la muestra, se utilizó una solución que contenía bicarbonato de amonio 25 mM con incubación durante 18 horas a una temperatura de 25 ° C. Los péptidos producidos por escisión enzimática se desalaron con Zip Tip C18 (Millipore, Billerica, MA, EE.

UU.) Y se aplicaron en un sistema LC-MS (Cromatografía líquida-Espectrometría de masas) compuesto por una bomba ACCELA (Thermo-Fisher Co., CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San José, CA, EE. UU.) Con una fuente de ionización de tipo nanoelectrospray (ESI). En la cromatografía líquida de nano fluidos en línea, se usó un sistema de gradiente de 2-85% de disolvente B (acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico) con un tiempo de ejecución de 120 minutos usando una columna capilar RP-C18 hecha en casa (0,75 μm de diámetro interno y 20 cm de largo). El flujo del sistema fue de 300 nanolitros / minuto. La exploración iónica total (Exploración completa) se realizó en el analizador Orbitrap con una potencia de resolución de masas (Resolución de potencia, $RP = m / \text{FWHM}$) de 60,000. Para la fragmentación de los péptidos, se aplicaron los métodos CID (Disociación Inducida por Colisión) y HCD (Disociación de Colisión de Alta Energía) con un poder de resolución de masa (Resolución de Potencia; $RP = m / \text{FWHM}$) de 15,000. Estos dos tipos de fragmentaciones se utilizan ya que en combinación proporcionan más información sobre el péptido. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positiva. La ejecución y captura de los datos de fragmentación se realizaron de una manera dependiente de la exploración total de iones según las cargas predeterminadas (los iones se rompieron con la carga $z2+$, $z3+$ y $z4+$) con un ancho de aislamiento de 2.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación de Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo de inyección máximo de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos, se utilizó la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de preexclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 90 segundos. La identificación de proteínas se realizó con los datos espectrométricos en formato sin procesar en el programa Proteome Discoverer 1.4 (Thermo-Fisher Co., San José, CA, EE. UU.) Mediante el motor de búsqueda Sequest HT. Para buscar la identidad, se utilizó la base de datos de proteínas *E. histolytica* descargada de uniprot. Utilizamos una tasa de descubrimiento falso FDR (Mínimo) de 0.01 y 0.05 FDR (Máximo) además de la base de datos invertida (base de datos Decoy) como herramienta del programa de validación "Percolator". La tolerancia máxima de la

diferencia de masa molecular del ión precursor en comparación con los valores teóricos versus experimentales (tolerancia de la masa del precursor) fue de 20 ppm y la tolerancia para los fragmentos obtenidos por disociación del ión precursor (tolerancia de la masa del fragmento) fue de 0,6 Da. Para la búsqueda automática, se establecieron modificaciones constantes (carbamidometilación de cisteínas (C) y variables tales como oxidación de metioninas (M) y desaminación de asparagina (N) y glutamina (Q).

6.5 Aislamiento de RNA total y qPCR

El ARN total se aisló de 1×10^6 trofozoítos incubados o no con IFN- γ 0, 10, 20, 30 y 60 min, con el Sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega, Madison, WI, EE. UU.) Siguiendo el protocolo del fabricante. La transcripción inversa se realizó con 1 μ g de ARN total de *E. histolytica* utilizando el sistema de transcripción inversa GoScript (Promega Cat # a5001). Posteriormente el cDNA obtenido se ajustó a 50 ng para continuar con la PCR cuantitativa en tiempo real, que se analizó con el qPCR green Master con UNG-clear (Jena Bioscience, Jena, Alemania) en una máquina Step One (Applied Biosystems) con la siguiente secuencia: 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 3 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos y 60 °C durante 30 segundos. Los oligonucleótidos se diseñaron para atacar las proteasas de *E. histolytica* cisteína 1, 2, 4, 5, amebapore, Cox-1, lectina Gal/GalNAc, peroxiredoxina (Tabla 3). Los niveles de expresión relativa fueron normalizados con genes de *E. histolytica* sin estimular como control interno y las diferencias fueron determinadas empleando el método $\Delta\Delta C_t$ relativo, el rDNA fue usado como control interno en el StepOne (Applied biosystem).

Tabla 3. Oligos usados para la qPCR

Gen	Secuencia		Amplicon tamaño
	5'	3'	
Cysteine Proteinase 1	Fwd: ATAAACACTTCACAGCAGTTGA	Rev: TTCTTCATTTGTCATAGCAGC	140pb

Cysteine Proteinase 2	Fwd: TGGACCATTTGCTGCTATGA Rev: TAACATGATCCGCATTGTGC	177 pb
Cysteine Proteinase 4	Fwd: GTTAACCATGGTGTGGCCGCTGTA Rev: GCATCATGAGCACCAGTTGGGAAA	179 pb
Cysteine Proteinase 5	Fwd: AATTCATGGGGAACACTATTTGG Rev: CATCAGCAACCCCAACTGG	112 pb
Amebapores	Fwd: TCCTCTGCAACCTTTGCACT Rev: GCACAAATAGCATTGGCATCA	208 pb
Cox-1	Fwd: TGACTGGAAATAAAGAATGGGA Rev: CCATAAGACTAATCAAATATCTGACT	138 pb
Lectin 170kDa	Fwd: TGACCTTGGTATTATGTCTCG Rev: GTCTCCATGGTTGCATAGC	104 pb
Peroxiredoxin	Fwd: GCAGGAATTGCAAGAAGAGG Rev: TTCCATCTGGTGTGGTTCA	205 pb
rRNA	Fwd: GCAACAGGTCTCCAAGAAGC Rev: ACAGTCGGATCCCCTAACC	166 pb

6.6 Eritrofagocitosis

Trofozoítos de *E. histolytica* se cultivaron en tubos de vidrio en condiciones axénicas. Los trofozoítos (2×10^6) se recogieron enfriando los tubos de cultivo a 4°C en un baño de agua helada durante 10 min y luego se centrifugaron a 300 x g durante 5 min y se lavaron con DPBS estéril (Sigma Aldrich Cat # D8537). Para anular la señalización a través del receptor de IFN- γ R1, *E. histolytica* se trató previamente con el inhibidor de STAT-1 fludarabina 50 μ M (Santa Cruz, Cat. Sc-204755) durante 30 minutos antes de la exposición por 20 minutos a IFN- γ (100 ng / mL) durante 20 minutos. Después de la incubación, se lavaron los trofozoítos dos veces con DPBS antes del ensayo. Los eritrocitos humanos, se obtuvieron por punción venosa en un tubo con heparina y se tomaron frescos del paquete globular

en solución de DPBS, posteriormente se tiñeron con ficoeritrina (PKH26, Sigma-Aldrich Cat # MINI26), se contaron y se usaron a una relación de 1:100 (*E. histolytica*: eritrocitos). Para establecer la interacción, se agregaron eritrocitos y la interacción se llevó a cabo durante 20 minutos a 37 °C en DPBS, después de que se lavaron con DPBS dos veces. Se añadió tampón de lisis (tampón de lisis RBC, Sigma-Aldrich Cat # R7757) 1 minuto a temperatura ambiente. Se agregaron 0,5 ml de suero bovino fetal (Gibco Cat # 10437-028) (FBS) 1 min a temperatura ambiente y se lavaron una vez con DPBS. Las células se fijaron con 4% de p-formaldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con DPBS, eliminando la mayor cantidad posible de líquido en la muestra. A cada tubo se le añadió una gota de Reactivo de Fluoresave (Calbiochem, #Cat. 345789), se mezcla cuidadosamente y se coloca el contenido en un portaobjetos limpio y se almacena en oscuridad a 4 °C durante al menos 24 h antes de ser observado al microscopio.

6.7 Inmunoprecipitación.

Trofozoítos de *E. histolytica* se cultivaron en tubos de vidrio en condiciones axénicas. Se cosecharon enfriando los tubos de cultivo a 4 °C en un baño de hielo de agua durante 10 minutos y luego se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos y se lavaron con DPBS estéril (Sigma Aldrich). Los trofozoítos se trataron con fludarabina (50 µM) a 37 °C durante 30 min, luego se estimularon con IFN-γ (100 ng / mL) 37 °C durante 20 min. El lisado se preparó a partir de *E. histolytica* usando un protocolo modificado (Cruz-Vera *et al.*, 2003). Los trofozoítos se lavaron dos veces en PBS frío, se suspendieron en tampón RIPA que contenía cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma) PMSF, fluoruro de sodio y ortovanadato de sodio. El lisado se centrifugó a 10.000 x g 10 min. La inmunoprecipitación se realizó usando 200 µg de proteína, se incubó con 1,5 µg de anticuerpo primario (laboratorios de transducción p-Tyr BD) durante 8 horas a 4 °C con el sobrenadante, seguido de 12 horas a 4 °C con Proteína A/G Plus-Agarosa (Biotecnología de Santa Cruz). Las muestras se procesaron en SDS-PAGE al 7,5% y se analizaron con

anticuerpos de la siguiente manera: anti-STAT1 (Santa Cruz) y anti-fosfo STAT1 (Abcam).

6.8 Quimiotaxis

La quimiotaxis de trofozoítos de *E. histolytica* hacia IFN- γ se monitorizó en las cámaras de migración de Transwell COS (COSTAR Cat # 3464), como se informó anteriormente (Franco *et al.*, 1997; Perez-Yepey *et al.*, 2014). Los gradientes de quimioatrayentes se generaron al colocar 600 μ L de medio de cultivo sin suero que contenía 100 ng/mL de IFN- γ en la cámara inferior de las unidades de migración y 30,000 trofozoítos, sobre el filtro de la cámara Transwell superior. Las células se mantuvieron en condiciones de CO₂ al 0,05% a 37 °C durante 30 min. Las células que migraron hacia el IFN- γ y alcanzaron la cámara inferior se recuperaron, se tiñeron con cristal violeta y cuantificaron en un microscopio invertido. Para inhibir la quimiotaxis hacia IFN- γ , los trofozoítos se trataron con citocalasina D que despolimeriza los filamentos de actina/miosina (Diaz-Valencia *et al.*, 2015). B). Se usó la quimiotaxis de gradiente de cobertura para visualizar la migración individual de *E. histolytica*; para esto, se inyectaron 180 μ l de medio TYI-S-33 que contenía 100 ng/ml de IFN- γ en tiras de agarosa al 0,75% colocadas a lo largo de un borde de los cubreobjetos. En el borde opuesto, se colocaron los trofozoítos a lo largo de una banda estrecha y se les permitió que se adhirieran al vidrio durante 20 min. La quimiotaxis de *E. histolytica* hacia IFN- γ (100 ng) se visualizó mediante video-microscopía de contraste de fases. Los registros de video se realizaron con el microscopio invertido Carl Zeiss Axiovert 40CFL y una cámara digital utilizada en los ensayos de inmunofluorescencia. Los videos de lapso de tiempo se generaron a partir de 114 fotogramas espaciados, con 2 segundos entre cada fotograma adquirido para los registros en tiempo real de 4 min. Cada video fue procesado con el software AxioVision 40V 4.6.3.0. Para registrar la motilidad aleatoria del trofozoíto en ausencia de IFN- γ , se colocó una tira de agarosa que no contenía IFN- γ y solo se inyectó con medio de cultivo libre de suero en un borde de los cubreobjetos, y se

registró la migración como se indicó anteriormente. El análisis de los datos se colocó en ImageJ 1.51n (<http://imagej.nih.gov/ij>).

6.9 Ensayo de citotoxicidad

Para el ensayo de citotoxicidad se utilizaron dos líneas celulares, de adenocarcinoma colorectal humano Caco-2 y de cáncer de hígado humano HepG2 de ATCC se desarrollaron en monocapas confluentes en medio esencial mínimo (DMEM) (Thermofisher Cat # 11995040) con suero al 10% y penicilina y estreptomina durante 3 días (Lee *et al.*, 2008; Ravdin and Guerrant, 1981). Las células cultivadas en placas de 24 pocillos hasta una confluencia del 80-90% se lavaron dos veces con D-PBS y se añadieron 500 µl de medio DMEM/pocillo. Por otra parte, los trofozoítos de *E. histolytica* (1×10^5 por pocillo) se trataron o no con el inhibidor STAT1, fludarabina 50 µM (Santa Cruz, n. de cat. Sc-204755), durante 30 min antes de la estimulación con IFN-γ (100 ng/mL) durante 20 min. Para la interacción, se añadieron trofozoítos a cada pocillo durante 1 h. Después de la incubación, las células se colocaron en hielo y se lavaron con DPBS y se fijaron con paraformaldehído al 2,5% durante 10 min. La monocapa se tiñó con azul de metileno al 0,1% en tampón de borato 0,1 M (pH 8) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con tampón de borato 0,1 M dos veces para eliminar el exceso de tinción. Finalmente, se añadió 1 ml de HCl 1 N a cada pocillo durante 30 minutos a 37 °C para extraer la tinción; se leyó la absorbancia en un espectrómetro a 655 nm. El porcentaje de destrucción en monocapa se calculó como sigue:

$$[\text{OD}_{655} (\text{pocillos de control}) - \text{OD}_{655} (\text{pocillos experimentales}) / \text{OD}_{655} (\text{pocillos de control})] \times 100.$$

6.10 Animales.

En este estudio se utilizaron hámsters dorados machos (*Mesocricetus auratus*) con un peso de 140-160 gr. Los animales se mantuvieron con una dieta estándar con libre acceso al agua potable. Todos los animales recibieron atención adecuada de

acuerdo con las pautas del Comité de Bioética en las instalaciones de animales de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México, que se basa en las pautas para la investigación con animales publicadas por el Instituto Nacional de Salud (National-Research- Consejo, Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, National Academies Press, Washington, DC, EE. UU., 8ª edición, 2011.)

6.11 Amebiasis hepática experimental

Se incubaron 5×10^5 trofozoítos de *E. histolytica* en presencia o ausencia de 100 ng/ml de IFN- γ recombinante (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EE. UU.) durante 20 min. Después de la incubación, los trofozoítos se lavaron con PBS y se inocularon en el lóbulo hepático izquierdo de los hámsteres suspendidos en 100 μ l de medio de cultivo como se describió anteriormente (Ventura-Juarez, Campos-Rodríguez, and Tsutsumi 2002; Tsutsumi *et al.*, 1984) ver apéndice B. Después de cuatro días, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg / kg, i.p.) y se extirpó el hígado para evaluación macroscópica, y se tomaron varios fragmentos de AHA y se fijaron en paraformaldehído al 4% y se procesaron para análisis histológico.

6.12 Tinción con hematoxilina y eosina (H&E).

Para visualizar el desarrollo de AHA, realizamos tinción H&E como se describe en el Manual de métodos de tinción histológica de las Fuerzas Armadas (Munro B., 1971) ver apéndice C. Los tejidos de muestra se analizaron para determinar los porcentajes de áreas necróticas e inflamatorias, utilizando el software ImageJ.

6.13 Inmunohistoquímica.

Para visualizar la presencia de trofozoítos en las secciones de tejido hepático se sometieron a inmunohistoquímica como se describe (Munro B., 1971), ver apéndice E. Para la inmunodetección de *E. histolytica*, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario de conejo anti- *E. histolytica* preparado en nuestro laboratorio diluido 1: 400 a 4 °C. El anticuerpo secundario IgG cabra-conejo se diluyó 1: 500

(Sigma-Aldrich) y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron con PBS-Tween durante 10 minutos, y se determinó la actividad de peroxidasa con Diaminobencidina (DAB) (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, EE. UU.) durante 5 minutos.

6.14. Expresión de Math1-GFP en un modelo experimental de colitis

Para detectar la expresión de GFP asociada a Math1, se utilizaron dos puntos del colon de ratones Math1GFP como modelo de colitis amebiana, extirpado quirúrgicamente y tomando imágenes ex vivo usando una plataforma de imagen 4MP In-Vivo Xtreme (Bruker, Billerica, MA, EE. UU.). Los bucles colónicos se usaron como modelo para estudios de infección a corto plazo (3 h después de la infección), como se describió anteriormente (Belley and Chadee 1999). Los dos puntos se colocaron horizontalmente desde el lado proximal al distal y se tomaron imágenes con el lado luminal hacia la cámara; la imagen fluorescente se tomó con excitación a 470 nm y emisión a 535 nm (tiempo de exposición de 5 segundos). Las imágenes del In-Vivo Xtreme se adquirieron y analizaron utilizando el software de imagen molecular Bruker MI SE (versión 7.1.3.20550). La expresión de GFP asociada a Math1 en el colon en diferentes condiciones de tratamiento se cuantificó midiendo la fluorescencia media (después de la sustracción de fondo) en una región de interés constante (ROI). El ROI se definió como el área completa del colon (proximal a la parte distal) o se dividió en la parte proximal y distal para la cuantificación.

6.15 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism versión 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Se utilizaron la prueba t de Student y el ANOVA de una vía con pruebas posteriores de Tukey. Las diferencias significativas entre los grupos se evaluaron a $P < 0,05$. Los experimentos se representan como la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar (DE).

7. RESULTADOS

7.1 Detección de IFN- γ y IFN- γ R1 en *E. histolytica*

A lo largo de este trabajo se han descrito algunos trabajos donde han documentado la presencia de diferentes proteínas en *E. histolytica* similares a proteínas humanas. Con base en su genoma, este parásito puede contener, en su membrana, proteínas similares a los receptores a citocinas humanas como IL-1 β , IL-8, IFN- γ y TNF- α (Loftus *et al.*, 2005; Mancilla-Herrera *et al.*, 2012; Diaz-Valencia *et al.*, 2015).

Debido a observaciones previas, se decidió buscar por medio del uso de un anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ humano, la posibilidad de que este fuera capaz de unirse a trofozoítos de *E. histolytica*. Para ello se llevó a cabo la interacción de los trofozoítos con IFN- γ recombinante, durante 20, 60 y 180 minutos, luego de ello mediante inmunofluorescencia, detectamos una cantidad creciente de complejos de IFN- γ /anticuerpo en la superficie de *E. histolytica* a los 60 y 180 minutos de exposición (Fig. 9A). Se utilizó un control sin estimulación con el IFN- γ donde se puede observar que no hay marcaje inespecífico y solo se observa el núcleo de las células en azul (DAPI). Para apoyar el reconocimiento específico de IFN- γ , se detectó por medio de la técnica de Western blot una proteína de 17 kDa correspondiente a IFN- γ localizada en la membrana de *E. histolytica* (Fig. 9B). Como control positivo, se usó un anticuerpo contra la lectina de 220 kDa (Talamás-Rohana *et al.*, 1995) para confirmar la localización de IFN- γ en la membrana *E. histolytica* (Fig. 9B).

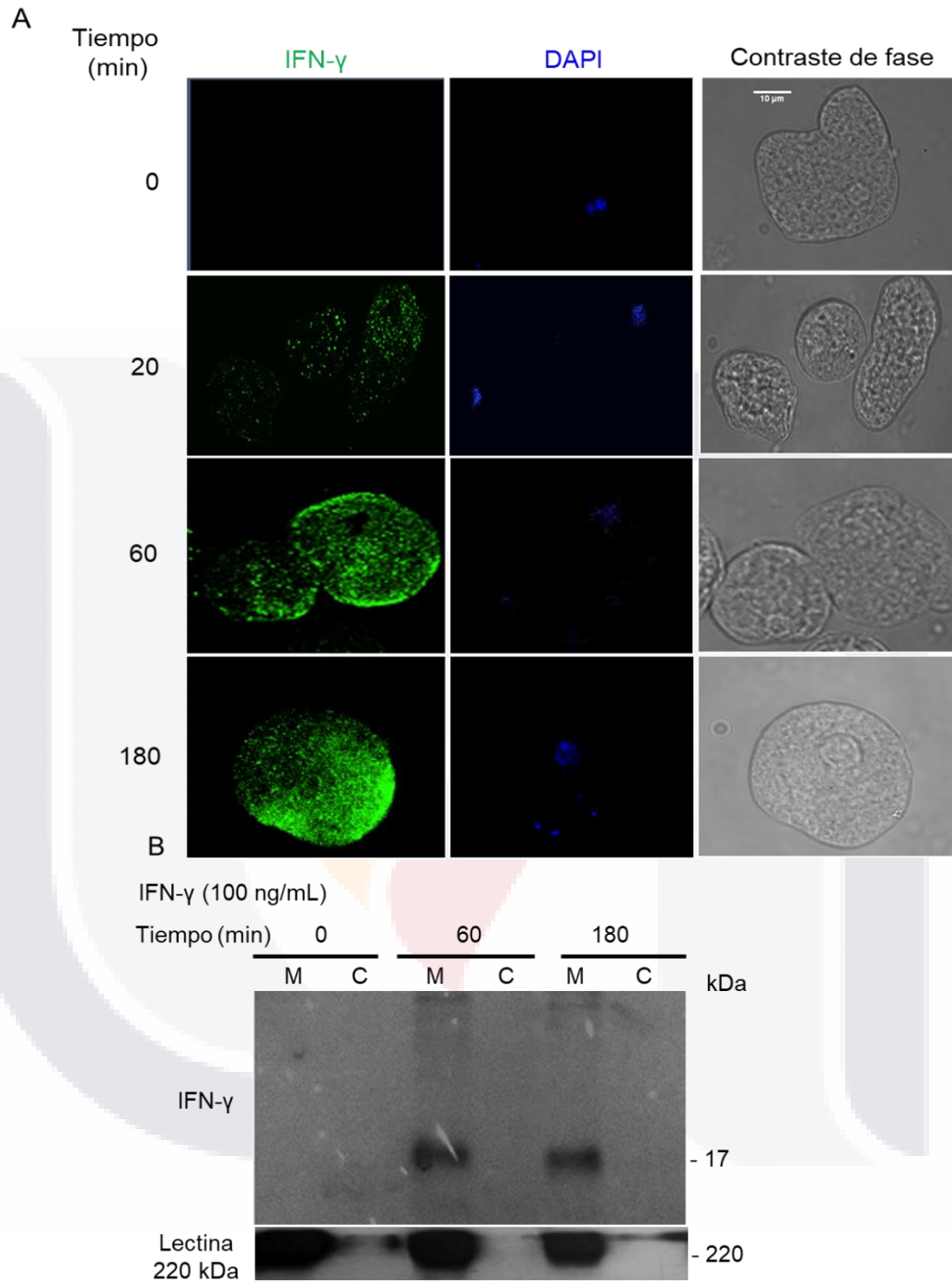
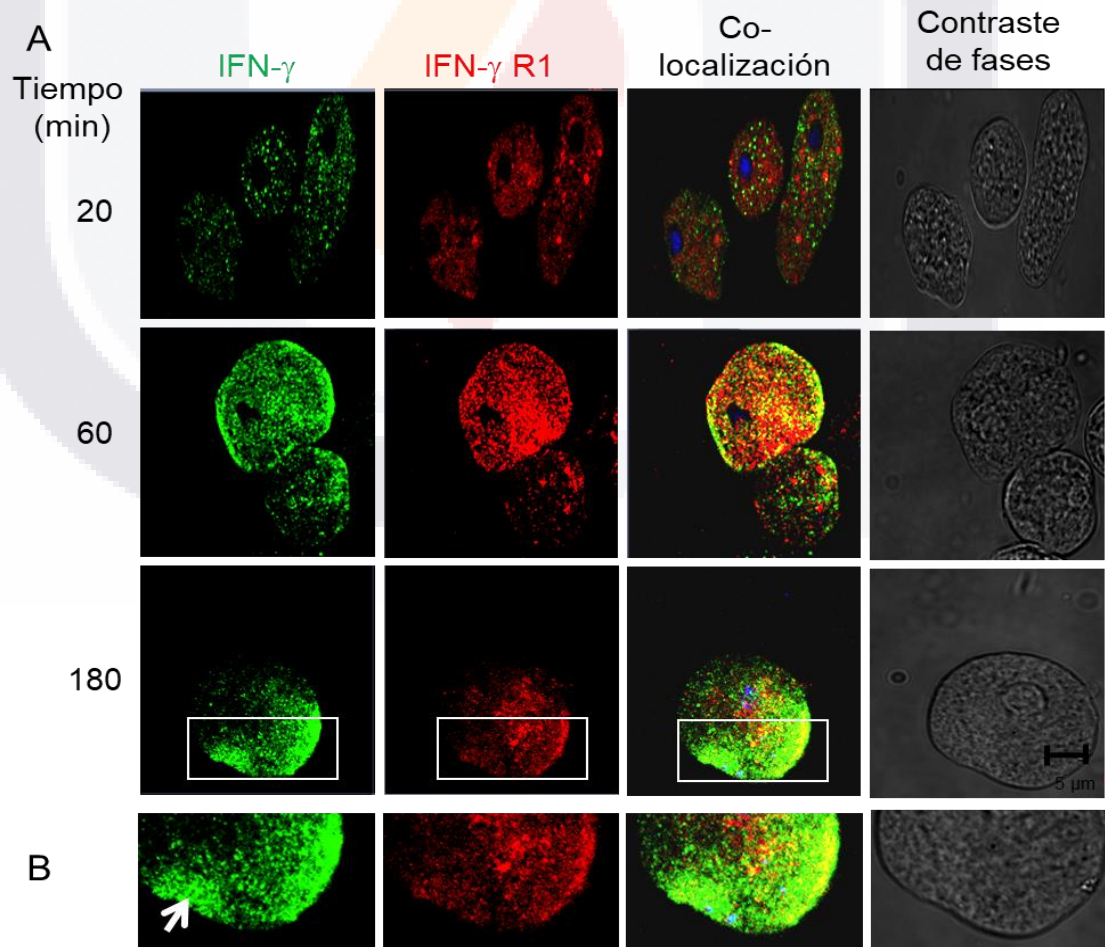


Figura 9.- Localización de IFN- γ en la superficie de *E. histolytica*. A. *E. histolytica* se incubó con IFN- γ durante 20, 60 y 180 min y la inmunodetección de la proteína IFN- γ en la superficie de *E. histolytica* con anticuerpo anti-IFN- γ humano (dilución 1: 100) seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 (1: 1000) se analizó por microscopía confocal. Téngase en cuenta que la intensa tinción verde está ausente en el control (sin

IFN- γ). **B.** Detección de transferencia Western de la proteína de 17 kDa correspondiente a IFN- γ en las fracciones de membrana de *E. histolytica* (M) y citoplasmática (C), después de la interacción los trofozoítos con IFN- γ durante 60 y 180 minutos. La lectina de 220 kDa se utilizó como control interno para confirmar la localización de la membrana y el fraccionamiento subcelular. La barra de escala en la figura de contraste de fase representa 10 μ m.

Para cuantificar la localización de IFN- γ en el supuesto receptor en la superficie de *E. histolytica*, los parásitos se incubaron con anticuerpos anti-IFN- γ R1 y anti-IFN- γ humanos y se calculó el índice de fluorescencia media. Se observó una señal fuerte de ambos anticuerpos (IFN- γ R1 y anti-IFN- γ) a los 20 min que aumentó en intensidad después de 180 min (Fig. 10A) hacia el extremo uroideo de los parásitos (flecha blanca en la Fig. 10B) La co-localización con IFN- γ y anti-IFN- γ R1 humano en *E. histolytica* fue más alta después de 60 minutos de interacción con IFN- γ (Fig. 10C).



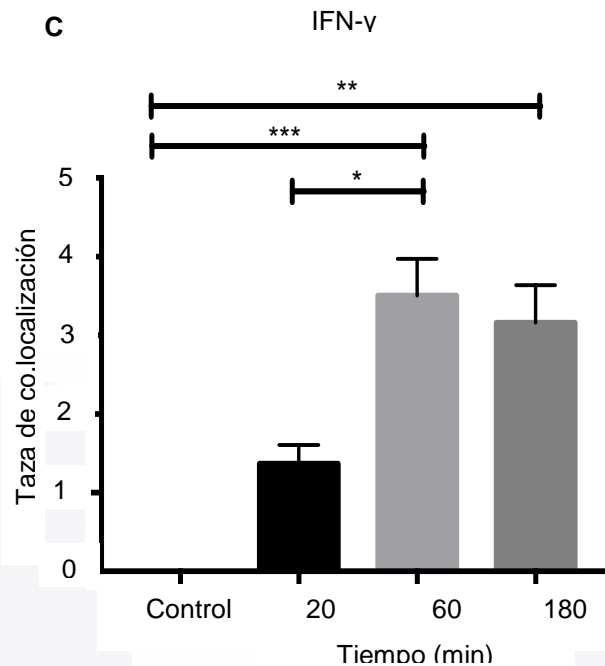


Figura 10.- Co-localización e interacción del receptor similar a IFN- γ e IFN- γ en *E. histolytica*. Los trofozoítos se incubaron con IFN- γ durante 20, 60 y 180 min y se analizaron mediante microscopía confocal. Después de la interacción, se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-IFN- γ (dilución 1: 100) y un anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ R1 (dilución 1:100); luego con los anticuerpos secundarios marcados con Alexa fluor 594 y Alexa fluor 488, respectivamente. A) Las micrografías muestran que la ameba fijó IFN- γ en sus membranas; Un aumento en la señal positiva. El marcador para el receptor similar a IFN- γ fue constante después de 3 h de interacción y se desplazó hacia el lado uroideo de la ameba. Se observó un aumento de la localización conjunta a la hora de interacción. B) Ilustraciones morfológicas que demostraron el límite (flecha) en los tofozoítos después de la interacción con IFN- γ a las 3 h de interacción. C) El análisis se realizó de acuerdo con la metodología Cost que incluye la eliminación de la autofluorescencia con el complemento Coloc2 del software Fiji (ImageJ). El gráfico se realizó con GraphPad Prism 7. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

El resultado anterior indica que el parásito *Entamoeba histolytica* puede poseer un mecanismo por el cual esté interactuando con el IFN- γ humano. A partir de esto se generó una nueva pregunta: ¿Es posible que otra especie del género *Entamoeba*, pueda mostrar este mismo comportamiento? Para ello se decidió utilizar *Entamoeba*

dispar, una especie no patógena de éste género, realizando el mismo experimento en donde se puso en contacto a *E. dispar* con IFN- γ recombinante. En la Figura 11 se muestran los resultados de los tiempos de interacción de *E. dispar* con el IFN- γ y el control sin estímulo, marcados con los anticuerpos anti-IFN- γ y anti-R1 IFN- γ . Se observa que en ninguno de los casos se presenta fluorescencia y únicamente se puede apreciar la presencia de los núcleos de *E. dispar*, por lo que al parecer en esta especie de amiba no existe proteína alguna mediante la cual pueda interactuar con IFN- γ .

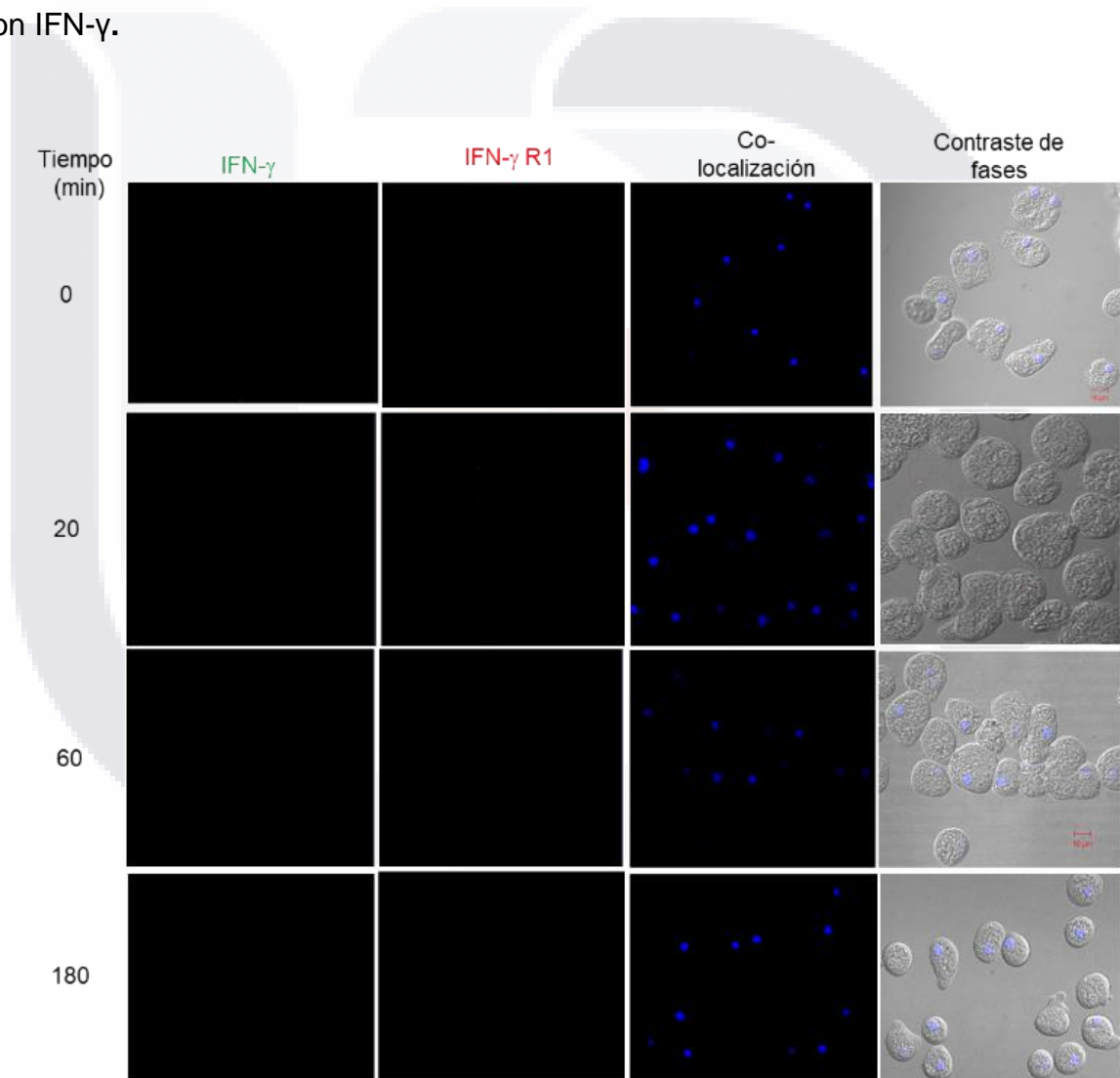


Figura 11.- Doble inmunofluorescencia en trofozoítos de *E. dispar*. Los trofozoítos fueron incubados con IFN- γ por 20, 60 y 180 min y analizados por microscopía confocal. Luego de la interacción, los trofozoítos se incubaron con los anticuerpos anti-IFN- γ y anti-

R1 IFN- γ y su correspondiente anticuerpo secundario Alexa fluor 488 y Alexa fluor 594 respectivamente. Se observa que en ninguno de los casos se presentó señal para ninguna de las proteínas. Observación por microscopía confocal (40X) Carl Zeiss LSM700.

Para corroborar los resultados obtenidos por inmunofluorescencia y revisados por microscopía confocal; las proteínas de membrana de *E. histolytica* obtenidas luego de que se incubaron los trofozoítos por 20 minutos con el IFN- γ humano recombinante, se separaron por SDS-PAGE y se incubaron con un anticuerpo monoclonal contra anti-IFN- γ R1 (Figura 12). Observando una banda de aproximadamente 200 kDa en los lisados de *E. histolytica*, como control positivo se utilizaron lisados de leucocitos humanos, donde el anticuerpo IFN- γ R1 reconoció una proteína de 50 kDa (Fig. 12, carril 1).

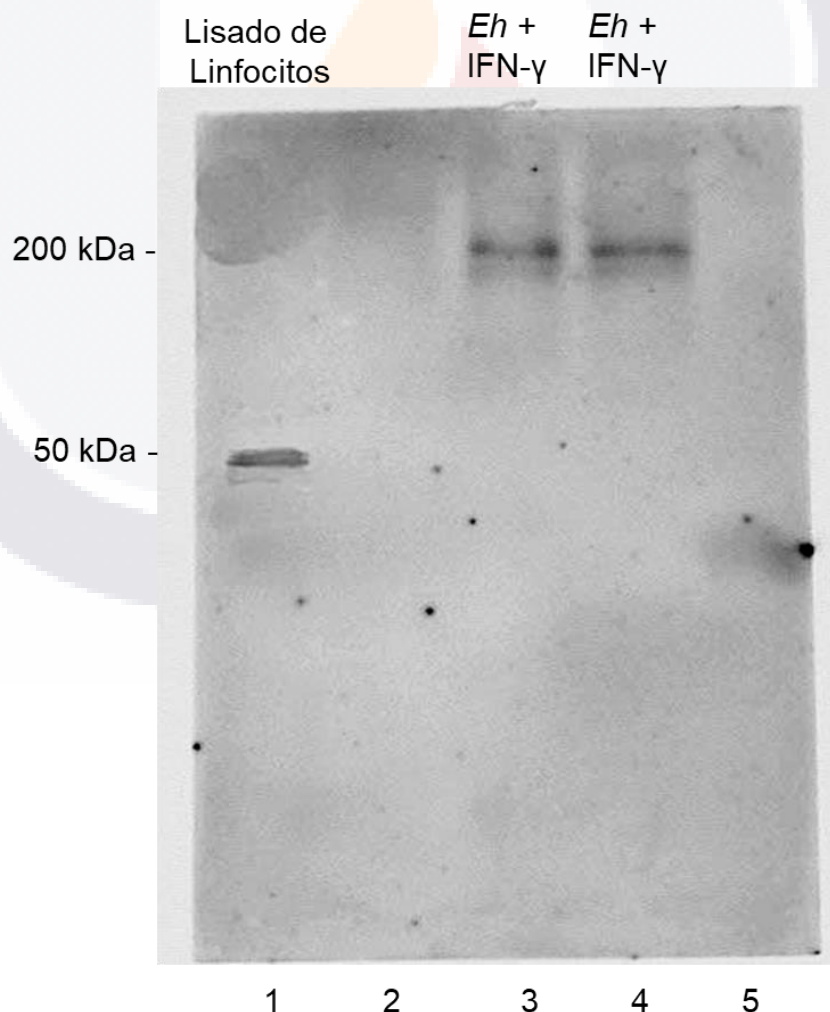


Figura 12.- Western blot de fracciones de membrana de *E. histolytica* usando un anticuerpo anti-IFN- γ R1 humano. Las proteínas de *E. histolytica* se analizaron mediante SDS-PAGE al 12% e inmunotransferencia. Los trofozoítos se incubaron con o sin 100 ng/ml de IFN- γ . Obsérvese la fuerte inmunorreactividad con el anticuerpo anti-IFN- γ R1 a 200 kDa en fracciones de membrana de *E. histolytica* (carriles 3 y 4) y a 50 kDa en lisado de linfocitos humanos utilizado como controles (carril 1). Los carriles 2 y 5 son espacios en blanco.

Nuestros resultados sugieren que *E. histolytica* expresa una proteína de membrana de aproximadamente 200 kDa, que es reconocida por el anticuerpo humano anti-IFN- γ R1 que es independiente de si *E. histolytica* está expuesto a IFN- γ exógeno o no (Fig. 12). Estos resultados sugieren que *E. histolytica* expresa una molécula receptora de tipo IFN- γ en su superficie.

7.2 Análisis de espectrometría de masas.

Para cuantificar la identidad de la proteína de 200 kDa, los extractos de membranas de *E. histolytica* se separaron por SDS-PAGE y se tiñeron con azul Coomassie. Las proteínas de 200 kDa se escindieron y analizaron por MS. El análisis de péptidos reveló cuatro proteínas en el proteoma *E. histolytica* que coincidían con diferentes puntuaciones (Fig. 13A). El probable antígeno de superficie *C4LTV2_ENTHI*, descrito como una probable tirosina quinasa, mostró la mayor concordancia y porcentaje de cobertura con un peso molecular esperado de aproximadamente 200 kDa; la Fig. 13B muestra la secuencia de la proteína *C4LTV2_ENTHI* (letras en negrita).

Estos péptidos cubren el 28,6% de la secuencia amebiana de proteína de 200 kDa reconocida como supuesta tirosina quinasa. Debido a la alta puntuación y otras características del *C4LTV2_ENTHI*, nuestros resultados indican una alta posibilidad de que el anticuerpo anti IFN- γ R1 detecte la proteína amebiana en la transferencia Western y sea lo mismo para la supuesta tirosina quinasa. La investigación adicional de esta posibilidad mostró (Fig. 13C) que la secuencia de aminoácidos de IFN- γ R1 humano tiene un -ETTCYIRVYNVYVRMNGSEIQYKILTQKEDDCDEI-

QCQLAIPVSSLNSQYC- motivo en el tercer bucle extracelular, caracterizado como un sitio de unión para IL-8, el cual a su vez se alinea con el motivo NTYCDVCEENYIIIDGTCYYFRAINKCESSDGIKCTKCSSGYTPKGGKYC del antígeno de superficie amebiana de 200 kDa (probable tirosina quinasa), que comparte aminoácidos idénticos en diez posiciones específicas, mientras que los otros veinte aminoácidos, aunque no son idénticos, tienen propiedades fisicoquímicas similares.

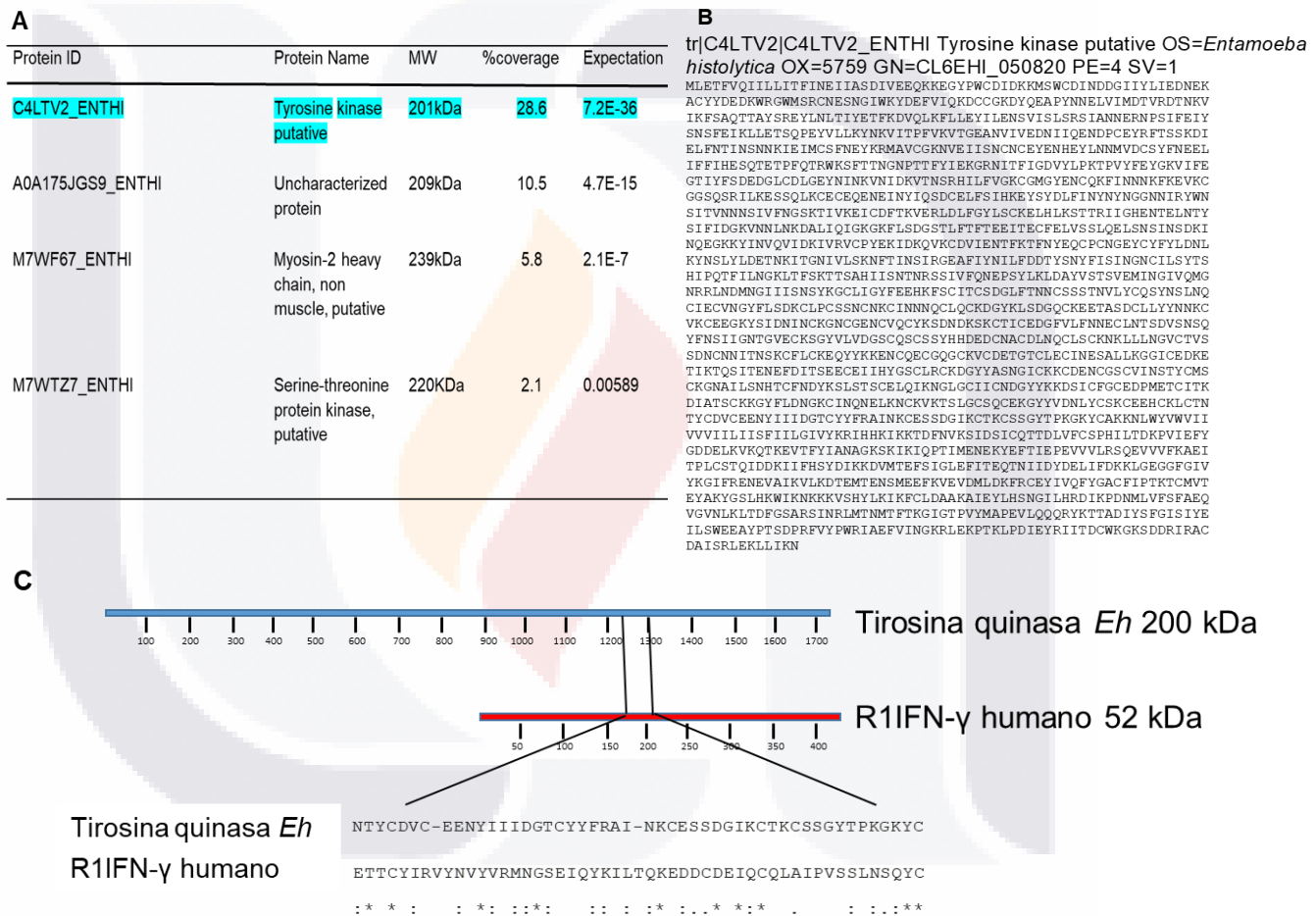


Figura 13.- Análisis de la proteína de 200 kDa detectada por el anticuerpo anti-IFN- γ R1 humano en *E. histolytica*. (A) El análisis de la banda de proteína de 200 kDa por espectrometría de masas (MS) identificó cuatro proteínas de *E. histolytica* por análisis de péptidos. La proteína destacada en la parte superior de la lista se informa como un posible antígeno de superficie amebiana y como una posible tirosina quinasa de *E. histolytica*. (B) Secuencia del antígeno de superficie *E. histolytica* 200-kDa reportado (tirosina quinasa

putativa). (C) Alineación de la secuencia de aminoácidos humanos IFN- γ R1 y el antígeno de superficie *E. histolytica* 200-kDa (supuesta tirosina quinasa). Los motivos de aminoácidos similares, con una identidad del 20% entre las dos proteínas, están flanqueados por líneas inclinadas. Diez de los aminoácidos en este motivo son idénticos, y los otros 20 tienen propiedades fisicoquímicas similares.

7.3 El IFN- γ regula positivamente la expresión de factores de virulencia de *E. histolytica*

Se realizó RT-PCR cuantitativa para determinar si la exposición de *E. histolytica* al IFN- γ durante diferentes tiempos podría modular la transcripción de factores clave de virulencia en *E. histolytica*. Después de 20 minutos de exposición a IFN- γ , el ARNm de las cisteína proteasas de *E. histolytica*, EhCP-A1, EhCP-A2, EhCP-A4 y EhCP-A5, aumentó significativamente en comparación con el control en ausencia de IFN- γ . El aumento en las veces de expresión fue mayor para EhCP-A1 y EhCP-A5 (20 y 39 veces, respectivamente; Figs. 14A / D).

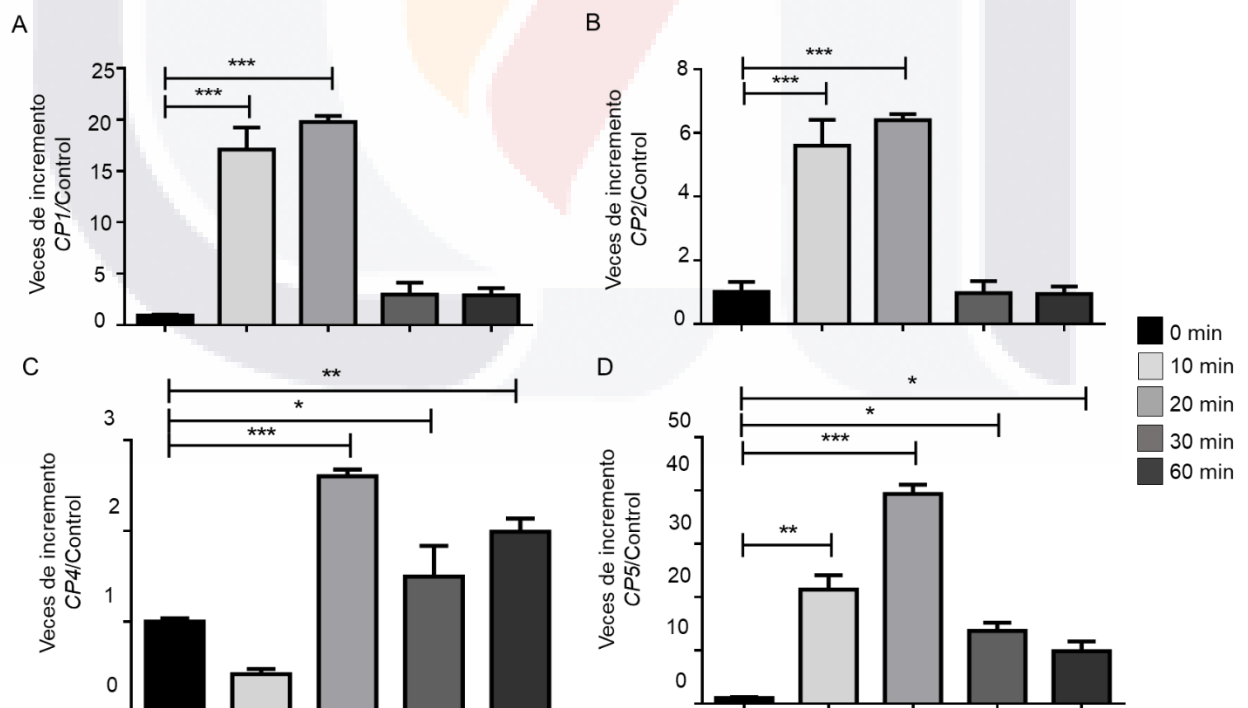


Figura 14. Expresión de cisteína proteasas reguladas por IFN- γ en *E. histolytica*. Trofozoítos de *E. histolytica* tratados o no con IFN- γ durante 10, 20, 30 y 60 minutos

aumentó la expresión de genes de cisteína proteasa asociados con la patogenicidad de *E. histolytica*. Obsérvese la regulación máxima de la expresión de EhCP-A1, EhCP-A2, EhCP-A4 y EhCP-A5 (A-D) después de 20 minutos de estimulación con IFN- γ . * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

El ARNm para los amebaporo (APA), ciclooxigenasa-1 (Cox-1) y peroxiredoxina (Prx) aumentó significativamente 16 veces después de 30 minutos de exposición (Figs. 15 A / B). La expresión de ARNm de Prx (20 veces) y Gal-lectina (Hgl 17 veces) alcanzó su punto máximo después de 60 minutos (Fig. 15 C / D). Estos resultados muestran claramente que el acoplamiento de IFN- γ a través de un probable receptor a IFN- γ en *E. histolytica*, permite regular positivamente la modulación de la expresión de varios de los genes de virulencia del parásito.

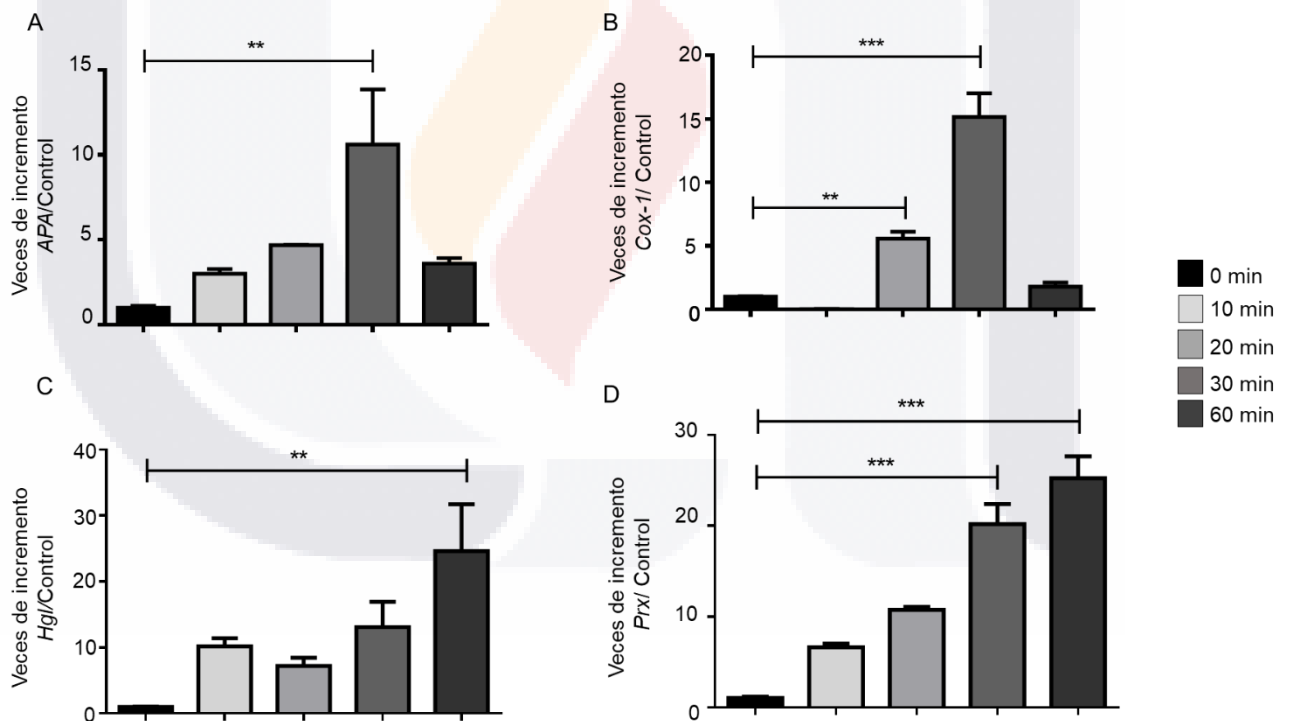
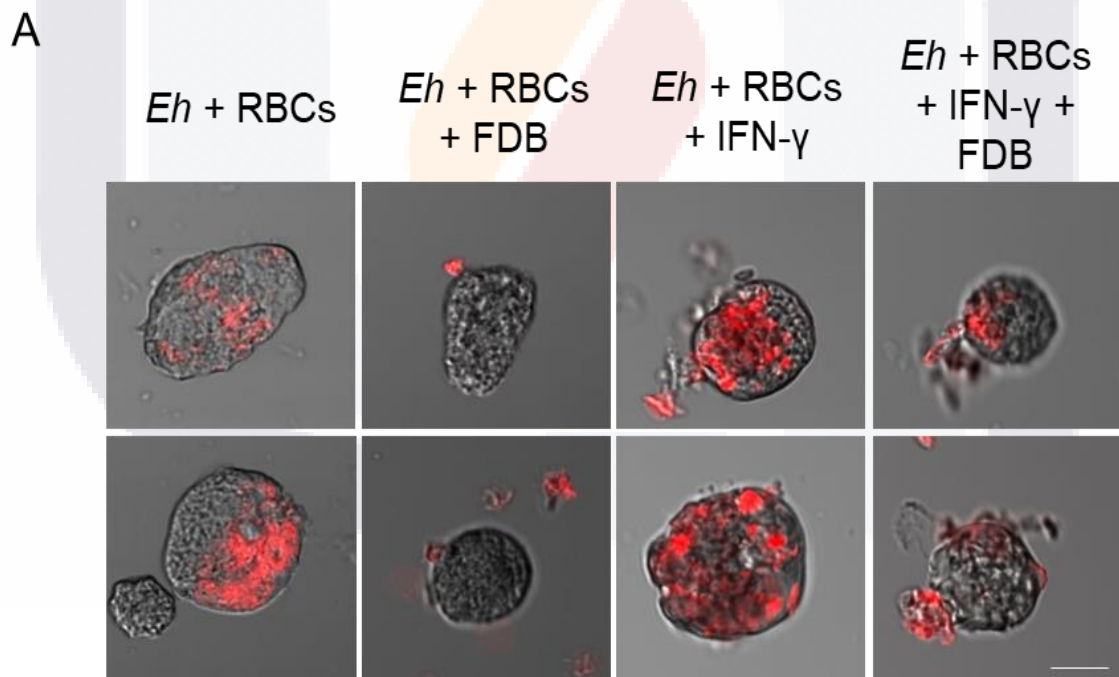


Figura 15.- IFN- γ regula la expresión de otros genes de virulencia en *E. histolytica* conforme al tiempo. La interacción de *E. histolytica* con IFN- γ promueve positivamente la expresión de genes como APA, Cox-1, Hgl y Peroxirredoxina Prx: (A-D) cuya máxima expresión ocurre después de 30 min. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

7.4 El pre-tratamiento con IFN- γ aumenta la eritrofagocitosis en *E. histolytica*.

Una de las propiedades más destacadas de *E. histolytica* es su extraordinaria actividad fagocítica contra una variedad de materiales en partículas que incluyen bacterias, células epiteliales de la mucosa y eritrocitos. La última actividad ha sido ampliamente aceptada como una característica presentada por *E. histolytica* invasiva (Talamás-Lara *et al.*, 2014). Por esta razón, determinamos si IFN- γ mejoraba la eritrofagocitosis de los trofozoítos. El pre-tratamiento de los trofozoítos con IFN- γ durante 20 minutos aumentó significativamente la actividad fagocítica de los glóbulos rojos (Fig. 16 A) que fue abrogada específicamente con el inhibidor de fosfo-STAT1, Fludarabina (Fig. 16 B).



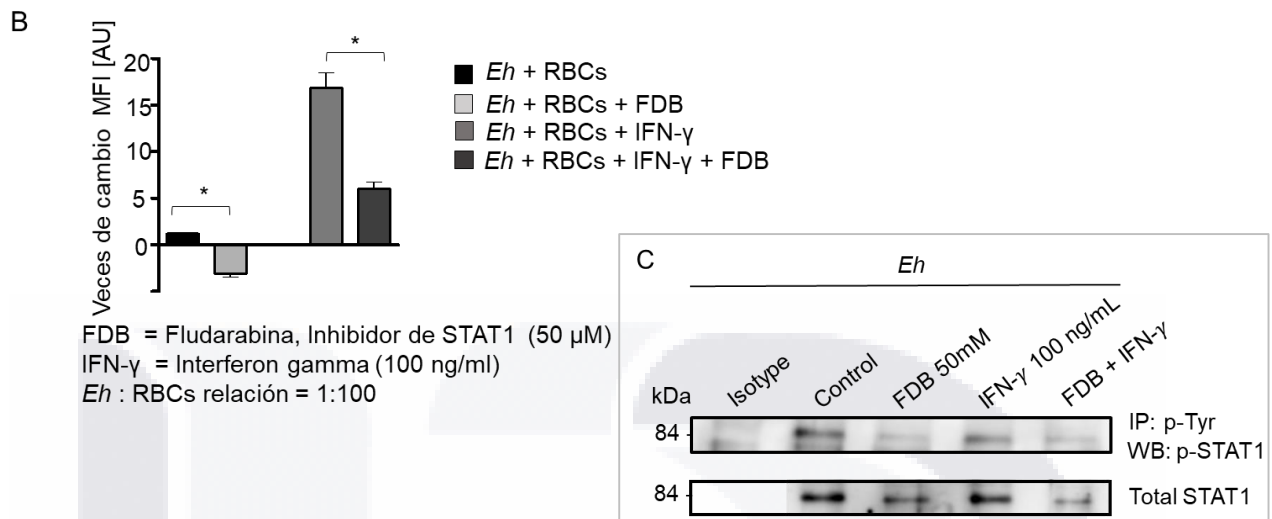


Figura 16.- El IFN- γ incrementa la eritrofagocitosis en *E. histolytica*. (A). Imágenes de la eritrofagocitosis de *E. histolytica* no tratada o en presencia de fludarabina o IFN- γ , o ambos. Note que la eritrofagocitosis estimulada por IFN- γ fue inhibida sustancialmente con el inhibidor de STAT1, Fludarabina. (B) Histograma que muestra la cuantificación de los píxeles de fluorescencia de los eritrocitos fagocitados en las diferentes condiciones. MFI, significa intensidad de fluorescencia media; AU, unidades arbitrarias, * $P < 0.05$. (C) La fosforilación basal e inducida por IFN- γ de STAT1 en *E. histolytica* disminuye notablemente con el inhibidor de fósforo-STAT1, Fludarabina. IP inmunoprecipitación; WB Western Blot.

Estos resultados indican que IFN- γ promovió la eritrofagocitosis en *E. histolytica*, actuando específicamente por el acoplamiento a través del receptor similar a IFN- γ humano posiblemente por la activación de STAT1.

En consecuencia, a continuación se decidió investigar si el IFN- γ estimula la fosforilación de STAT1 en *E. histolytica*. Para investigar esto, se realizó la inmunoprecipitación de las proteínas de trofozoítos de *E. histolytica* con fosfo-tirosina y se realizó un western blot con fosfo-STAT1 en las condiciones que se muestran en la Figura 16 B. Sorprendentemente, la expresión basal (controles no estimulados) de phospho-STAT1 en *E. histolytica* fue similar a la estimulada por IFN- γ ; sin embargo, con el tratamiento previo con el inhibidor de fosfo-STAT1

Fludarabina (50 μ M) disminuyó notablemente la expresión de la fosfo-STAT1 (Fig. 16 C). La viabilidad de *E. histolytica* tratada con fludarabina 50 mM fue > 95% según lo determinado por el ensayo de exclusión de azul de tripano. Concentraciones más bajas de fludarabina (10 y 25 nM) no fueron efectivas para inhibir el p-STAT1 estimulado por IFN- γ basal. Estos resultados demuestran que la expresión basal de STAT1 en *E. histolytica* es constitutivamente alta y no aumenta la fosforilación con el IFN- γ . Sin embargo, también se demuestra que en ambas condiciones, la fludarabina inhibe notablemente la fosforilación de STAT1 (Fig. 16 C).

7.5 El pre-tratamiento con IFN- γ aumenta la quimiotaxis en *E. histolytica*.

La quimiotaxis es un fenómeno en el que las células dirigen sus movimientos de acuerdo con la presencia de ciertas sustancias químicas en el medio ambiente. *E. histolytica* orienta su migración o quimiotaxis en base a estímulos externos como proteínas séricas, bacterias o moléculas liberadas por células epiteliales e inmunes (Bailey, Leitch, and Day 1985) como IL-8 (Diaz-Valencia *et al.*, 2015). Esta actividad se ha correlacionado en *E. histolytica* con su capacidad invasiva (Yu and Chadee 1997; Diaz-Valencia *et al.*, 2015).

La quimiotaxis requiere un reconocimiento específico entre el quimioatrayente y el receptor en la célula que conduce a una serie de señales de activación que a su vez inducen cambios bioquímicos y estructurales que permiten la migración de los trofozoítos expuestos a 100 ng/mL de IFN- γ mostrando un aumento significativo en la migración cuatro veces mayor (Figs. 17 Ac, 17 B) con respecto al control donde *E. histolytica* no se trató con IFN- γ , en medio sin suplemento (Figs. 17 Aa, 17 B, Video Suplementario 1 <https://doi.org/10.1128/IAI.00540-19>). Para estos estudios, se utilizó IL-8 como control positivo (Fig. 17 Ab) y Citocalacina D, un inhibidor del citoesqueleto de actina como control negativo (Fig. 17 Ad), donde se observó que efectivamente no hubo migración de las células. La quimiotaxis de *E. histolytica* también se analizó mediante videos de lapsos de tiempos. Para cada grabación en tiempo real, se seleccionaron trofozoítos

representativos de cada condición, siguiendo su trayectoria durante 4 minutos (Videos complementarios 1 y 2 <https://doi.org/10.1128/IAI.00540-19>).

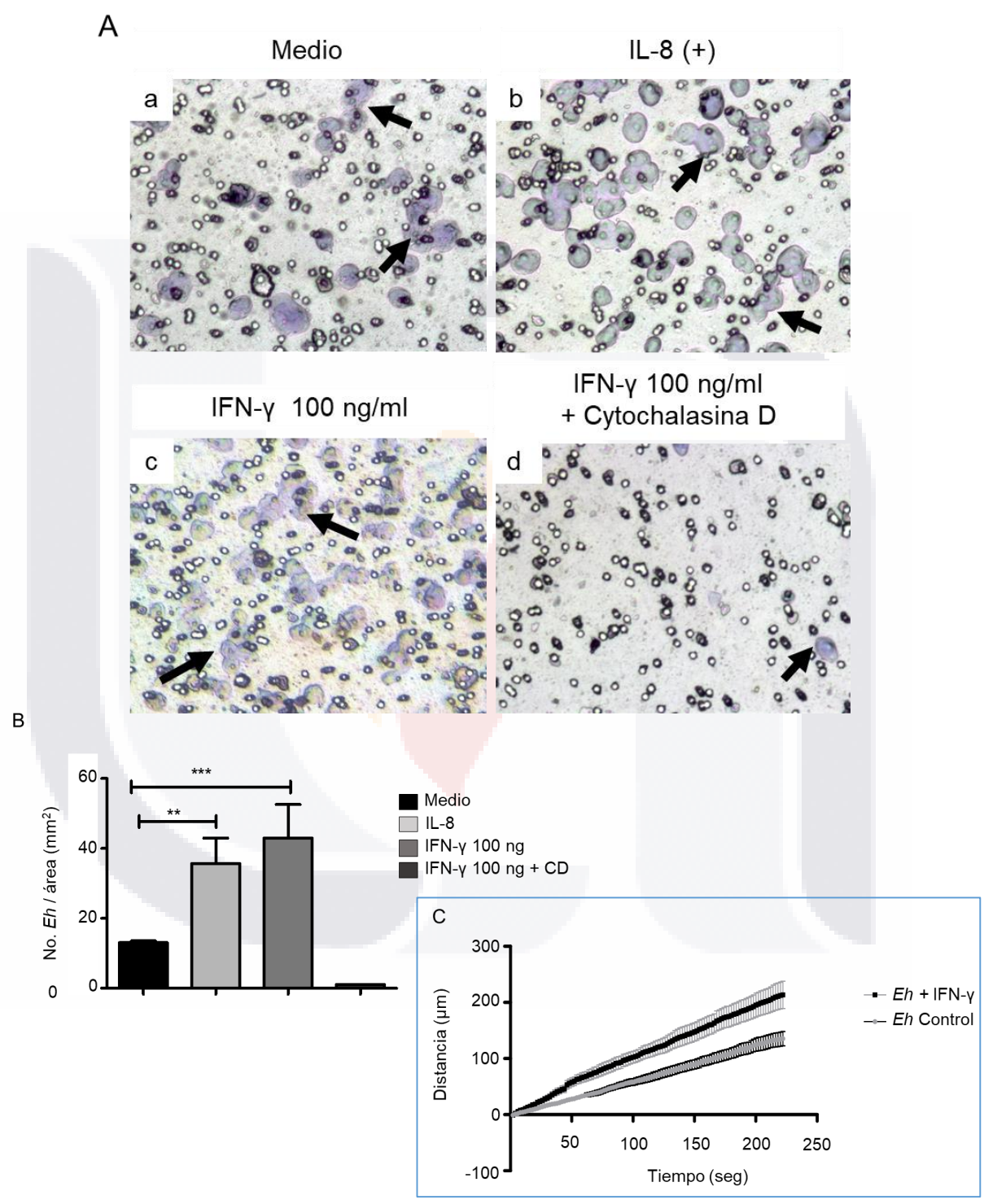


Figura 17.- Quimiotaxis de *E. histolytica* hacia el IFN-γ humano. A). Imágenes microscópicas de trofozoítos de *E. histolytica* que se depositaron en la parte superior de las

cámaras de Transwell y se les permitió migrar a las cámaras inferiores en ausencia (a) o presencia de IFN- γ (c); o en presencia de IL-8 como control de migración positivo (b), y en presencia de IFN- γ y de 10 μg / ml de citocalasina D (d, CD). B). Número de trofozoítos/área (mm^2). Los datos representan valores de cuatro experimentos independientes. C) Velocidad de los trofozoítos en presencia o ausencia de IFN- γ . El gráfico representa la velocidad de migración registrada por video microscopía en tiempo real. ** P <0.01, *** P <0.001.

7.6 IFN- γ aumenta la actividad citopática de *E. histolytica* hacia las células Caco-2 y HepG2.

La capacidad del *E. histolytica* para destruir las células objetivo se puede separar en dos fases: reconocimiento y adhesión que permite la muerte celular y la fagocitosis (Katz *et al.*, 2002). Para determinar si el pre-tratamiento con IFN- γ aumentaba la actividad citopática de *E. histolytica*, se llevaron a cabo estudios usando monocapas de células de HepG2 de hígado y Caco2 de colon humano. Después de 20 minutos de interacción con IFN- γ , *E. histolytica* pudo destruir gran parte de la monocapa HepG2 (Fig. 18 B), y fue mayor que la destrucción de la monocapa de Caco-2 (Fig. 18 A); a su vez también se observó que la destrucción de Caco-2 también fue parcialmente inhibida cuando *E. histolytica* se puso en contacto con la Fludarabina (inhibidor STAT1). Estos resultados mostraron que los tiempos de incubación anteriores con IFN- γ solo a los 20 minutos hay una diferencia significativa con respecto a los demás tiempos, y que a su vez el uso del inhibidor de STAT1 no tuvo un efecto sobre la actividad citopática de *E. histolytica*.

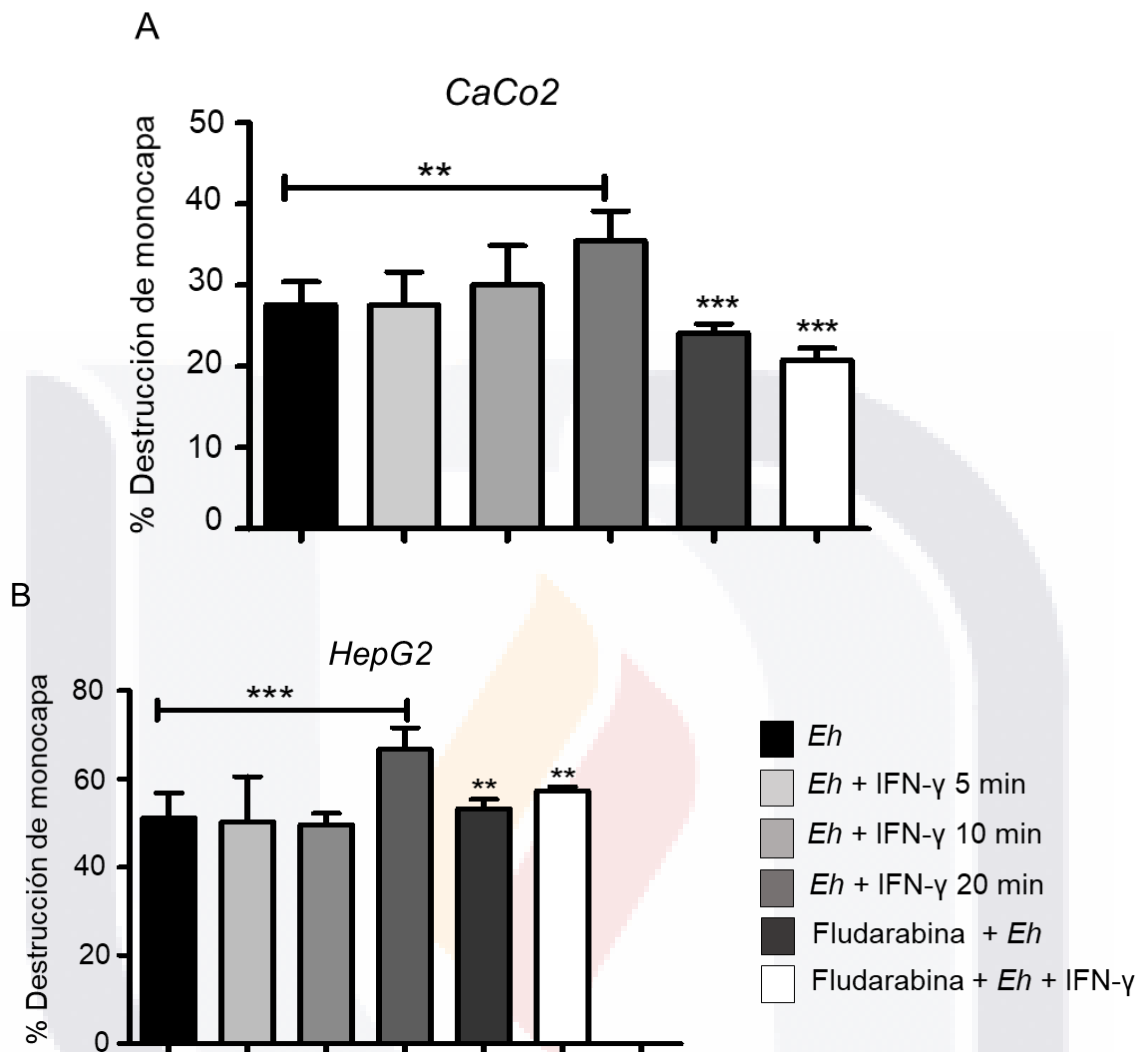


Figura 18.- El IFN- γ mejoró la actividad citopática de *E. histolytica* en las células Caco-2 y HepG2. A). Las células Caco-2 y B), la monolayer HepG2 se expusieron a trofozoítos de *E. histolytica* pre-tratados con IFN- γ en diferentes momentos con o sin el inhibidor STAT1 (-) Fludarabina (50 μ M). Después de la interacción con los trofozoítos, las células restantes se tiñeron con azul de metileno y el color liberado se midió a 655 nm. Los datos representan valores de 4 experimentos independientes. ** P <0.01, *** P <0.001.

7.7 Efecto *in vivo* de trofozoítos de *E. histolytica* estimulados con IFN- γ

Debido a los hallazgos encontrados en las diferentes pruebas *in vitro* sobre el posible efecto que el IFN- γ pudiera generar sobre los diferentes mecanismos de patogenicidad conocidos y estudiados en *E. histolytica*; ahora se probó su efecto *in*

vivo, para determinar el efecto en el desarrollo morfológico del absceso hepático amebiano en hámster. Los hámsteres se inocularon con 5×10^5 trofozoítos pre-tratados o no con IFN- γ durante 20 min. Los animales inoculados con solo *E. histolytica* muestran lesiones características de AHA producidas después de 4 días las cuales son pequeñas y blancas localizadas en el sitio de inoculación sobre el lóbulo hepático izquierdo (flecha) en comparación con hígados sanos (Fig. 19 B/A). En marcado contraste, el AHA producido por los trofozoítos pre-tratado con IFN- γ (Fig. 19D) produjo varios granulomas que se distribuyeron por todo el lóbulo hepático izquierdo con pocos focos metastásicos en otros lóbulos; sin embargo esto no se observó en la condición de *E. histolytica* + IFN- γ + anti-IFN- γ (Fig. 19C), donde solo había lesiones localizadas.

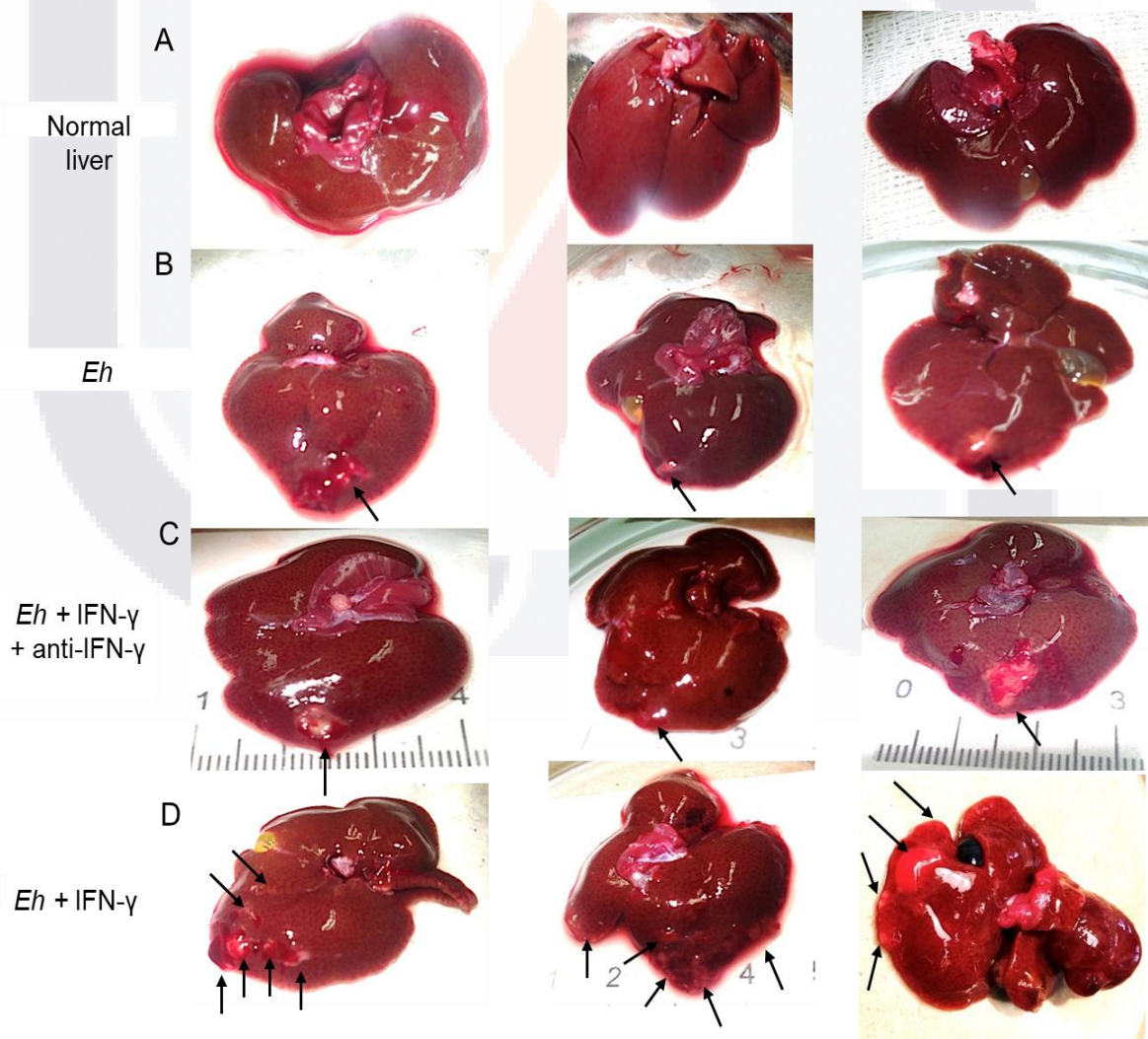


Figura 19.- Abscesos hepáticos amebianos 4 días después de la inoculación.

Desarrollo macroscópico de absceso hepático amebiano con trofozoítos estimulados con IFN- γ . Se inocularon hámsters machos con trofozoítos de *E. histolytica* estimulados o no con IFN- γ durante 20 minutos. A) Se observa en los hígados de los hámsteres normales la ausencia de abscesos. B) Se observa una sola lesión (flechas) en el lóbulo hepático donde se inocularon los trofozoítos sin tratamiento. C) La lesión (flechas) en el hígado muy similar al absceso formado por los trofozoítos sin tratamiento, mostradas en el panel (B). D) El desarrollo de múltiples abscesos al inocular a *E. histolytica* tratada con IFN- γ la imagen muestra varios microabscesos distribuidos en el lóbulo izquierdo y derecho del parénquima hepático (flechas).

Por histopatología, la lesión producida por *E. histolytica* y la condición de *E. histolytica* + IFN- γ + anti-IFN- γ mostró los granulomas característicos de un AHA con una región necrótica central y los bordes de infiltrado inflamatorio intenso que recubre tejidos hepáticos sanos (Fig. 20 A/B). Las lesiones producidas por los trofozoítos pre-incubados con IFN- γ (Fig. 20C) muestran un área significativamente mayor de lesiones necróticas con varios granulomas pequeños periféricos (flechas amarillas). Se realizó la cuantificación de las áreas de daño detectadas por tinción de H&E; donde el daño más severo se observó con los trofozoítos incubados con el IFN- γ (Fig. 20D).

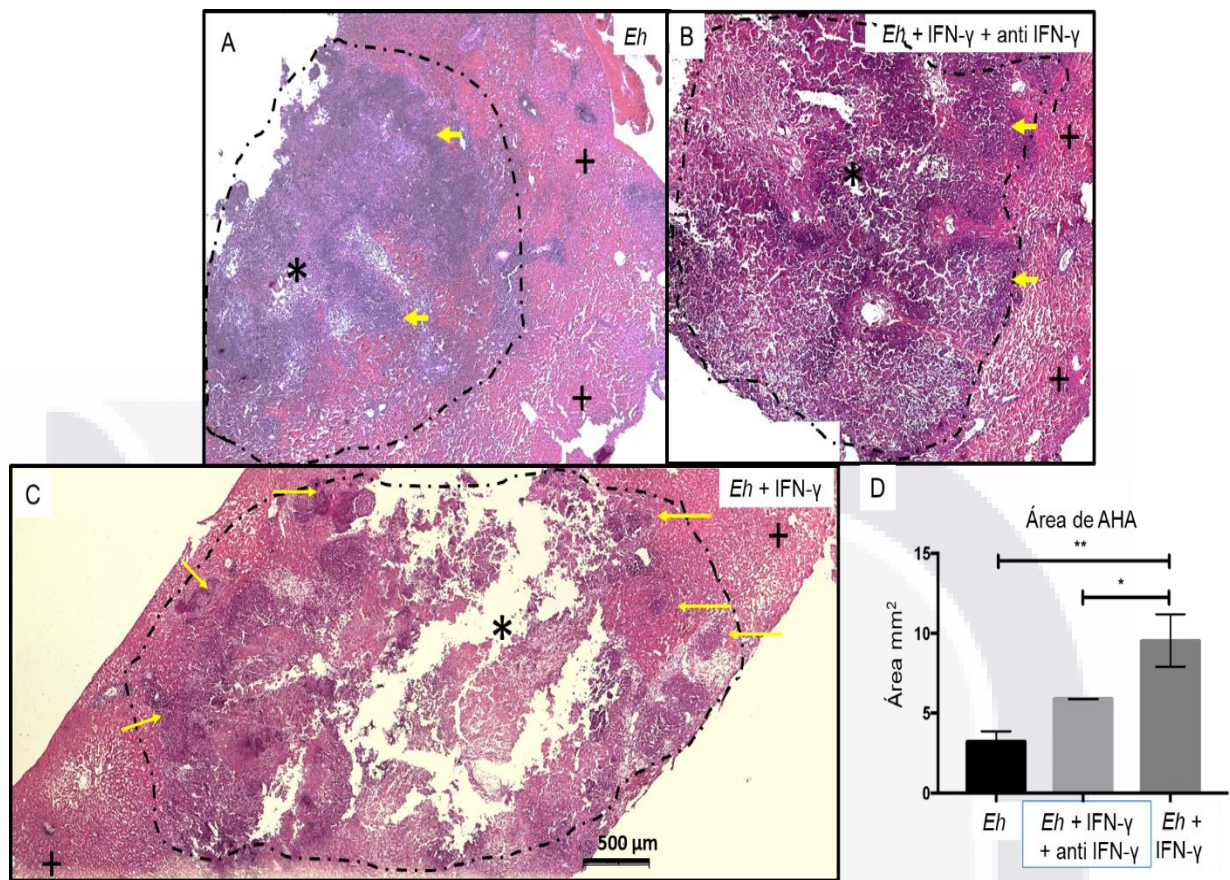


Figura 20.- Tinción de Hematoxilina y Eosina. A) Absceso hepático amebiano de desarrollo normal, el tejido necrótico se ve en el centro de la lesión (*), y en sus bordes se observa un área de infiltrado inflamatorio (puntas de flecha) que está en contacto con el área sana del hígado (+) B) Absceso formado por trofozoítos en presencia de complejo IFN- γ -anti-IFN- γ , la distribución del área necrótica y el infiltrado inflamatorio es similar al absceso inducido por la ameba normal. C) Absceso formado por trofozoítos pre-incubados con IFN- γ ; observamos el aumento en el área de absceso hepático amebiano generado por los trofozoítos, donde múltiples zonas de nuevos procesos inflamatorios (flechas amarillas), incluso en la periferia de la lesión, causada por la alta capacidad invasiva de estos trofozoítos con respecto a las condiciones anteriores. D) Cuantificación del desarrollo AHA. Las líneas discontinuas indican las zonas de desarrollo del absceso. Imágenes panorámicas en 5X. Se utilizó el ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey, * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.005$.

Posteriormente se realizó una inmunohistoquímica, en donde se pueden observar los trofozoítos de *E. histolytica* fácilmente en la periferia de la lesión (flechas amarillas; Fig. 21 A/B) y en el caso de los trofozoítos pre-incubados con IFN- γ , se encontraron en la pared de la lesión y muy cerca de tejidos sanos del hígado (Fig. 21C flecha amarilla).

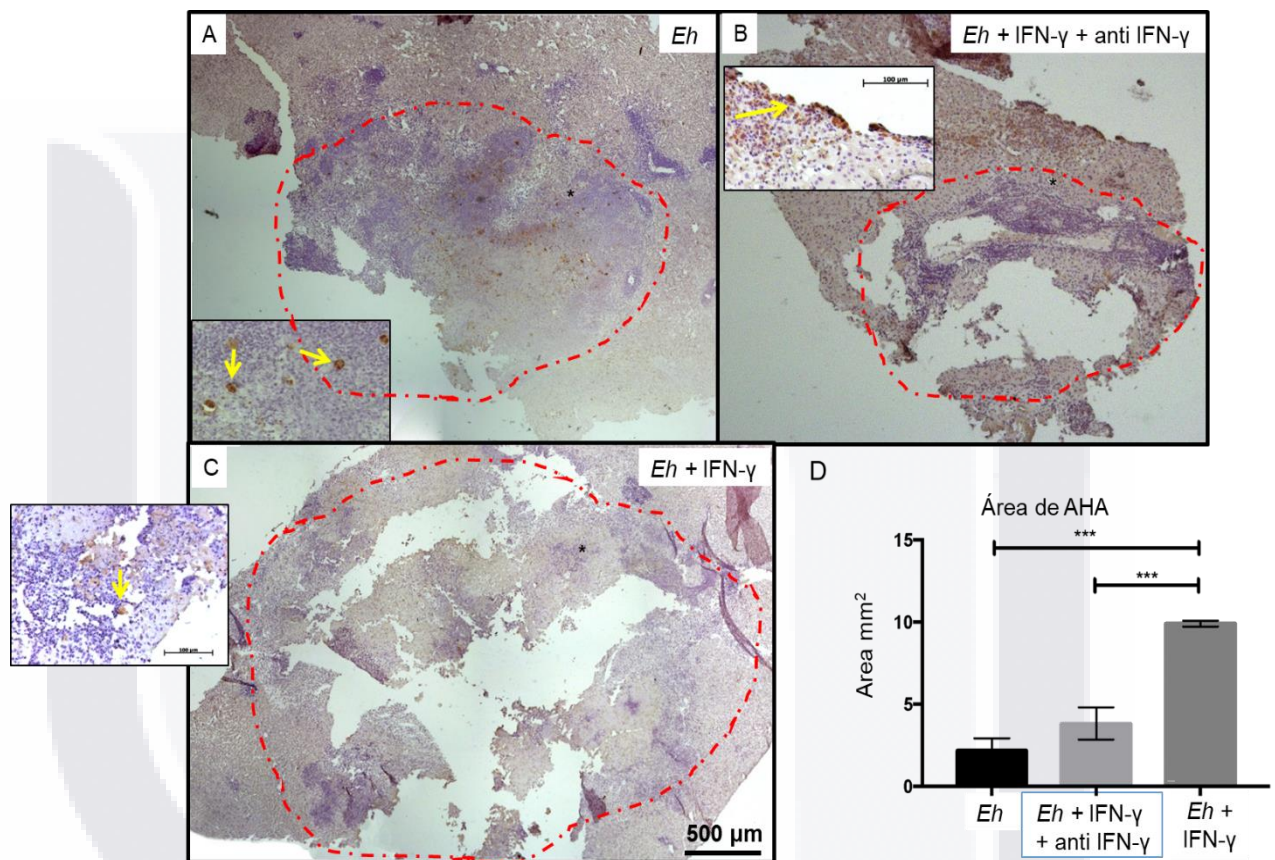


Figura 21.- Detección de trofozoítos de *E. histolytica* en AHA en hámster por inmunohistoquímica. A) Absceso formado por inoculación de trofozoítos en hígado de hámster. B) *E. histolytica* tratado con complejo IFN- γ -Anti-IFN- γ . C) Trofozoítos tratados con IFN- γ . El círculo rojo de la línea interrumpida indica la zona de desarrollo de abscesos. * Indica la zona de ubicación de los trofozoítos (recuadro 20X), D) Gráficos de daños en el área. Panorámico X5. ANOVA unidireccional y Tukey posthoc, *** = P < 0.001.

7.8 Expresión de Math1-GFP en un modelo de colitis amebiana

Uno de los órganos favoritos de la amoeba para colonizar es el inicio del intestino grueso, principalmente el ciego, donde produce la enfermedad conocida como

colitis amebiana fulminante. Por esta razón, se implementó un modelo experimental de colitis a través de la formación de un asa o bucle en la zona del ciego e inyectado trofozoítos de *E. histolytica* pre-incubados con IFN- γ , para evaluar el nivel de expresión de las células de Goblet (productoras de moco) en el colon en respuesta a la presencia del parásito. Se usaron ratones Math1 GFP que contienen la proteína verde fluorescente (GFP) que reporta la expresión de Math1 de las células Goblet.

En la figura 22A se observa el mapa de expresión Math1 en dos puntos del colon de ratones Atoh1-eGFP (la línea punteada indica la ligadura del asa colónica) se dividió en dos zonas proximal (zona del asa) y distal. Se puede observar que la actividad de Math1GFP fue más alta en la zona proximal del colon que en la distal en los ratones control. Sin embargo, en presencia de *E. histolytica* (con o sin IFN- γ) decayó significativamente en la actividad de Math1GFP en el colon proximal (zona de contacto con los trofozoítos) y un correspondiente incremento de la actividad en la zona distal. Estos resultados sugieren que *E. histolytica* suprime de alguna manera la actividad transcripcional de Math1 y con ello la presencia de líneas de células Goblet productoras de moco.

En la Figura 22B se muestra la gráfica de las mediciones de la actividad de Math1, donde en los controles, la expresión basal de Math1 fue mayor en la región proximal que en el colon distal. Y en respuesta a *E. histolytica*, la expresión de Math1 se redujo significativamente en el colon proximal y mayor en la distal sin diferencia significativa al pre-incubar a *E. histolytica* con IFN- γ .

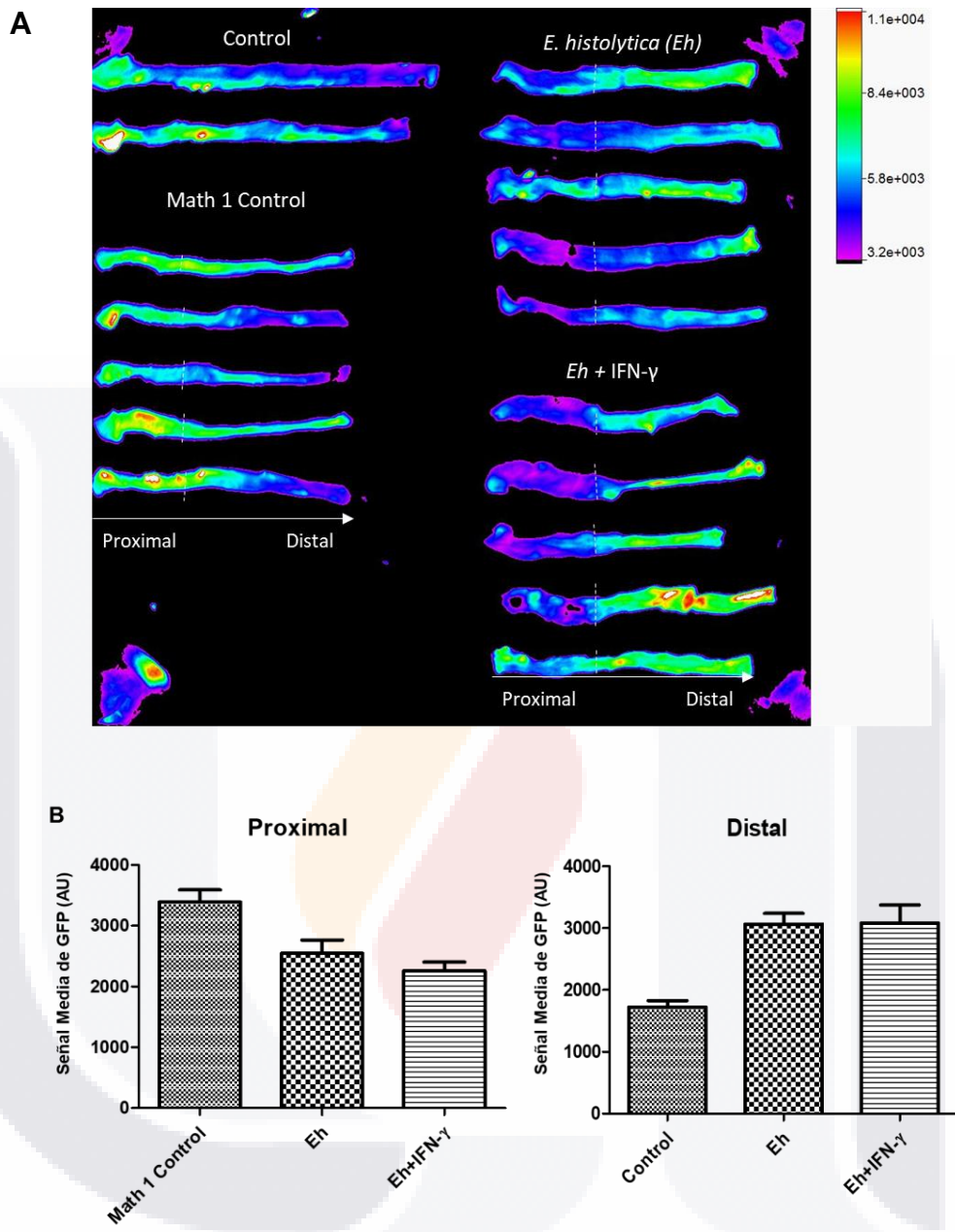


Figura 22.- *E. histolytica* suprime la expresión diferencial Math1 (GC) en un modelo de colitis ex vivo. A: mapa de expresión Math1 en ratones Math1-GFP; la línea punteada indica la ligadura del asa colónica. **B:** cuantificación de la señal de GFP en las regiones proximal y distal del colon.

8. DISCUSIONES

En la relación huésped-parásito entre *E. histolytica* y los tejidos humanos, los mecanismos que desencadenan la invasión del parásito son poco conocidos. Los principales hallazgos de nuestro estudio revelan que *E. histolytica* tiene una proteína de superficie análoga al receptor 1 de IFN- γ humano y responde a la presencia de IFN- γ para modificar su comportamiento / virulencia.

En particular, IFN- γ activó *E. histolytica* para regular la expresión de genes virulentos EhCP-A1, EhCP-A2, EhCP-A4, EhCP-A5 APA, Prx, Hgl y Cox-1. Si bien es cierto que el IFN- γ juega un papel importante en la defensa del huésped contra *E. histolytica* (Bruchhaus, Richter, and Tannich 1997); éstos hallazgos son notables y respaldan la idea de que *E. histolytica* utiliza IFN- γ en los tejidos para detectar células inflamatorias para mejorar la invasión y / o para evadir las respuestas inmunitarias. Dado que el IFN- γ está presente en los sitios de invasión por trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de macrófagos inflamatorios y células T, la evasión de la respuesta inmune podría ser el escenario más probable al regular la cisteína proteasas para degradar a las citocinas.

E. histolytica evita la respuesta inmune del huésped mediante la adherencia, la citotoxicidad o la fagocitosis de las células inflamatorias para regular negativamente las células efectoras inmunitarias y degradando los anticuerpos y el complemento (Begum, Quach, and Chadee 2015). *E. histolytica* está equipado con un arsenal de moléculas para hacer esto, incluidos amebapores, adhesinas, fosfolipasas, proteínas ricas en serina y moléculas similares a lipopeptidofosfoglicanos (Nakada-Tsukui and Nozaki 2016; Olivos-García *et al.*, 2009). Además, *E. histolytica* produce un factor inhibidor que modula la función de las células inmunitarias, incluido un factor inhibidor de la locomoción de monocitos que previene la quimiotaxis y la activación de macrófagos (Rico *et al.*, 2003). *E. histolytica* también produce L220 que estimula la producción y secreción de IL-10 a partir de macrófagos (Villalobos-Gómez *et al.*, 2018) y una citocina específica

codificada por parásitos, EhMIF, como mediador de la inflamación de la mucosa (Ngobeni *et al.*, 2017).

Se ha observado que durante la invasión amebiana en el colon, los trofozoítos de *E. histolytica* son altamente positivos para el IFN- γ localizados en la submucosa en los sitios donde los macrófagos, las células T gamma / delta y las células NK están produciendo activamente el IFN- γ (Sierra-Puente *et al.*, 2009). Así mismo nuestros hallazgos muestran que la inmunodetección de IFN- γ (anti- IFN- γ) y de una proteína receptora con el anticuerpo anti-IFN- γ R1 en la membrana de *E. histolytica* demostrando que *in vivo* e *in vitro* este parásito capta el IFN- γ al estar en contacto con él.

El IFN- γ activa a los macrófagos y neutrófilos que de manera *in vitro* eliminan a *E. histolytica* (Guo, Stroup, and Houpt 2008; Salata, Pearson, and Ravdin 1985); los altos niveles de IFN- γ se han relacionado con la resistencia a la amebiasis intestinal en niños (Haque *et al.*, 2007). En los tejidos, *E. histolytica* evade a las células inmunes del huésped a través de la fagocitosis o apoptosis (Huston *et al.*, 2003), trogocitosis (Ralston 2015) o mediante la inhibición de la producción de IFN- γ con prostaglandina E2 (PGE2) por la similar a la ciclooxigenasa (Cox) enzima (Dey *et al.*, 2003; Wang and Chadee 1995).

Mediante el análisis Western blot, se detectó la presencia de una proteína de ~200 kDa en *E. histolytica*, identificada con el anticuerpo anti-IFN- γ R1 en fracciones de membrana. Esto sugiere que el IFN- γ producido en los sitios de las lesiones donde se localiza *E. histolytica*, se une al parásito a través de la proteína de ~200 kDa. Mediante secuenciación y análisis *in silico*, la proteína de ~200 kDa (probable proteína de tirosina quinasa) mostró similitud con 50% de homología en aminoácidos y características fisicoquímicas con el motivo de unión al receptor 1 humano a IFN- γ . La unión entre IFN- γ y las células de la respuesta inmune está bien caracterizada (Bach, Aguet, and Schreiber 1997) para la actividad funcional, incluida la liberación de diversos mediadores pro-inflamatorios críticos en los procesos de

inflamación. Nuestro hallazgo de una proteína similar al receptor 1 a IFN- γ en la membrana de *E. histolytica* es notable por su homología al motivo de unión al receptor de IFN- γ humano; esto a su vez concuerda con lo descrito por Loftus *et al.*, 2005 con base en el genoma de *E. histolytica* la presencia de secuencias de proteínas similares a los receptores a citosinas y quimiocinas en humanos.

Consecuente con una proteína similar a un receptor a IFN- γ , desencadenando diferentes reacciones; la exposición de *E. histolytica* al IFN- γ aumentó la fagocitosis de los eritrocitos en 15 veces más, de una manera dependiente de STAT1 y a su vez aumentó la expresión varios genes de virulencia mejorando la adherencia a las células huésped y las proteinasas que degradan los sustratos extracelulares.

La quimiotaxis celular es un proceso inducido por un quimioatrayente permitiendo el movimiento en el medio gracias a la actividad contráctil de la actina y la miosina II que permite cambios estructurales en las células (Artemenko, Lampert, and Devreotes 2014), lo que les permite migrar a sitios específicos en respuesta a un estímulo. Es por esto que otro hallazgo importante es que el IFN- γ posee un efecto quimiotáctico sobre trofozoítos de *E. histolytica*; demostrando así que *E. histolytica* puede detectar citocinas pro-inflamatorias en las lesiones. Esto, similar a los hallazgos de otros autores en la quimiotaxis de *E. histolytica* hacia IL-8 y TNF- α (Diaz-Valencia *et al.*, 2015; Blazquez *et al.*, 2006).

El IFN- γ también aumentó la citotoxicidad de los trofozoítos de *E. histolytica* hacia las células Caco-2 y HepG2. Este efecto puede estar relacionado con el incremento en la expresión de EhCP que se observó también en nuestros hallazgos; además de una mayor regulación de la lectina Gal / GalNAc para permitir que el parásito altere las barreras mucosas innatas (Begum, Quach, and Chadee 2015; Nakada-Tsukui and Nozaki 2016; Diamond, Harlow, and Cunnick 1978). Más importante aún, como el IFN- γ puede activar los macrófagos y neutrófilos inflamatorios recién reclutados en sitios de infección que son perjudiciales para *E. histolytica*, la capacidad de *E. histolytica* para unir a IFN- γ y permitirle aumentar la

citotoxicidad hacia las células inflamatorias, representa una estrategia de evasión inmune fuerte por parte del parásito, además de su capacidad de invasión.

En los trofozoítos de *E. histolytica*, el receptor 1 de IFN- γ funciona como captador de IFN- γ exógeno, autoregulando así, al alza sus factores de virulencia (CP1, CP2, CP5, Gal-lectina) y genes de resistencia (Cox-1 y peroxiredoxina). El hecho de que el parásito tenga una proteína receptora para IFN- γ tiene un significado adaptativo de *E. histolytica* para el entorno del huésped. *E. histolytica* en presencia de IFN- γ aumenta la fagocitosis de los eritrocitos 15 veces más de manera dependiente de STAT1 y regula varios genes virulentos que aumentan la adherencia a las células huésped y las proteinasas que pueden degradar los sustratos extracelulares.

Se observó la actividad de los trofozoítos pre-incubados con IFN- γ en la formación de AHA en el hígado de hámster; donde se mostró que estos trofozoítos eran más virulentos, provocando un mayor tamaño de la lesión con granulomas múltiples y focos metastásicos a otros lóbulos hepáticos. El aumento en la formación de AHA por *E. histolytica* pre-incubados con IFN- γ es una observación novedosa y quizás sea una estrategia utilizada por los trofozoítos para diseminarse, unirse, activar diferentes mecanismos de patogenicidad y a su vez agotar el IFN- γ producido en las lesiones de AHA, modulando además la respuesta inmune del huésped. Esto es especialmente importante ya que IFN- γ puede activar macrófagos y neutrófilos inflamatorios recién reclutados en sitios de infección que son perjudiciales para los trofozoítos.

En el colon, Math1 se expresa en células epiteliales para diferenciar el linaje de células Goblet productoras de Muc2, la cual es la mucina principal secretada en el tracto gastrointestinal, formando una barrera entre la monocapa de células epiteliales y el contenido luminal que no solo consiste en nutrientes, sino que también está cargado de microorganismos potencialmente patógenos (Leon-Coria *et al.*, 2018). Esta capa de moco, secretada por las células Goblet, juega un

importante rol en el mantenimiento de la homeostasis intestinal limitando el contacto de las células epiteliales con el contenido del lumen intestinal (Cornick, Tawiah, and Chadee 2015). Leon-Coria *et al.*, en el 2018 encontraron que *E. histolytica* disminuye la actividad de Math1 en la región proximal del asa de colon y a su vez un incremento en la región distal, lo que concuerda con los resultados que se obtuvieron en nuestro trabajo y que sin embargo al poner en contacto a los trofozoítos con el IFN- γ , no presentó una diferencia significativa.

En resumen, nuestros hallazgos muestran que *E. histolytica* expresa una proteína similar al receptor 1 a IFN- γ humano que es funcional al promover la quimiotaxis y regular varios factores de virulencia clave que aumentaron la eritrofagocitosis y la citotoxicidad de las células epiteliales críticas en la patogénesis de la enfermedad y la evasión inmune.

9. CONCLUSIONES

**E. histolytica* posee un receptor a IFN- γ similar al de humano, con actividad de Tirosina-cinasa.

**E. histolytica* responde a IFN- γ , ya que promovió la quimiotaxis, aumentó la expresión de diferentes factores de patogenicidad, además de la actividad citopática y la eritrofagocitosis *in vitro*.

*El IFN- γ , promueve la eritrofagocitosis en *E. histolytica* probablemente por medio de la vía STAT1.

*Los trofozoítos de *E. histolytica* activados con IFN- γ potencian el daño histológico en un modelo de absceso hepático amebiano en hámster.

10. GLOSARIO

Absceso hepático: se define como una colección localizada de pus en el hígado, resultante de cualquier proceso infeccioso con destrucción del parénquima y el estroma hepático.

Anticuerpos: glicoproteínas del tipo gamma globulina, forman parte del sistema inmune y circulan por la sangre al ser secretadas por los linfocitos en respuesta a una infección.

Apoptosis: vía de destrucción o muerte celular programada o provocada por el mismo organismo, con el fin de controlar su desarrollo y crecimiento, puede ser de naturaleza fisiológica y está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente.

Cisteína proteasas: también conocidas como tiol proteasas, son enzimas que degradan las proteínas.

Citocina: (también denominadas citoquinas) son proteínas que regulan la función de las células que las producen sobre otros tipos celulares.

Citólisis: es el proceso por el cual la célula se rompe, es decir, que su membrana celular se descompone, perdiéndose su material genético y deteniendo sus procesos vitales.

Complemento: conjunto de proteínas séricas y de la membrana celular que interactúan entre sí y con otras moléculas de la inmunidad innata y la adaptativa para realizar funciones efectoras decisivas.

Efecto citopático: a los cambios bioquímicos y moleculares, morfológicos y de viabilidad celular, visibles a microscopía óptica provocados por un agente patológico.

Fagocitosis: es un tipo de endocitosis por el cual algunas células (fagocitos y protistas) rodean con su membrana citoplasmática partículas sólidas y las introducen al interior celular.

Forma infectiva: Forma evolutiva capaz de ingresar y desarrollarse en un hospedero susceptible.

Forma invasiva: Que tiene la capacidad de introducirse en el organismo

In vitro: se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo, o generalmente en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

In vivo: se refiere a experimentación hecha dentro o en el tejido vivo de un organismo vivo, por oposición a uno parcial o muerto.

Inmunidad adaptativa: tipo de defensa del cuerpo mediadas por células T y B después de ser expuestas a un antígeno y que tienen especificidad, diversidad, memoria y reconocimiento de lo propio y de lo ajeno.

Inmunidad innata: o inespecífica, aquellas defensas con las que nace un individuo y existen antes de la exposición a un antígeno e incluyen mecanismos anatómicos, fisiológicos, endocíticos, fagocíticos e inflamatorios.

Inmunofluorescencia: técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula

Interferones: son un grupo de proteínas señalizadores producidas y secretadas por las células hospederas como respuesta a la presencia de diversos patógenos, tales como virus, bacterias, parásitos y células tumorales.

Interleucina (IL): citosinas secretadas por los leucocitos que afectan sobre todo al crecimiento y la diferenciación de varias células hematopoyéticas y del sistema inmunitario.

Lectinas: son proteínas que se unen a azúcares con una elevada especificidad para cada tipo distinto. Su principal papel está en los fenómenos de reconocimiento, tanto a nivel molecular como celular.

Mucina: familia de proteínas de alto peso molecular y altamente glicosiladas producidas por las células de los tejidos epiteliales de la mayoría de los metazoos.

Patogenicidad: es la capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible.

Quimiotaxis: fenómeno en el cual las bacterias y otras células de organismos uni o pluricelulares dirigen sus movimientos de acuerdo con la concentración de ciertas sustancias químicas en su medio ambiente.

Virulencia: designa el carácter patogénico y nocivo de un microorganismo, como una bacteria, hongo, protozoo, microalga o virus, o en otras palabras, los mecanismos de un microbio de causar enfermedad.

Western blot: técnica de laboratorio utilizado para detectar una proteína específica en una muestra de sangre o tejido



11. BIBLIOGRAFÍA

- Adedayo, Olayinka, and Robert Nasiiro. 2004. "Intestinal Parasitoses." *Journal of the National Medical Association* 96 (1): 93–96.
- Ali, Ibne Karim M., C. Graham Clark, and William A. Petri. 2008. "Molecular Epidemiology of Amebiasis." *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 8 (5): 698–707. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.05.004>.
- Amador, Dr. n.d. "ECOLOGIA DEL PARASITISMO EN EL HOMBRE'," 17.
- Anaya-Velázquez, F., and F. Padilla-Vaca. 1992. "Effect of Intestinal Bacteria on the Virulence of *Entamoeba Histolytica*." *Archives of Medical Research* 23 (2): 183–85.
- Andrä, Jörg, Otto Berninghausen, and Matthias Leippe. 2004. "Membrane Lipid Composition Protects *Entamoeba Histolytica* from Self-Destruction by Its Pore-Forming Toxins." *FEBS Letters* 564 (1–2): 109–15. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00324-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00324-2).
- Artemenko, Yulia, Thomas J. Lampert, and Peter N. Devreotes. 2014. "Moving towards a Paradigm: Common Mechanisms of Chemotactic Signaling in Dictyostelium and Mammalian Leukocytes." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 71 (19): 3711–47. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1638-8>.
- Ávila, Eva E., Norma Salaiza, Julieta Pulido, Mayra C. Rodríguez, César Díaz-Godínez, Juan P. Laclette, Ingeborg Becker, and Julio C. Carrero. 2016. "*Entamoeba Histolytica* Trophozoites and Lipopeptidophosphoglycan Trigger Human Neutrophil Extracellular Traps." *PLoS ONE* 11 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158979>.
- Bach, Erika A., Michel Aguet, and Robert D. Schreiber. 1997. "THE IFN γ RECEPTOR: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling." *Annual Review of Immunology* 15 (1): 563–91. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.563>.

- Bailey, G. B., G. J. Leitch, and D. B. Day. 1985. "Chemotaxis by *Entamoeba Histolytica*." *The Journal of Protozoology* 32 (2): 341–46.
- Begum, Sharmin, Jeanie Quach, and Kris Chadee. 2015. "Immune Evasion Mechanisms of *Entamoeba Histolytica*: Progression to Disease." *Frontiers in Microbiology* 6 (December). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01394>.
- Bekker-Mendez, Vilma Carolina, Viola Leticia Pérez-Castillo, María Guadalupe Rico-Rosillo, Martha Pérez-Rodríguez, Jorge Arellano-Blanco, Roberto Rodolfo Kretschmer-Schmid, and Patricia Talamás-Rohana. 2006. "Downregulation of Selected Cytokines in Amebiasis." *Archives of Medical Research* 37 (4): 556–58. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.09.018>.
- Belley, A., and K. Chadee. 1999. "Prostaglandin E (2) Stimulates Rat and Human Colonic Mucin Exocytosis via the EP(4) Receptor." *Gastroenterology* 117 (6): 1352–62.
- Betanzos, Abigail, Rosario Javier-Reyna, Guillermina García-Rivera, Cecilia Bañuelos, Lorenza González-Mariscal, Michael Schnoor, and Esther Orozco. 2013. "The EhCPADH112 Complex of *Entamoeba histolytica* Interacts with Tight Junction Proteins Occludin and Claudin-1 to Produce Epithelial Damage." *PloS One* 8 (6): e65100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065100>.
- Bhattacharya, A., Monika T. Anand, Jayshree Paul, Nagendra Yadav, and S. Bhattacharya. 1998. "Molecular Changes in *Entamoeba histolytica* in Response to Bacteria1." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45 (2): 28S-33S. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1998.tb04521.x>.
- Blazquez, S., C. Zimmer, G. Guigon, J.-C. Olivo-Marin, N. Guillen, and E. Labruyere. 2006. "Human Tumor Necrosis Factor Is a Chemoattractant for the Parasite *Entamoeba Histolytica*." *Infection and Immunity* 74 (2): 1407–11. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.1407-1411.2006>.
- BRADFORD, MARION M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72: 248–54.

- Bredeston, Luis M., Carolina E. Caffaro, John Samuelson, and Carlos B. Hirschberg. 2005. "Golgi and Endoplasmic Reticulum Functions Take Place in Different Subcellular Compartments of *Entamoeba Histolytica*." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (37): 32168–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507035200>.
- Bruchhaus, I, S Richter, and E Tannich. 1997. "Removal of Hydrogen Peroxide by the 29 KDa Protein of *Entamoeba Histolytica*." *Biochemical Journal* 326 (Pt 3): 785–89.
- Bruckner, D A. 1992. "Amebiasis." *Clinical Microbiology Reviews* 5 (4): 356–69.
- Casados-Vázquez, Luz E., Samuel Lara-González, and Luis G. Brieba. 2011. "Crystal Structure of the Cysteine Protease Inhibitor 2 from *Entamoeba Histolytica*: Functional Convergence of a Common Protein Fold." *Gene* 471 (1–2): 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.10.006>.
- Castellanos, C, C Ramos, and L Ortiz-Ortiz. 1989. "Effects of Gamma Interferon on Syntheses of DNA and Proteins by *Entamoeba Histolytica*." *Infection and Immunity* 57 (9): 2771–75.
- Chadee, K, W A Petri, D J Innes, and J I Ravdin. 1987. "Rat and Human Colonic Mucins Bind to and Inhibit Adherence Lectin of *Entamoeba Histolytica*." *Journal of Clinical Investigation* 80 (5): 1245–54.
- Chadee, Kris, Kathy Keller, Janet Forstner, Donald J. Innes, and Jonathan I. Ravdin. 1991. "Mucin and Nonmucin Secretagogue Activity of *Entamoeba Histolytica* and Cholera Toxin in Rat Colon." *Gastroenterology* 100 (4): 986–97. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(91\)90274-O](https://doi.org/10.1016/0016-5085(91)90274-O).
- Charles R. Sterling, and Adam D. 2004. "The Pathogenic Enteric Protozoa: - Giardia, *Entamoeba*, *Cryptosporidium* and *Cyclospora* | Charles R. Sterling | Springer." 2004. <https://www.springer.com/gp/book/9781402077944>.
- Chávez-Munguía, Bibiana, Patricia Talamás-Rohana, Guadalupe Castañón, Lizbeth Salazar-Villatoro, Verónica Hernández-Ramírez, and Adolfo Martínez-Palomo. 2012. "Differences in Cap Formation between Invasive *Entamoeba Histolytica* and Non-Invasive *Entamoeba Dispar*." *Parasitology Research* 111 (1): 215–21. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2820-2>.

- Cornick, Steve, Adelaide Tawiah, and Kris Chadee. 2015. "Roles and Regulation of the Mucus Barrier in the Gut." *Tissue Barriers* 3 (1–2): e982426. <https://doi.org/10.4161/21688370.2014.982426>.
- Cruz-Vera, Jorge, L. Clara, R. Hernández-Kelly, J. Alfredo MÃ©ndez, Eduardo PÃ©rez-Salazar, and Arturo Ortega. 2003. "Collagen-Induced STAT Family Members Activation in *Entamoeba Histolytica* Trophozoites." *FEMS Microbiology Letters* 229 (2): 203–9. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00822-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00822-X).
- Davis, Paul H., Xiaochun Zhang, Jianhua Guo, R. Reid Townsend, and Samuel L. Stanley. 2006. "Comparative Proteomic Analysis of Two *Entamoeba Histolytica* Strains with Different Virulence Phenotypes Identifies Peroxiredoxin as an Important Component of Amoebic Virulence." *Molecular Microbiology* 61 (6): 1523–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05344.x>.
- Davis, Paul H., Zhi Zhang, Minghe Chen, Xiaochun Zhang, Subhra Chakraborty, and Samuel L. Stanley. 2006. "Identification of a Family of BspA like Surface Proteins of *Entamoeba Histolytica* with Novel Leucine Rich Repeats." *Molecular and Biochemical Parasitology* 145 (1): 111–16. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.08.017>.
- Dey, Indranil, and Kris Chadee. 2008. "Prostaglandin E2 Produced by *Entamoeba Histolytica* Binds to EP4 Receptors and Stimulates Interleukin-8 Production in Human Colonic Cells." *Infection and Immunity* 76 (11): 5158–63. <https://doi.org/10.1128/IAI.00645-08>.
- Dey, Indranil, Kathy Keller, Adam Belley, and Kris Chadee. 2003. "Identification and Characterization of a Cyclooxygenase-like Enzyme from *Entamoeba Histolytica*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (23): 13561–66. <https://doi.org/10.1073/pnas.1835863100>.
- Diamond, L. S., D. R. Harlow, and C. C. Cunnick. 1978. "A New Medium for the Axenic Cultivation of *Entamoeba Histolytica* and Other *Entamoeba*." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72 (4): 431–32.

- Diaz-Valencia, J. Daniel, Eloy Andrés Pérez-Yépez, Jorge Tonatiuh Ayala-Sumuano, Elizabeth Franco, and Isaura Meza. 2015a. "A Surface Membrane Protein of *Entamoeba Histolytica* Functions as a Receptor for Human Chemokine IL-8: Its Role in the Attraction of Trophozoites to Inflammation Sites." *International Journal for Parasitology* 45 (14): 915–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.07.007>.
- Elnekave, Keren, Rama Siman-Tov, and Serge Ankri. 2003. "Consumption of L-Arginine Mediated by *Entamoeba Histolytica* L-Arginase (EhArg) Inhibits Amoebicidal Activity and Nitric Oxide Production by Activated Macrophages." *Parasite Immunology* 25 (11–12): 597–608. <https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00669.x>.
- Espinosa-Cantellano, Martha, and Adolfo Martínez-Palomo. 2000. "Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease." *Clinical Microbiology Reviews* 13 (2): 318–31.
- Flores-Romo, L., V. Tsutsumi, T. Estrada-García, M. Shibayama, J. P. Aubry, K. B. Bacon, and A. Martínez-Palomo. 1994. "CD59 (Protectin) Molecule, Resistance to Complement, and Virulence of *Entamoeba Histolytica*." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88 (1): 116–17.
- Franco, Elizabeth, Jose Vazquez-Prado, and Isaura Meza. 1997. "Fibronectin-Derived Fragments as Inducers of Adhesion and Chemotaxis of *Entamoeba Histolytica* Trophozoites." *J Infect*, 6.
- Garcia-Nieto, R. M., R. Rico-Mata, S. Arias-Negrete, and E. E. Avila. 2008. "Degradation of Human Secretory IgA1 and IgA2 by *Entamoeba Histolytica* Surface-Associated Proteolytic Activity." *Parasitology International* 57 (4): 417–23. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.04.013>.
- GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. 2015. "Global, Regional, and National Age-Sex Specific All-Cause and Cause-Specific Mortality for 240 Causes of Death, 1990-2013: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2013." *Lancet (London, England)* 385 (9963): 117–71. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61682-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61682-2).

- Ghadirian, E., and M. Denis. 1992. "In Vivo Activation of Macrophages by IFN-Gamma to Kill *Entamoeba Histolytica* Trophozoites in Vitro." *Parasite Immunology* 14 (4): 397–404.
- Ghosh, Sudip, Jessica Field, Rick Rogers, Mark Hickman, and John Samuelson. 2000. "The *Entamoeba Histolytica* Mitochondrion-Derived Organelle (Crypton) Contains Double-Stranded DNA and Appears To Be Bound by a Double Membrane." *Infection and Immunity* 68 (7): 4319–22.
- Gilchrist, C. A., and W. A. Petri. 1999. "Virulence Factors of *Entamoeba Histolytica*." *Current Opinion in Microbiology* 2 (4): 433–37. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80076-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80076-9).
- Gilmartin, Allissia A., Katherine S. Ralston, and William A. Petri. 2017. "Inhibition of Amebic Lysosomal Acidification Blocks Amebic Trophocytosis and Cell Killing." *MBio* 8 (4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01187-17>.
- Gómez J., Cortés A., Cuervo I., López M. 2007. "Intestinal Amebiasis." 2007. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922007000100006.
- Goncalves, Marcelo Luiz Carvalho, Valmir Laurentino da Silva, Carlos Mauricio de Andrade, Karl Reinhard, Gino Chaves da Rocha, Matthieu Le Bailly, Françoise Bouchet, Luiz Fernando Ferreira, and Aduino Araujo. 2004. "Amoebiasis Distribution in the Past: First Steps Using an Immunoassay Technique." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98 (2): 88–91.
- Goplen, Michael, Manigandan Lejeune, Steve Cornick, France Moreau, and Kris Chadee. 2013. "*Entamoeba Histolytica* Contains an Occludin-Like Protein That Can Alter Colonic Epithelial Barrier Function." *PLoS ONE* 8 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073339>.
- Guo, X, S E Stroup, and E R Houpt. 2008. "Persistence of *Entamoeba Histolytica* Infection in CBA Mice Owes to Intestinal IL-4 Production and Inhibition of Protective IFN- γ ." *Mucosal Immunology* 1 (2): 139–46. <https://doi.org/10.1038/mi.2007.18>.

- Haque, Rashidul, Ibnekarim M. Ali, R. Bradley Sack, Barry M. Farr, Girija Ramakrishnan, and William A. Petri. 2001. "Amebiasis and Mucosal IgA Antibody against the *Entamoeba Histolytica* Adherence Lectin in Bangladeshi Children." *The Journal of Infectious Diseases* 183 (12): 1787–93. <https://doi.org/10.1086/320740>.
- Haque, Rashidul, Dinesh Mondal, Jianfen Shu, Shantanu Roy, Mamun Kabir, Andrea N. Davis, Priya Duggal, and William A. Petri. 2007. "Correlation of Interferon- γ Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells with Childhood Malnutrition and Susceptibility to Amebiasis." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76 (2): 340–44.
- Huston, Christopher D., Douglas R. Boettner, Vanessa Miller-Sims, and William A. Petri, Jr. 2003. "Apoptotic Killing and Phagocytosis of Host Cells by the Parasite *Entamoeba Histolytica*." *Infection and Immunity* 71 (2): 964–72. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.964-972.2003>.
- Katz, Uriel, Serge Ankri, Tamara Stolarsky, Yael Nuchamowitz, and David Mirelman. 2002. "*Entamoeba Histolytica* Expressing a Dominant Negative N-Truncated Light Subunit of Its Gal-Lectin Are Less Virulent." *Molecular Biology of the Cell* 13 (12): 4256–65. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-06-0344>.
- Lee, Jongweon, Soon-Jung Park, and Tai-Soon Yong. 2008. "Effect of Iron on Adherence and Cytotoxicity of *Entamoeba Histolytica* to CHO Cell Monolayers." *The Korean Journal of Parasitology* 46 (1): 37–40. <https://doi.org/10.3347/kjp.2008.46.1.37>.
- Leon-Coria, Aralia, Manish Kumar, France Moreau, and Kris Chadee. 2018. "Defining Cooperative Roles for Colonic Microbiota and Muc2 Mucin in Mediating Innate Host Defense against *Entamoeba Histolytica*." *PLoS Pathogens* 14 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007466>.
- Leroy, A, G De Bruyne, M Mareel, C Nokkaew, G Bailey, and H Nelis. 1995. "Contact-Dependent Transfer of the Galactose-Specific Lectin of *Entamoeba Histolytica* to the Lateral Surface of Enterocytes in Culture." *Infection and Immunity* 63 (11): 4253–60.

- Li, E, W F Stenson, C Kunz-Jenkins, P E Swanson, R Duncan, and S L Stanley. 1994. "Entamoeba Histolytica Interactions with Polarized Human Intestinal Caco-2 Epithelial Cells." *Infection and Immunity* 62 (11): 5112–19.
- Lidell, Martin E., Darcy M. Moncada, Kris Chadee, and Gunnar C. Hansson. 2006. "Entamoeba Histolytica Cysteine Proteases Cleave the MUC2 Mucin in Its C-Terminal Domain and Dissolve the Protective Colonic Mucus Gel." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (24): 9298–9303. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600623103>.
- Lin, J Y, R Seguin, K Keller, and K Chadee. 1994. "Tumor Necrosis Factor Alpha Augments Nitric Oxide-Dependent Macrophage Cytotoxicity against Entamoeba Histolytica by Enhanced Expression of the Nitric Oxide Synthase Gene." *Infection and Immunity* 62 (5): 1534–41.
- Loftus, Brendan, Iain Anderson, Rob Davies, U. Cecilia M. Alsmark, John Samuelson, Paolo Amedeo, Paola Roncaglia, et al. 2005. "The Genome of the Protist Parasite Entamoeba Histolytica." *Nature* 433 (7028): 865–68. <https://doi.org/10.1038/nature03291>.
- Lozano, Rafael, Mohsen Naghavi, Kyle Foreman, Stephen Lim, Kenji Shibuya, Victor Aboyans, Jerry Abraham, et al. 2012. "Global and Regional Mortality from 235 Causes of Death for 20 Age Groups in 1990 and 2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2010." *Lancet (London, England)* 380 (9859): 2095–2128. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0).
- Maher, S. G., A. L. Romero-Weaver, A. J. Scarzello, and A. M. Gamero. 2007. "Interferon: Cellular Executioner or White Knight?" *Current Medicinal Chemistry* 14 (12): 1279–89.
- Mancilla-Herrera, Ismael, Alfonso Méndez-Tenorio, Isabel Wong-Baeza, Alexis P Jiménez-Urbe, Marcela Alcántara-Hernández, Ramon Ocadiz-Ruiz, Mario A Moreno-Eutimio, et al. 2012. "A Toll/IL-1R/Resistance Domain-Containing Thioredoxin Regulates Phagocytosis in Entamoeba Histolytica." *Parasites & Vectors* 5 (1): 224. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-224>.

- Marie, Chelsea, and William A. Petri. 2014. "Regulation of Virulence of *Entamoeba Histolytica*." *Annual Review of Microbiology* 68: 493–520. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103550>.
- Martínez-Palomo, A. 1987. "The Pathogenesis of Amoebiasis." *Parasitology Today* 3 (4): 111–18. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(87\)90048-2](https://doi.org/10.1016/0169-4758(87)90048-2).
- Martinez-Palomo, A., V. Tsutsumi, F. Anaya-Velazquez, and A. Gonzalez-Robles. 1989. "Ultrastructure of Experimental Intestinal Invasive Amebiasis." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41 (3): 273–79. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.41.273>.
- Martinez-Palomo, Espinosa-Cantellano. 1991. "The Plasma Membrane of *Entamoeba Histolytica*: Structure and Dynamics* - Espinosa-Cantellano - 1991 - Biology of the Cell - Wiley Online Library." 1991. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1768-322X.1991.tb03015.x>.
- Mata-Espinosa, Dulce A., and Rogelio Hernández-Pando. 2008. "Interferón gamma: aspectos básicos, importancia clínica y usos terapéuticos." *Revista de Investigación Clínica* 60 (5): 421–31.
- Matthiesen, Jenny, Ann-Katrein Bär, Anne-Kathrin Bartels, Dennis Marien, Susann Ofori, Laura Biller, Egbert Tannich, Hannelore Lotter, and Iris Bruchhaus. 2013. "Overexpression of Specific Cysteine Peptidases Confers Pathogenicity to a Nonpathogenic *Entamoeba Histolytica* Clone." *MBio* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00072-13>.
- Mitchell, Piers D. 2017. "Human Parasites in the Roman World: Health Consequences of Conquering an Empire." *Parasitology* 144 (1): 48–58. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001651>.
- Moncada, Darcy, Kathy Keller, and Kris Chadee. 2003. "*Entamoeba Histolytica* Cysteine Proteinases Disrupt the Polymeric Structure of Colonic Mucin and Alter Its Protective Function." *Infection and Immunity* 71 (2): 838–44. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.838-844.2003>.
- Moonah, Shannon N., Nona M. Jiang, and William A. Petri. 2013. "Host Immune Response to Intestinal Amebiasis." *PLoS Pathogens* 9 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003489>.

- Mortimer, Leanne, and Kris Chadee. 2010. "The Immunopathogenesis of *Entamoeba Histolytica*." *Experimental Parasitology* 126 (3): 366–80. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.03.005>.
- Mortimer, Leanne, France Moreau, Steve Cornick, and Kris Chadee. 2015. "The NLRP3 Inflammasome Is a Pathogen Sensor for Invasive *Entamoeba Histolytica* via Activation of A5 β 1 Integrin at the Macrophage-Amebae Intercellular Junction." Edited by William A. Petri. *PLOS Pathogens* 11 (5): e1004887. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004887>.
- Munro, B. H. 1971. "Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology." *Pathology* 3 (3): 249. [https://doi.org/10.1016/S0031-3025\(16\)39410-7](https://doi.org/10.1016/S0031-3025(16)39410-7).
- Nakada-Tsukui, Kumiko, and Tomoyoshi Nozaki. 2016. "Immune Response of Amebiasis and Immune Evasion by *Entamoeba Histolytica*." *Frontiers in Immunology* 7 (May). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00175>.
- Ngobeni, Renay, Mayuresh M. Abhyankar, Nona M. Jiang, Laura A. Farr, Amidou Samie, Rashidul Haque, and Shannon N. Moonah. 2017. "*Entamoeba Histolytica*-Encoded Homolog of Macrophage Migration Inhibitory Factor Contributes to Mucosal Inflammation during Amebic Colitis." *The Journal of Infectious Diseases* 215 (8): 1294–1302. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix076>.
- Olivos-García, A., E. Saavedra, E. Ramos-Martínez, M. Nequiz, and R. Pérez-Tamayo. 2009. "Molecular Nature of Virulence in *Entamoeba Histolytica*." *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 9 (6): 1033–37. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.04.005>.
- Orozco, E., R. Gharaibeh, A. M. Riverón, D. M. Delgadillo, M. Mercado, T. Sánchez, E. Gómez Conde, M. A. Vargas, and R. López-Revilla. 1997. "A Novel Cytoplasmic Structure Containing DNA Networks in *Entamoeba Histolytica* Trophozoites." *Molecular & General Genetics: MGG* 254 (3): 250–57.
- Ortíz, L., y Avella, L. (1984). Respuesta en infecciones por *Entamoeba histolytica*. *Inmunología*. 3: 5-11.

- Padilla-Vaca, F., S. Ankri, R. Bracha, L. A. Koole, and D. Mirelman. 1999. "Down Regulation of *Entamoeba Histolytica* Virulence by Monoxenic Cultivation with Escherichia Coli O55 Is Related to a Decrease in Expression of the Light (35-Kilodalton) Subunit of the Gal/GalNAc Lectin." *Infection and Immunity* 67 (5): 2096–2102.
- Perez-Yepey, Eloy Andres, Jorge-Tonatiuh Ayala-Sumuano, Ruth Lezama, and Isaura Meza. 2014. "A Novel β -Catenin Signaling Pathway Activated by IL-1 β Leads to the Onset of Epithelial–Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells." *Cancer Letters* 354 (1): 164–71. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.08.015>.
- Pestka, Sidney, Christopher D. Krause, and Mark R. Walter. 2004. "Interferons, Interferon-like Cytokines, and Their Receptors." *Immunological Reviews* 202 (December): 8–32. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x>.
- Peterson, Kristine M., Jianfen Shu, Priya Duggal, Rashidul Haque, Dinesh Mondal, and William A. Petri. 2010. "Association between TNF-Alpha and *Entamoeba Histolytica* Diarrhea." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82 (4): 620–25. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0493>.
- Petri, William A., Rashidul Haque, and Barbara J. Mann. 2002. "The Bittersweet Interface of Parasite and Host: Lectin-Carbohydrate Interactions During Human Invasion by the Parasite *Entamoeba Histolytica*." *Annual Review of Microbiology* 56 (1): 39–64. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160959>.
- Petri, William A, and Ronald L Schnaar. 1995. "Purification and Characterization of Galactose- and N-Acetylgalactosamine-Specific Adhesin Lectin of *Entamoeba Histolytica*." In *Methods in Enzymology*, 253:98–104. Adhesion of Microbial Pathogens. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(95\)53011-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(95)53011-8).
- Pinilla, Análida Elizabeth, Myriam Consuelo López, and Diego Fernando Viasus. 2008. "Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*." *Revista médica de Chile* 136 (1). <https://doi.org/10.4067/S0034-98872008000100015>.

- Pumarola A., Rodríguez-Torres A., and García-Rodríguez A. 1999. "Microbiología y Parasitología Médica." *Scribd*. 1999. <https://es.scribd.com/doc/163003303/Microbiologia-y-Parasitologia-Medica-Pumarola-copia>.
- Que, X., and S. L. Reed. 2000. "Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis." *Clinical Microbiology Reviews* 13 (2): 196–206. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.196-206.2000>.
- Rafiei, A., A. Ajami, M. Hajilooi, and A. Etemadi. 2009. "Th-1/Th-2 Cytokine Pattern in Human Amoebic Colitis." *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS* 12 (20): 1376–80.
- Ralston, Katherine S. 2015. "Taking a Bite: Amoebic Trophocytosis in *Entamoeba Histolytica* and Beyond." *Current Opinion in Microbiology* 28 (December): 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.07.009>.
- Ralston, Katherine S., and William A. Petri. 2011. "Tissue Destruction and Invasion by *Entamoeba Histolytica*." *Trends in Parasitology* 27 (6): 254–63. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.02.006>.
- Rana R. et al.,. 2013. "Bacterial TIR-Containing Proteins and Host Innate Immune System Evasion. - PubMed - NCBI." 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22772799>.
- Ravdin, Jonathan I., and Richard L. Guerrant. 1981. "Role of Adherence in Cytopathogenic Mechanisms of *Entamoeba Histolytica*." *Journal of Clinical Investigation* 68 (5): 1305–13.
- Reed, S. L., J. G. Curd, I. Gigli, F. D. Gillin, and A. I. Braude. 1986. "Activation of Complement by Pathogenic and Nonpathogenic *Entamoeba Histolytica*." *The Journal of Immunology* 136 (6): 2265–70.
- Regueiro, J. Lopez, C. González, S. Martínez, E. 2002. Técnicas empleadas en la inmunología. En: Inmunología, Biología y patología del sistema inmune. 3ª. Editorial Panamericana. España. 218 p.
- Rico, G., E. Leandro, S. Rojas, J. A. Giménez, and R. R. Kretschmer. 2003. "The Monocyte Locomotion Inhibitory Factor Produced by *Entamoeba Histolytica*

- Inhibits Induced Nitric Oxide Production in Human Leukocytes." *Parasitology Research* 90 (4): 264–67. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0780-7>.
- Rosales-Encina, J. L., I. Meza, A. López-De-León, P. Talamás-Rohana, and M. Rojkind. 1987. "Isolation of a 220-Kilodalton Protein with Lectin Properties from a Virulent Strain of *Entamoeba Histolytica*." *The Journal of Infectious Diseases* 156 (5): 790–97. <https://doi.org/10.1093/infdis/156.5.790>.
- Sabeti, P. C., S. F. Schaffner, B. Fry, J. Lohmueller, P. Varilly, O. Shamovsky, A. Palma, T. S. Mikkelsen, D. Altshuler, and E. S. Lander. 2006. "Positive Natural Selection in the Human Lineage." *Science (New York, N.Y.)* 312 (5780): 1614–20. <https://doi.org/10.1126/science.1124309>.
- Salata, R. A., A. Martinez-Palomo, H. W. Murray, L. Conales, N. Trevino, E. Segovia, C. F. Murphy, and J. I. Ravdin. 1986. "Patients Treated for Amebic Liver Abscess Develop Cell-Mediated Immune Responses Effective in Vitro against *Entamoeba Histolytica*." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 136 (7): 2633–39.
- Salata, R. Pearson, and J. I. Ravdin. 1985. "Interaction of Human Leukocytes and *Entamoeba Histolytica*. Killing of Virulent Amebae by the Activated Macrophage." *The Journal of Clinical Investigation* 76 (2): 491–99. <https://doi.org/10.1172/JCI111998>.
- Schneider, Caroline A., Wayne S. Rasband, and Kevin W. Eliceiri. 2012. "NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis." *Nature Methods* 9 (7): 671–75.
- Séguin, R, B J Mann, K Keller, and K Chadee. 1997. "The Tumor Necrosis Factor Alpha-Stimulating Region of Galactose-Inhibitable Lectin of *Entamoeba Histolytica* Activates Gamma Interferon-Primed Macrophages for Amebicidal Activity Mediated by Nitric Oxide." *Infection and Immunity* 65 (7): 2522–27.
- Seydel, K, J. Smith, and L. Stanley. 2000. "Innate Immunity to Amebic Liver Abscess Is Dependent on Gamma Interferon and Nitric Oxide in a Murine Model of Disease." *Infection and Immunity* 68 (1): 400–402.
- Seydel*,‡, Karl B., Ellen Li*,§, Zhi Zhang*, and Samuel L. Stanley. 1998. "Epithelial Cell-Initiated Inflammation Plays a Crucial Role in Early Tissue Damage in

- Amebic Infection of Human Intestine.” *Gastroenterology* 115 (6): 1446–53. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70023-X](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70023-X).
- Sierra-Puente, R., R. Campos-Rodríguez, R. A. Jarillo-Luna, L. Muñoz-Fernández, M. G. Rodríguez, M. Muñoz-Ortega, and J. Ventura-Juárez. 2009. “Expression of Immune Modulator Cytokines in Human Fulminant Amoebic Colitis.” *Parasite Immunology* 31 (7): 384–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01118.x>.
- Sim, Seobo, Tai-Soon Yong, Soon-Jung Park, Kyung-Il Im, Yoon Kong, Jae-Sook Ryu, Duk-Young Min, and Myeong Heon Shin. 2005. “NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species-Mediated Activation of ERK1/2 Is Required for Apoptosis of Human Neutrophils Induced by *Entamoeba Histolytica*.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (7): 4279–88.
- Stuart, Lynda M., and R. Alan B. Ezekowitz. 2005. “Phagocytosis: Elegant Complexity.” *Immunity* 22 (5): 539–50. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.05.002>.
- Talamás-Lara, Daniel, Bibiana Chávez-Munguía, Arturo González-Robles, Patricia Talamás-Rohana, Lizbeth Salazar-Villatoro, Ángel Durán-Díaz, and Adolfo Martínez-Palomo. 2014. “Erythrophagocytosis in *Entamoeba Histolytica* and *Entamoeba Dispar*: A Comparative Study.” *BioMed Research International* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/626259>.
- Talamás-Rohana, P, M A Schlie-Guzmán, V I Hernández-Ramírez, and J L Rosales-Encina. 1995. “T-Cell Suppression and Selective in Vivo Activation of TH2 Subpopulation by the *Entamoeba Histolytica* 220-Kilodalton Lectin.” *Infection and Immunity* 63 (10): 3953–58.
- Tillack, Manuela, Nicolas Nowak, Hannelore Lotter, Rivka Bracha, David Mirelman, Egbert Tannich, and Iris Bruchhaus. 2006. “Increased Expression of the Major Cysteine Proteinases by Stable Episomal Transfection Underlines the Important Role of EhCP5 for the Pathogenicity of *Entamoeba Histolytica*.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 149 (1): 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.04.009>.

- Tse, S K, and K Chadee. 1992. "Biochemical Characterization of Rat Colonic Mucins Secreted in Response to *Entamoeba Histolytica*." *Infection and Immunity* 60 (4): 1603–12.
- Tsutsumi, V., R. Mena-Lopez, F. Anaya-Velazquez, and A. Martinez-Palomo. 1984. "Cellular Bases of Experimental Amebic Liver Abscess Formation." *The American Journal of Pathology* 117 (1): 81–91.
- Ventura-Juárez, J., R. Campos-Rodríguez, R. A. Jarillo-Luna, L. Muñoz-Fernández, J. A. Escario-G-Trevijano, J. Pérez-Serrano, J. L. Quintanar, E. Salinas, and F. R. Villalobos-Gómez. 2009. "Trophozoites of *Entamoeba Histolytica* Express a CD59-like Molecule in Human Colon." *Parasitology Research* 104 (4): 821–26. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1262-3>.
- Ventura-Juarez, Javier, Rafael Campos-Rodríguez, and V Tsutsumi. 2002. "Early Interactions of *Entamoeba Histolytica* Trophozoites with Parenchymal and Inflammatory Cells in the Hamster Liver: An Immunocytochemical Study." *Canadian Journal of Microbiology* 48 (March): 123–31. <https://doi.org/10.1139/w01-136>.
- Villalobos-Gómez, Fabiola del Rocío, Mario García-Lorenzana, Galileo Escobedo, Patricia Talamás-Rohana, Rogelio Salinas-Gutiérrez, Verónica-Ivonne Hernández-Ramírez, Esperanza Sánchez-Alemán, María del Rosario Campos-Esparza, Martín Humberto Muñoz-Ortega, and Javier Ventura-Juárez. 2018. "*Entamoeba Histolytica* L220 Induces the in Vitro Activation of Macrophages and Neutrophils and Is Modulated by Neurotransmitters." *Acta Parasitologica* 63 (2): 270–79. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0031>.
- Vivanco-Cid, H., C. Alpuche-Aranda, I. Wong-Baeza, L. M. Rocha-Ramírez, N. Rios-Sarabia, I. Estrada-Garcia, M. A. Villasis-Keever, C. Lopez-Macias, and A. Isibasi. 2007. "Lipopopeptidophosphoglycan from *Entamoeba Histolytica* Activates Human Macrophages and Dendritic Cells and Reaches Their Late Endosomes." *Parasite Immunology* 29 (9): 467–74. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00963.x>.
- Wang, W., and K. Chadee. 1995. "*Entamoeba Histolytica* Suppresses Gamma Interferon-Induced Macrophage Class II Major Histocompatibility Complex Ia

- Molecule and I-A Beta mRNA Expression by a Prostaglandin E2-Dependent Mechanism.” *Infection and Immunity* 63 (3): 1089–94.
- Wang, W, K Keller, and K Chadee. 1994. “*Entamoeba Histolytica* Modulates the Nitric Oxide Synthase Gene and Nitric Oxide Production by Macrophages for Cytotoxicity against Amoebae and Tumour Cells.” *Immunology* 83 (4): 601–10.
- Welter, Brenda H., Amanda M. Goldston, and Lesly A. Temesvari. 2011. “Localization to Lipid Rafts Correlates with Increased Function of the Gal/GalNAc Lectin in the Human Protozoan Parasite, *Entamoeba Histolytica*.” *International Journal for Parasitology* 41 (13–14): 1409–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.10.003>.
- Woolhouse, Mark E. J., Joanne P. Webster, Esteban Domingo, Brian Charlesworth, and Bruce R. Levin. 2002. “Biological and Biomedical Implications of the Co-Evolution of Pathogens and Their Hosts.” *Nature Genetics* 32 (4): 569–77. <https://doi.org/10.1038/ng1202-569>.
- Yu, Y., and K. Chadee. 1997. “*Entamoeba Histolytica* Stimulates Interleukin 8 from Human Colonic Epithelial Cells without Parasite-Enterocyte Contact.” *Gastroenterology* 112 (5): 1536–47.
- Zhang, Xiaochun, Zhi Zhang, Diane Alexander, Rivka Bracha, David Mirelman, and Samuel L. Stanley. 2004. “Expression of Amoebapores Is Required for Full Expression of *Entamoeba Histolytica* Virulence in Amebic Liver Abscess but Is Not Necessary for the Induction of Inflammation or Tissue Damage in Amebic Colitis.” *Infection and Immunity* 72 (2): 678–83. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.678-683.2004>.

12. APÉNDICE

12. 1 APÉNDICE A. Medio de cultivo Diamond

Medio de cultivo para amibas

Biosate	30 gr
Dextrosa	10 gr
Cloruro de sodio	2 gr
Fosfato de potasio monobásico	0.6 gr
Fosfato de potasio dibásico	1 gr
L Cisteina monohidrociorada	1 gr
Ácido ascórbico	0.2 gr
Citrato férrico de amonio	0.0236gr
Agua bidestilada	750 mL
pH	6.8

-Disolver en orden secuencial los reactivos hasta obtener un volumen de 750 mL.

-Enseguida medir el pH y ajustar a 6.8 con NaOH 0.2N, aforar hasta obtener 820 mL.

-El medio de cultivo una vez ya obtenido se envasa en tubos limpios de 10 ml, con un volumen de 7 ml aproximadamente.

-Esterilizar los tubos durante 15 min a 15 lb.

MEDIO TYI-S-33 SUPLEMENTADO:

*Medio de cultivo 7 mL

*Suero bovino adulto 800-1000 µl

*Vitaminas 200 µl

*Antibiótico 120 µl

12.2 APÉNDICE B. Resiembra (tubos stock)

Este proceso se deberá de realizar cada 3 días

PREPARACION DE AMIBAS:

Obtención de pastilla (amibas)

- a) Los tubos de medio con amibas se lavan con medio de cultivo sin nutrir.
- b) Se colocan en frio a 4°C durante 20 min.
- c) Posteriormente se centrifugan a 2,500-3,000 rpm durante 20 min (4°C).
- d) Una vez centrifugados se decanta el sobrenadante observando en el fondo la pastilla de amibas, las cuales será resuspendidas en un volumen de 1ml de medio de cultivo.

Conteo de amibas (Tinción vital)

- e) Para este conteo se necesitan 10ul de azul Tripan más 10ul de amibas resuspendidas, posteriormente se toman de esta mezcla 10ul de la solución (amibas más colorante) se colocan en una cámara Neubauer y se contabilizan las células que no estén teñidas de azul (vivas) de los cuatro cuadrantes.

Mantenimiento de la Virulencia de Trofozoítos de *E. histolytica*

- f) Para inducir la virulencia de los trofozoítos mantenidos en medio axénico se necesita inocularlos previamente en hígado de hámster, es decir cada animal se inocular con 300,000 trofozoítos suspendidos en 100 µl de medio de cultivo en el parénquima del lóbulo derecho del órgano en condiciones de asepsia. Los animales se sacrifican 3 días post-inoculación, posteriormente se procede con la extracción del hígado y posteriormente la disección de los abscesos formados, los cuales se colocan en medio de cultivo Diamond con la finalidad de que los trofozoítos migraran al exterior del tejido y en seguida se adhirieran a las paredes del tubo de vidrio para poder lograr su reproducción y mantenimiento fuera del órgano.

12. 3 APÉNDICE C. Aislamiento de proteínas de membrana de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

Los trofozoítos se cultivaron en su fase exponencial de crecimiento, lavando con medio sin suplemento, luego de lavarlas se dejaron 1 hora a 37°C en medio sin suplemento (ayuno). Los trofozoítos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) se resuspendieron en 1mL de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 6.8) más inhibidores de proteasas (Tosil-L-lisina-clorametilcetona 3 mM, N-etilmaleimida 5 mM, Iodoacetamida 3 mM, Fenil-metil-sulfonil-fluoruro 1 mM, Sigma-Aldrich). En seguida se homogenizaron y sometieron a ciclos de congelación (-70°C) descongelación (60 °C), verificando el rompimiento de las células al microscopio. El homogeneizado se centrifugó a 40,000 x g durante 1 hora a 4 °C, se obtuvieron el sobrenadante y la pastilla correspondiente a las fracciones citosólicas y membranales, respectivamente. La pastilla se solubilizó en buffer de lisis que contiene Triton X-100 2.5% (Modificado de Padilla *et al.*, 2010).

12. 4 APÉNDICE D. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

Este método cuantifica la unión de un colorante a una proteína desconocida y la compara contra diferentes cantidades de una proteína estándar. Las proteínas se unen a las partículas de colorante, para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre (Regueiro, 2002). Se procedió a realizar una curva estándar con albumina sérica bovina (BSA) (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g/ml}$) para cuantificar la concentración de proteínas problema (1 μl ; de pellet y citosol) utilizando 1 ml de la solución de Bradford (100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95% y 100 ml de ácido fosfórico al 85% en 1 litro de agua destilada). Las muestras fueron leídas a una absorbancia de 595 nm con un espectrofotómetro Beckman (Du 530) (Bradford, 1976).

12. 5 APÉNDICE E. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis en gel de poliacrilamida permite la separación de biomoléculas al migran en un campo eléctrico aplicado sobre un gel poliacrilamida (PAGE) en presencia de un detergente aniónico, duodecil sulfato de sodio (SDS) (Regueiro *et al.*, 2002). La concentración del gel para la separación de las proteínas 12%, 10% (Acrilamida/Bisacrilamida al 30%, Tris HCl 1.5 M pH de 8.8, SDS al 10%, persulfato de amonio (APS) al 10%, y N, N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0.05%). Durante la solidificación del gel se adicionó 2-butanol anhidro para alinear los bordes de este mismo. Una vez solidificado el gel de corrida, se preparó el gel concentrador a una concentración del 4% (Acrilamida/Bisacrilamida al 30%, Tris HCl 0.5 M pH de 6.8, SDS al 10%, APS al 10% y TEMED 0.05%). Una vez solidificado el gel se procedió a montar los geles en la cámara de electroforesis la cual contiene una solución de corrida (Tris-base 250 mM, Glicina 2 M, SDS 10% y agua tridestilada). Enseguida se prepararon las muestras problema las cuales se diluyen 1:1 con buffer de carga (041M6092, Sigma) y se hierven a 96 °C durante 5 minutos. Se cargaron 50 µg de proteína (extracto total de trofozoitos de *E. histolytica*) por pozo. Las muestras se corrieron a 100 volts durante 120 min aproximadamente.

12. 6 APÉNDICE F. Electrotransferencia

Una vez corridas las muestras en la electroforesis los geles obtenidos se lavaron durante 1 h en una solución de transferencia (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20%) para retirar las sales que se pudieron haber formado en el proceso. Se utilizó una membrana PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) la cual junto con los filtros y las fibras se remojaron en solución de transferencia. Se preparó el sistema de transferencia el cual contenía una solución de transferencia, un bloque de hielo, un magneto para su agitación y los electrodos colocados en los sitios correspondientes. Se corrió a 12 miliamperios durante 24 h a 4 °C.

Concluido el tiempo de la transferencia se sacaron las membranas ya transferidas, se lavaron con una solución de TBS-T (Tris-base 200 mM, NaCl 1.4 M, y Tween-20 0.5%), y con la finalidad de verificar la transferencia, las membranas se incubaron con rojo de Ponceau al 0.1% (18376 Sigma, ácido acético 0.5%) durante 5 min. Una vez que aparecieron las bandas las membranas se lavaron con TBS-T y se procedió a realizar la inmunodetección.

12.7 APÉNDICE G. Tinción de Hematoxilina – Eosina

*Cortes incluidos en parafina.

*Desparafinar e hidratar cortes:

- 1.- Desparafinar las laminillas dos veces en Xilol por 10 minutos cada una.
- 2.- Colocar en etanol al 100% durante 10 minutos.
- 3.- Colocar en etanol al 100% durante 10 minutos.
- 4.- Colocar en etanol al 96% durante 10 minutos.
- 5.- Colocar en etanol al 96% durante 10 minutos.
- 6.- Colocar en etanol al 80% durante 5 minutos.
- 7.- Lavar con agua destilada durante 10 minutos.

*Tinción:

- 8.- Colocar las laminillas en Hematoxilina de Harris de 1 minutos.
- 9.- Lavar las laminillas con agua corriente para quitar el exceso de Hematoxilina 10 minutos cambiando el agua.
- 10.- Teñir las laminillas con eosina 30 segundos.

*Deshidratar los cortes:

- 11.- Colocar en etanol al 80% durante 5 minutos.
- 12.- Colocar en etanol al 96% durante 5 minutos.
- 13.- Colocar en etanol al 100% durante 5 minutos.
- 14.- Colocar en etanol al 100% durante 5 minutos.
- 15.- Colocar en xileno durante 10 minutos.
- 16.- Colocar en xileno durante 10 minutos.

*Montaje de la preparación histológica:

- 17.- Cubrir el tejido con Entellan (1.07961.0500, Merck), evitar dejar burbujas y dejar secar durante 24 horas a temperatura ambiente.

12.8 APÉNDICE H. Inmunohistoquímica

1. Desparafinizar

Xileno (2 veces/7 min.)

Etanol 100% (2 veces /7 min.)

Etanol 96% (1 vez /15 min.)

Etanol 70% (1 vez /5 min.)

Enjuagar con agua corriente durante 5 min

2. Desenmascaramiento de epítomos

Colocar dentro de la olla 1.5 lt de buffer de citrato de sodio y encender la olla. Dejar que la presión de la olla suba a lo máximo, en seguida apagar la olla y permitir que se enfríe para poder abrir la tapa. Posteriormente introducir las laminillas (en un portalaminillas de metal) dentro de la olla, procurando que queden completamente cubiertas por el buffer. Nuevamente se enciende la olla y una vez que salga el vapor por la válvula se deja dos minutos, después se apaga y se dejan las laminillas reposar dentro del buffer 15 minutos. A continuación se pasan las laminillas a PBS

3. Lavar con PBS (3 veces/5 min)

4. Inactivación de las peroxidasas endógenas

Las laminillas se colocan en una solución de metanol-H₂O₂ 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente

5. Lavar con PBS (3 veces/5 min)

6. Alrededor del tejido de interés marcar círculos con el pen PAP

7. Permeabilización de la membrana

Lavar con PBS–Tritón X-100 0.2% (1 vez/30 min)

8. Bloqueo de uniones inespecíficas

Incubar las laminillas 1 hora a temperatura ambiente con Suero Fetal de Bovino 20% en PBS–Tritón X-100 0.2%

9. Primer anticuerpo

Incubar el primer anticuerpo durante toda la noche en cámara húmeda 4 °C

El anticuerpo se diluye en PBS–Tritón X-100 0.2%-BSA 3%

10. Lavar con PBS–Tritón X-100 0.2% (3 veces/5 min)

11. Segundo anticuerpo

Incubar con DAKO Envisión (K1490) durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda

12. Lavar con PBS (3 veces/5 min)

13. Incubar con DAB (diluido 1:10 con buffer) hasta que se desarrolle el color.

Los restos de DAB inactivarlos en una solución clorada

14. Lavar con PBS (3 veces/5 min)

15. Contrastar con hematoxilina durante 1 minuto

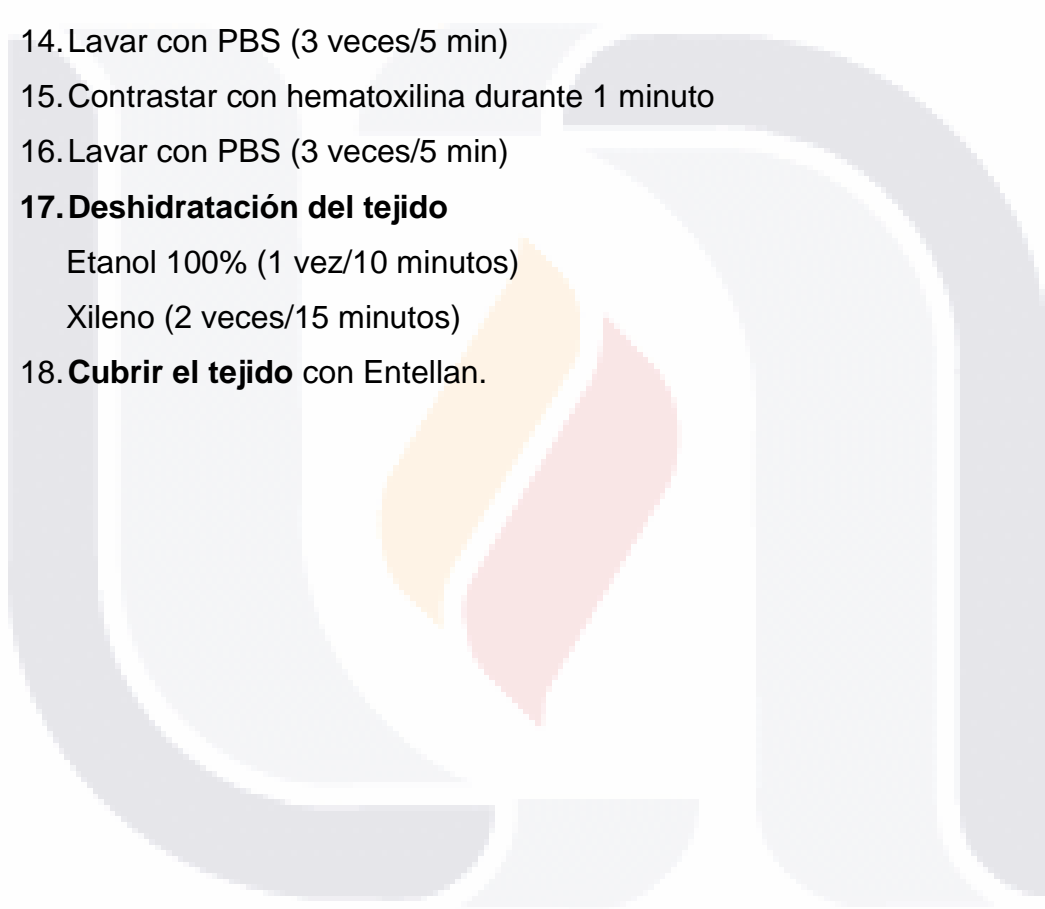
16. Lavar con PBS (3 veces/5 min)

17. Deshidratación del tejido

Etanol 100% (1 vez/10 minutos)


Xileno (2 veces/15 minutos)

18. **Cubrir el tejido** con Entellan.





Functional Characterization of an Interferon Gamma Receptor-Like Protein on *Entamoeba histolytica*

Julieta Pulido-Ortega,^a Patricia Talamás-Rohana,^b Martín Humberto Muñoz-Ortega,^c Liseth Rubí Aldaba-Muruato,^d Sandra Luz Martínez-Hernández,^a María del Rosario Campos-Esparza,^a Daniel Cervantes-García,^e Aralia Leon-Coria,^f France Moreau,^f Kris Chadee,^f  Javier Ventura-Juárez^a

^aDepartamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags., Mexico

^bDepartamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

^cDepartamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags., Mexico

^dUnidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P., Mexico

^eCONACYT-Departamento de Microbiología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags., Mexico

^fDepartment of Microbiology, Immunology and Infectious Diseases, Snyder Institute for Chronic Diseases, Cumming School of Medicine, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada

ABSTRACT *Entamoeba histolytica* is an anaerobic parasitic protozoan and the causative agent of amoebiasis. *E. histolytica* expresses proteins that are structurally homologous to human proteins and uses them as virulence factors. We have previously shown that *E. histolytica* binds exogenous interferon gamma (IFN- γ) on its surface, and in this study, we explored whether exogenous IFN- γ could modulate parasite virulence. We identified an IFN- γ receptor-like protein on the surface of *E. histolytica* trophozoites by using anti-IFN- γ receptor 1 (IFN- γ R1) antibody and performing immunofluorescence, Western blot, protein sequencing, and *in silico* analyses. Coupling of human IFN- γ to the IFN- γ receptor-like protein on live *E. histolytica* trophozoites significantly upregulated the expression of *E. histolytica* cysteine protease A1 (*EhCP-A1*), *EhCP-A2*, *EhCP-A4*, *EhCP-A5*, amebapore A (APA), cyclooxygenase 1 (*Cox-1*), Gal-lectin (*Hgl*), and peroxiredoxin (*Prx*) in a time-dependent fashion. IFN- γ signaling via the IFN- γ receptor-like protein enhanced *E. histolytica*'s erythrophagocytosis of human red blood cells, which was abrogated by the STAT1 inhibitor fludarabine. Exogenous IFN- γ enhanced chemotaxis of *E. histolytica*, its killing of Caco-2 colonic and Hep G2 liver cells, and amebic liver abscess formation in hamsters. These results demonstrate that *E. histolytica* expresses a surface IFN- γ receptor-like protein that is functional and may play a role in disease pathogenesis and/or immune evasion.

KEYWORDS *Entamoeba histolytica*, amoebiasis, cysteine proteases, IFN- γ , erythrophagocytosis, cytopathic effect

E*ntamoeba histolytica* infects the human large intestine, causing amoebiasis, dysentery, and in advanced cases, amoebic liver abscesses, leading to ~55,000 deaths annually (1). Studies on the host-parasite relationship have established that *E. histolytica* has developed strategies to escape from host immune responses (2–5). This phenomenon is known as positive natural selection, which drives the increase in prevalence of advantageous traits, and it has played a central role in the development of *E. histolytica* as a human parasite (6). On the other hand, it could be taken as coevolution at the biochemical level, defined as the process of reciprocal, adaptive genetic change between interacting species (7). In the colon, *E. histolytica* trophozoites overcome innate host defenses with molecules such as cysteine proteases to degrade mucus (8) and prostaglandin E₂ (PGE₂) to stimulate epithelial cells to produce interleukin-8 (IL-8),

Citation Pulido-Ortega J, Talamás-Rohana P, Muñoz-Ortega MH, Aldaba-Muruato LR, Martínez-Hernández SL, Campos-Esparza MDR, Cervantes-García D, Leon-Coria A, Moreau F, Chadee K, Ventura-Juárez J. 2019. Functional characterization of an interferon gamma receptor-like protein on *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 87:e00540-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00540-19>.

Editor DeBroski R. Herbert, University of Pennsylvania

Copyright © 2019 Pulido-Ortega et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Kris Chadee, kchadee@ucalgary.ca, or Javier Ventura-Juárez, jventur@correo.uaa.mx.

Received 15 July 2019

Accepted 7 August 2019

Accepted manuscript posted online 19 August 2019

Published 18 October 2019

a chemoattractant for neutrophils (9). Various virulence factors act on different stages of the invasion process, such as Gal/GalNAc lectin for adhesion to host cells (10), amebapores that cause cytolysis of immune cells (11), and cysteine proteases that degrade mucins (12) and immunoglobulins like IgA (13) and cause tissue destruction (14).

The ability of *E. histolytica* trophozoites to survive in the host has been related in part to the remarkable mobility of surface antigens after interaction with antibodies, which leads to elimination of the resulting antigen-antibody complexes by capping (15). *E. histolytica* trophozoites can protect themselves from reactive oxygen species (ROS) produced by neutrophils with peroxiredoxin, a 29-kDa surface protein that has potent antioxidant activity (16, 17). In addition, *E. histolytica* trophozoites express a protein similar to CD59 on the cell membrane that prevents the polymerization of complement protein C9 (18). *E. histolytica* also expresses a 55-kDa protein, similar to the extracellular loop of human occludin, which allows it to bind to intestinal epithelial cells (19). Furthermore, through bioinformatics analysis, two proteins, a GTPase of the Rab family and a thioredoxin containing a TIR-like domain similar to those of the IL-1 receptor and human Toll-like receptors (TLRs), have been identified (20). Reports have also shown that *E. histolytica* trophozoites bind the inflammatory cytokine IL-8 through a 29-kDa membrane-associated protein, triggering chemotaxis of the parasites to the source of IL-8 (21). *In vitro* chemotaxis assays, utilizing gradients of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), have shown that *E. histolytica* is attracted toward the source of this cytokine (22).

Previous studies have shown that interferon gamma (IFN- γ) binds on the surface of *E. histolytica* and reduces protein and DNA synthesis in cultured *E. histolytica* trophozoites (23). We have shown that *E. histolytica* trophozoites derived from colonic tissues from fulminant amoebic colitis patients are highly positive for IFN- γ (24) and speculated that *E. histolytica* has a surface binding protein for this cytokine. In this study, we demonstrate that IFN- γ coupling to *E. histolytica* IFN- γ receptor-like protein upregulated virulence factors that enhanced phagocytosis, cytopathic effects on colonic and liver cells, and liver abscess formation in a hamster model.

RESULTS

Detection of IFN- γ on *E. histolytica*. IFN- γ plays an important role in host defense against *E. histolytica* by activating macrophages to produce ROS and nitrogen species that are cytotoxic to the parasite (16). With the use of a highly specific anti-human IFN- γ monoclonal antibody, we detected by immunofluorescence increasing amounts of IFN- γ -antibody complexes on the surface of *E. histolytica* trophozoites at 60 and 180 min of exposure (Fig. 1A). To support the specific recognition of IFN- γ , a Western blot analysis was performed under reducing conditions that identified a 17-kDa protein corresponding to IFN- γ localized on the membrane of *E. histolytica* trophozoites (Fig. 1B). As a positive control, an antibody against the Gal/GalNAc lectin (4) was used to confirm the localization of IFN- γ on the *E. histolytica* membrane (Fig. 1B).

To quantify the localization of IFN- γ to the putative receptor on the surface of *E. histolytica* trophozoites, parasites were incubated with anti-human IFN- γ R1 monoclonal antibody and anti-IFN- γ polyclonal antibody and binding quantified by immunofluorescence. Surprisingly, we observed for both antibodies (anti-IFN- γ R1 and anti-IFN- γ antibodies) strong signals as early as 20 min that increased in intensity after 180 min (Fig. 2A) toward the uroid end of the *E. histolytica* trophozoites (Fig. 2B, white arrow). Colocalization of IFN- γ and anti-human IFN- γ R1 antibody on trophozoites was highest after 60 min of interaction with IFN- γ (Fig. 2C). To corroborate the results obtained by confocal microscopy, membrane proteins from trophozoites were separated by SDS-PAGE (12%) and subjected to Western blotting with a monoclonal antibody against IFN- γ R1 (trophozoites were incubated for 20 min with recombinant human IFN- γ). As a positive control, the antibody recognized IFN- γ R1 in human leukocyte lysates at 50 kDa (Fig. 3, lane 1). Our results suggest that *E. histolytica* trophozoites express a membrane protein of approximately 200 kDa that is recognized by anti-human IFN- γ R1 antibody

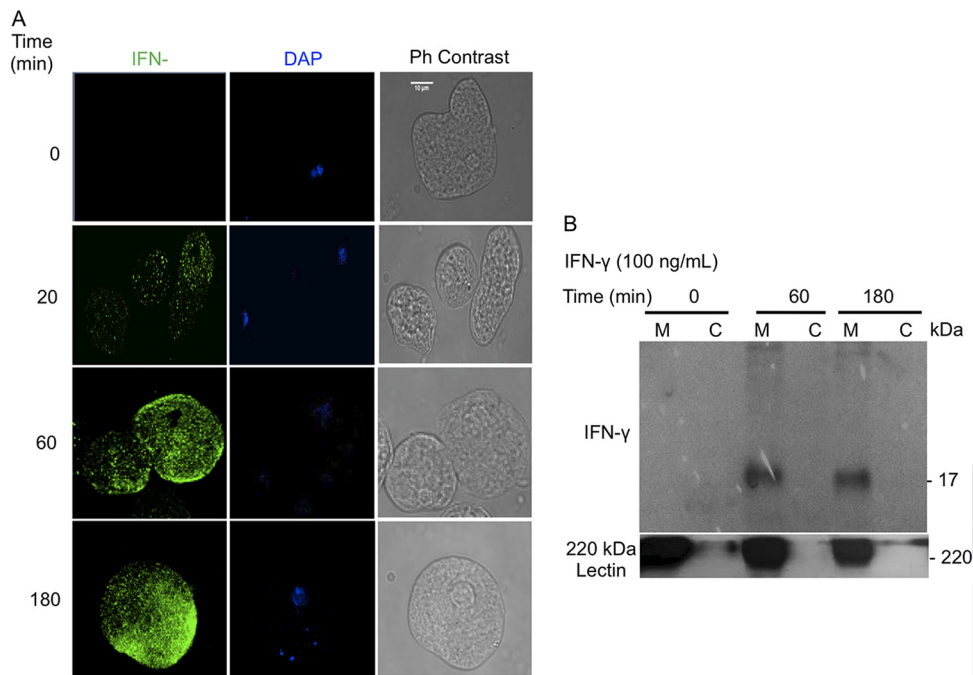


FIG 1 Localization of IFN- γ on the surface of *E. histolytica* trophozoites. (A) Immunodetection of the IFN- γ protein on the surface of *E. histolytica* trophozoites incubated with anti-human IFN- γ antibody (1:100 dilution), followed by a secondary antibody conjugated to Alexa 488 (1:1,000), imaged by confocal microscopy. Note that the intense green staining is absent in the control (without IFN- γ) at time zero. Ph contrast, phase-contrast images. (B) Western blot detection of the 17-kDa protein corresponding to IFN- γ on *E. histolytica* membrane (M) and cytoplasmic (C) fractions at 60 and 180 min. The 220-kDa lectin was used as an internal control to confirm membrane localization and subcellular fractionation. Scale bar represents 10 μ m.

independently of whether the trophozoites are exposed to exogenous IFN- γ or not (Fig. 3). These results suggest that *E. histolytica* expresses an IFN- γ receptor-like molecule on its surface that binds exogenous IFN- γ on the surface of the parasite.

Mass spectrometry analysis. To identify the 200-kDa protein, extracts of *E. histolytica* membranes were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. The 200-kDa protein was then excised and analyzed by mass spectrometry (MS). Peptide analysis revealed four proteins in the *E. histolytica* proteome that matched with different scores (Fig. 4A). The putative surface antigen C4LTV2_ENTHI, reported as a putative tyrosine kinase, showed the highest match and percent coverage in comparison with the protein with the expected molecular weight of approximately 200 kDa (Fig. 4B). These peptides cover 28.6% of the amebic 200-kDa-protein sequence reported as a putative tyrosine kinase. Due to the high score and other features of the C4LTV2_ENTHI sequence, our results indicate a high possibility that the anti-IFN- γ R1 antibody detected the amebic protein in the Western blot and is most likely the putative tyrosine kinase. Further investigation of this possibility showed (Fig. 4C) that the human IFN- γ R1 amino acid sequence has an ETTTCYIRVYNVYVRMNGSEIQYKILTQKE DDCDEIQCQLAIPVSSLNSQYC motif in the third extracellular loop, characterized as a binding site for IL-8, which aligns with the NTYCDVCEENYIIIDGTCTYFRAINKCESSDGKIC TKCSSGYTPKGGKYC motif of the 200-kDa amebic surface antigen (putative tyrosine kinase), sharing identical amino acids at 10 specific positions, while the other 20 amino acids, although not identical, have similar physicochemical properties.

IFN- γ upregulates the expression of *E. histolytica* virulence factors. Reverse transcriptase quantitative PCR was performed to determine if exposure of live *E. histolytica* trophozoites to IFN- γ could modulate the transcription of key virulence factors in *E. histolytica* cells. After 20 min of exposure to IFN- γ , *E. histolytica* cysteine protease A1 (*EhCP-A1*), *EhCP-A2*, *EhCP-A4*, and *EhCP-A5* mRNAs were significantly increased compared to their levels in control *E. histolytica* trophozoites in the absence of

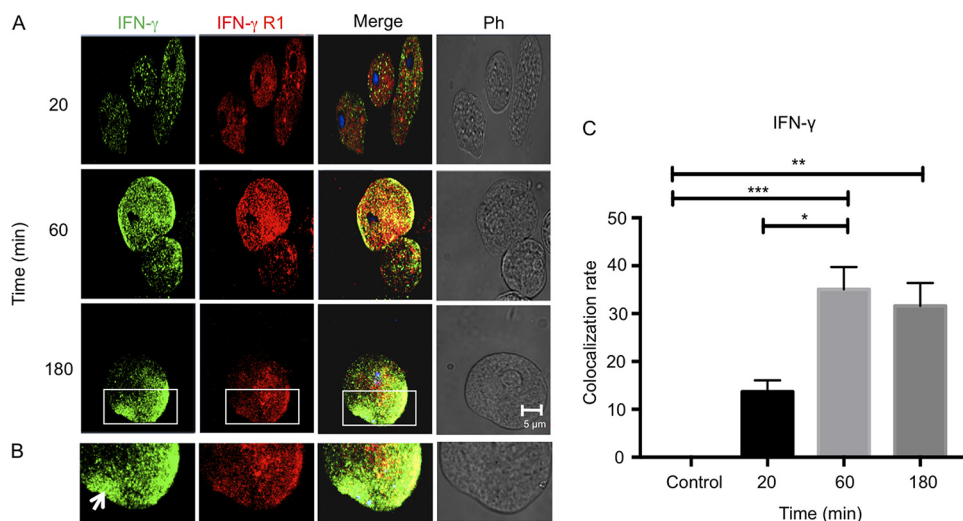


FIG 2 Colocalization of IFN- γ and IFN- γ receptor-like protein on *E. histolytica* trophozoites. *E. histolytica* trophozoites were incubated with IFN- γ for 20, 60, or 180 min and analyzed by confocal microscopy. After the interaction, trophozoites were incubated with a polyclonal anti-IFN- γ antibody (1:100 dilution) and a monoclonal anti-IFN- γ R1 antibody (1:100 dilution), followed by Alexa Fluor 594- and Alexa Fluor 488-labeled secondary antibodies, respectively. (A) Micrographs show that IFN- γ bound to the surface of *E. histolytica* trophozoites; an increase in positive signal was obtained with longer exposure time. The label for IFN- γ receptor-like protein was constant after 3 h of interaction and was displaced to the uroid side of trophozoites. Increased colocalization at 1 h of interaction was observed. (B) Images illustrating morphology that demonstrate capping (arrow) on an *E. histolytica* trophozoite after interaction with IFN- γ for 3 h. Ph, phase-contrast images. (C) Analysis was performed according to the Costes methodology, which includes the elimination of autofluorescence with the Coloc2 plugin of Fiji software (ImageJ). The graph was made with GraphPad Prism 7. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

IFN- γ . The fold increases were highest for *EhCP-A1* and *EhCP-A5* (20- and 39-fold, respectively) (Fig. 5A and D). *E. histolytica* amebapore A (*APA*), cyclooxygenase 1 (*Cox-1*), and peroxiredoxin (*Prx*) mRNAs were significantly increased, by 16-fold, after 30 min of exposure (Fig. 6A and B). The mRNA expression of both *Prx* (20-fold) and Gal-lectin (*Hgl*) (17-fold) peaked after 60 min (Fig. 6C and D).

Pretreating *E. histolytica* trophozoites with IFN- γ increases erythrophagocytosis. One of the properties of *E. histolytica* is its extraordinary phagocytic activity against a variety of particulate materials, including bacteria, sloughed epithelial cells, and erythrocytes. The latter activity has been widely accepted as a characteristic presented by invasive *E. histolytica* (25). For this reason, we determined whether IFN- γ enhanced erythrophagocytosis in *E. histolytica* trophozoites. IFN- γ pretreatment for 20 min significantly increased trophozoite phagocytosis of red blood cells (Fig. 7A), which was specifically abrogated by the phospho-STAT1 inhibitor fludarabine (Fig. 7B). These results indicate that IFN- γ promoted erythrophagocytosis when it bound to *E. histolytica* trophozoites through the IFN- γ receptor-like protein, possibly by activating STAT1. Accordingly, we next investigated whether IFN- γ -stimulated *E. histolytica* phosphorylated STAT1. To investigate this, we immunoprecipitated *E. histolytica* proteins with phospho-tyrosine and performed Western blotting with phospho-STAT1 under the conditions shown in Fig. 7B. Surprisingly, the basal expression (nonstimulated controls) of phospho-STAT1 in *E. histolytica* trophozoites was similar to that in IFN- γ -stimulated trophozoites, and pretreatment with the phospho-STAT1 inhibitor fludarabine (50 μ M) markedly decreased phospho-STAT1 (Fig. 7C). The viability of *E. histolytica* trophozoites treated with 50 mM fludarabine was >95% as determined by the trypan blue exclusion assay. Lower concentrations of fludarabine (10 and 25 nM) were not effective in inhibiting basal IFN- γ -stimulated phospho-STAT1. These results demonstrate that basal expression of STAT1 in *E. histolytica* trophozoites was constitutively high and that STAT1 could not be phosphorylated further with IFN- γ . However, under both conditions, fludarabine markedly inhibited the phosphorylation of STAT1 (Fig. 7C).

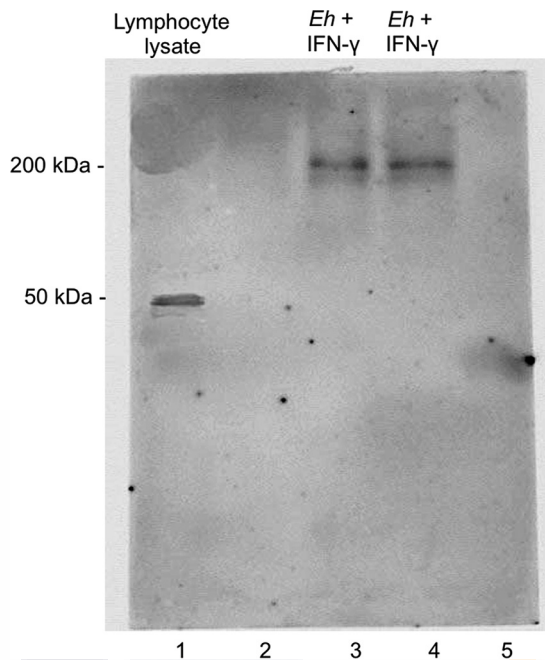


FIG 3 Western blot of *E. histolytica* membrane fractions using anti-human IFN- γ R1 antibody. *E. histolytica* proteins were analyzed by 12% SDS-PAGE and immunoblotting. *E. histolytica* trophozoites were incubated with or without 100 ng/ml IFN- γ . Note strong immunoreactivity with the anti-IFN- γ R1 antibody at 200 kDa in *E. histolytica* membrane fractions (lanes 3 and 4) and at 50 kDa in lymphocyte lysate used as controls (lane 1). Lanes 2 and 5 are blanks.

Pretreating *E. histolytica* trophozoites with IFN- γ increases chemotaxis. Chemotaxis is a phenomenon in which cells direct their movements according to the presence of certain chemical substances in the environment. *E. histolytica* orients its migration or chemotaxis based on external stimuli like serum proteins, bacteria, or molecules released by epithelial and immune cells (26), such as IL-8 (21). This activity in *E. histolytica* has been correlated with its invasive capacity (21, 27). Chemotaxis requires specific recognition between the chemoattractant and the receptor on the cell, leading to a series of activation signals that induce biochemical and structural changes that allow migration. *E. histolytica* trophozoites exposed to 100 ng/ml of IFN- γ showed a significant increase in migration that was 4 times greater (Fig. 8Ac and Fig. 8B) than the migration of untreated control trophozoites in medium only (Fig. 8Aa and Fig. 8B; Movie S1 in the supplemental material). For these studies, IL-8 was used as a positive control (Fig. 8Ab) and cytochalasin D, an inhibitor of actin cytoskeleton, as a negative control (Fig. 8Ad). Chemotaxis of *E. histolytica* was also analyzed by time-lapse video. For each recording in real time, a representative *E. histolytica* trophozoite was selected for each condition, and their trajectories were followed throughout 4 min (Movies S1 and S2).

IFN- γ increases *E. histolytica*'s cytopathic activity toward Caco-2 and HepG2 cells. The ability of *E. histolytica* trophozoites to destroy target cells can be separated into two phases: recognition and adhesion, which allows cell death and phagocytosis (28). To determine if IFN- γ pretreatment increased *E. histolytica*'s cytopathic activity, studies were carried out using human colonic Caco2 and liver HepG2 cell monolayers. After 20 min of interaction with IFN- γ , *E. histolytica* trophozoites had destroyed a greater percentage of the HepG2 monolayer (Fig. 9B) than of the Caco-2 cells (Fig. 9A), and the Caco-2 cell destruction was partially inhibited by the STAT1 inhibitor fludarabine. Shorter incubation times with IFN- γ and the STAT1 inhibitor had no effect on *E. histolytica*'s cytopathic activity.

In vivo effect of stimulating *E. histolytica* trophozoites with IFN- γ . We next tested whether treating *E. histolytica* with IFN- γ affected the morphological develop-

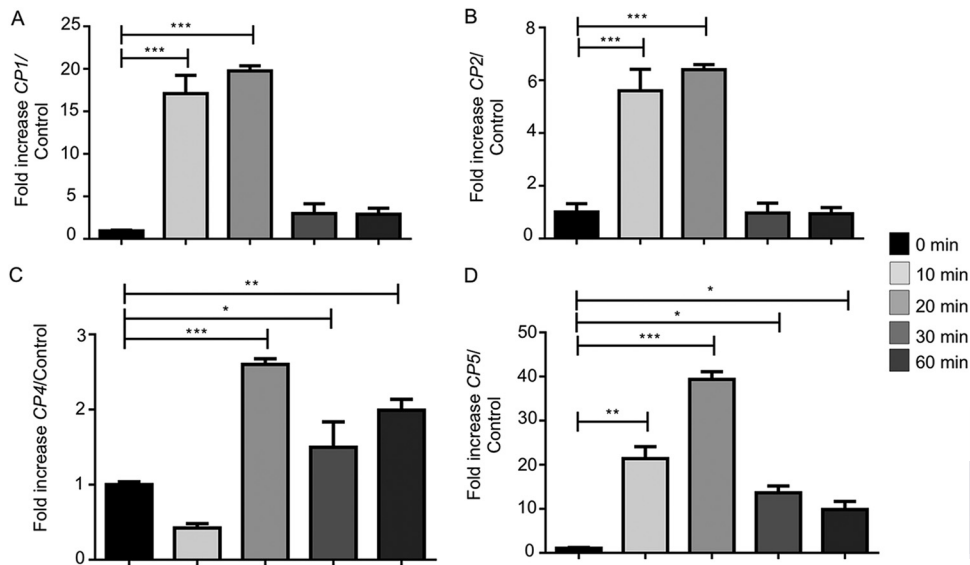


FIG 5 IFN- γ upregulated cysteine protease expression in *E. histolytica* trophozoites. (A to D) *E. histolytica* trophozoites treated or not with IFN- γ for 10, 20, 30, or 60 min showed increased expression of cysteine protease genes associated with *E. histolytica* pathogenicity. Note maximal upregulation of *EhCP-A1*, *EhCP-A2*, *EhCP-A4*, and *EhCP-A5* expression after 20 min of IFN- γ stimulation. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

study reveals that *E. histolytica* has a surface protein analogous to human IFN- γ receptor 1 (IFN- γ R1) and responds to the presence of IFN- γ to modify its behavior/virulence. In particular, IFN- γ activated *E. histolytica* trophozoites to upregulate the expression of virulence genes *EhCP-A1*, *EhCP-A2*, *EhCP-A4*, *EhCP-A5*, *APA*, *Prx*, *Hgl*, and *Cox-1*. These findings are remarkable and lend support to the idea that *E. histolytica* uses IFN- γ in tissues to sense inflammatory/immune cells so as to enhance invasion and/or evade immune responses. As IFN- γ is present at sites of *E. histolytica* invasion, in the presence of inflammatory macrophages and T cells, evading the immune response by upregulating cysteine proteases to degrade cytokines might be the most likely scenario. *E. histolytica* avoids the host immune response through

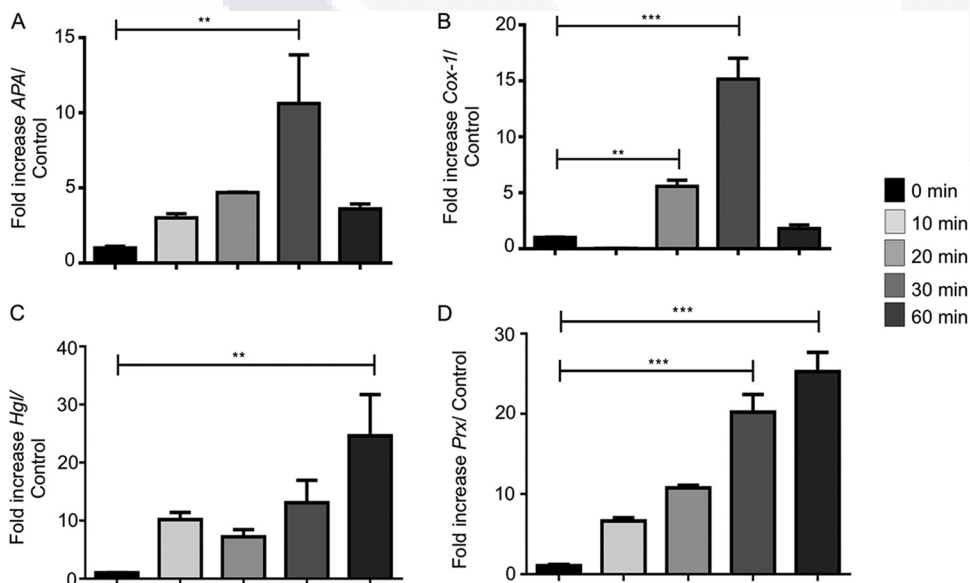


FIG 6 IFN- γ upregulated other virulence genes in *E. histolytica* in a temporal fashion. (A to D) Interaction of *E. histolytica* trophozoites with IFN- γ upregulated *APA*, *Cox-1*, *Hgl*, and *Prx* (peroxiredoxin), with maximal expression occurring after 30 min. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

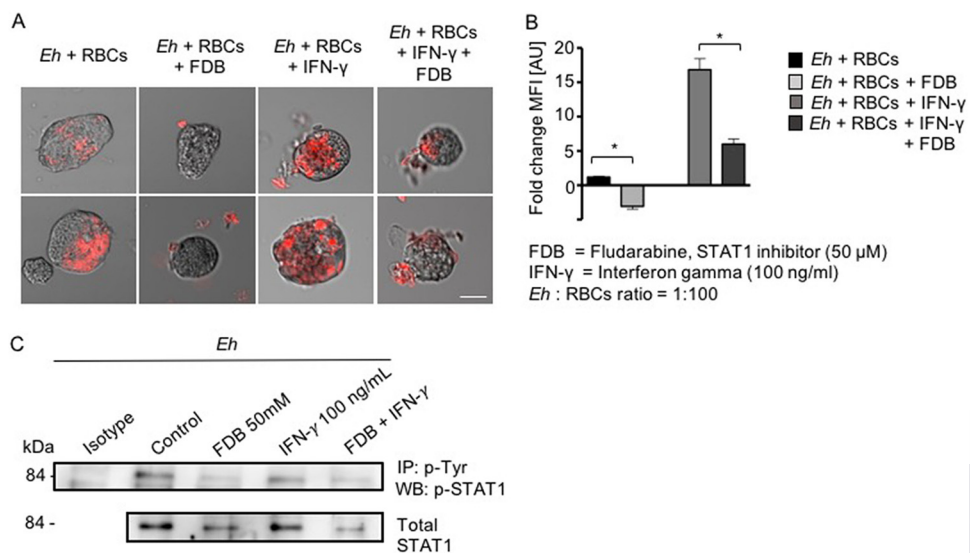


FIG 7 IFN- γ enhanced erythrophagocytosis in *E. histolytica* trophozoites. (A) Images of erythrophagocytosis by nontreated *E. histolytica* trophozoites (*Eh*) or by trophozoites in the presence of fludarabine or IFN- γ or both. Note that IFN- γ -stimulated erythrophagocytosis was substantially inhibited with the STAT1 inhibitor fludarabine. Red fluorescence shows ingested erythrocytes. Scale bar represents 10 μ m. (B) Histogram showing quantification of the fluorescence of erythrocytes phagocytosed in the different assays. MFI, mean fluorescence intensity; AU, arbitrary units. *, $P < 0.05$. (C) Basal and IFN- γ -induced phosphorylation of STAT1 in *E. histolytica* is inhibited by the phospho-STAT1 inhibitor fludarabine. IP, immunoprecipitation; WB, Western blotting.

adherence, cytotoxicity, or phagocytosis of inflammatory cells to downregulate immune effector cells and by degrading antibodies and complement with an arsenal of molecules, including amebapores, adhesins, phospholipases, serine-rich proteins, and lipopeptidophosphoglycan-like molecules (29–31). In addition, *E. histolytica* produces inhibiting factors that modulate immune cell function, includ-

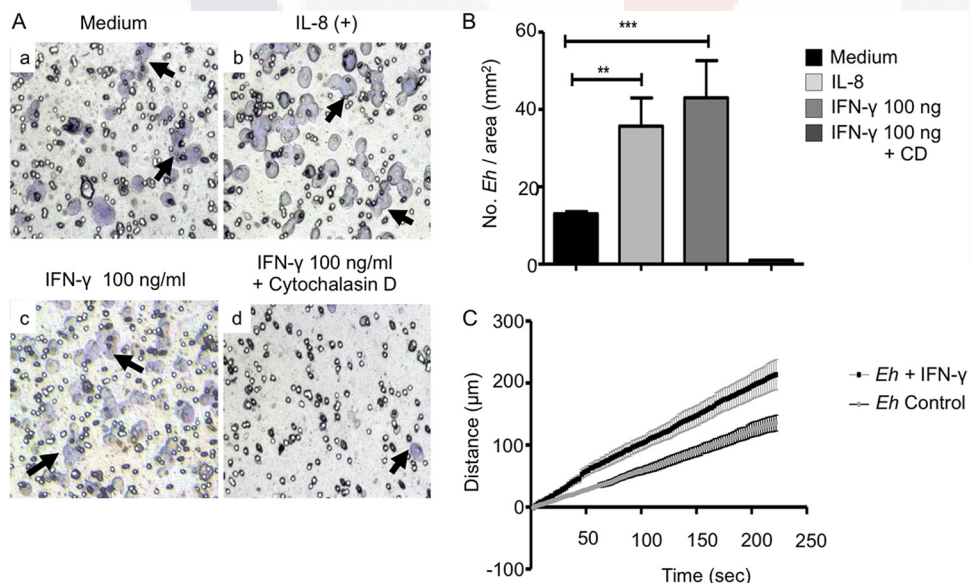


FIG 8 Chemotaxis of *E. histolytica* trophozoites toward human IFN- γ . (A) Microscopy images of *E. histolytica* trophozoites that were deposited in the upper chambers of Transwell units and allowed to migrate to the lower chambers in the absence (a) or presence (c) of IFN- γ or in the presence of IL-8 as a positive migration control (b) or of IFN- γ in the presence of 10 μ g/ml of cytochalasin D (d). Arrows indicate *E. histolytica* trophozoites. (B) Numbers of *E. histolytica* trophozoites/mm². Data represent values from four independent experiments. CD, cytochalasin D. (C) *E. histolytica* trophozoite velocities tracked in the presence or absence of IFN- γ . The graph represents migration velocities recorded by real-time video microscopy. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

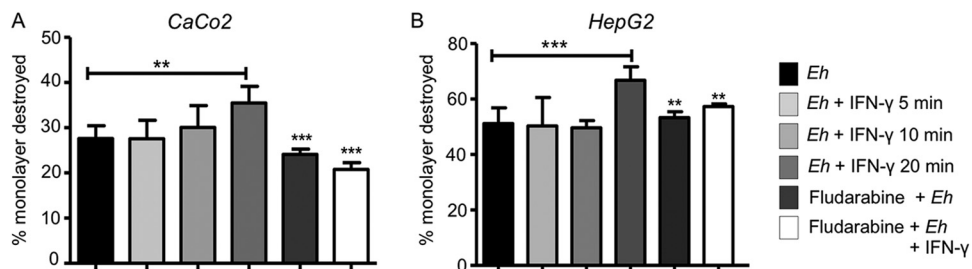


FIG 9 IFN- γ enhanced *E. histolytica*'s cytopathic effects on Caco-2 and HepG2 cells. (A, B) Caco-2 cells (A) and HepG2 cell monolayers (B) were exposed to *E. histolytica* trophozoites pretreated with IFN- γ at different times with or without the STAT1 inhibitor fludarabine (50 μ M). Following interaction with *E. histolytica*, the remaining cells were stained with methylene blue and the released color measured at 655 nm. Data represent values from 4 independent experiments. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

ing a monocyte locomotion inhibitory factor that prevents chemotaxis and the activation of macrophages (32). *E. histolytica* also produces L220, which stimulates macrophages to produce IL-10 (33), and a specific parasite-encoded cytokine, *E. histolytica* MIF, as a mediator of mucosal inflammation (34).

During amebic invasion in the colon, *E. histolytica* trophozoites are highly positive for IFN- γ located in the submucosa at sites where macrophages, $\gamma\delta$ T cells, and NK cells are actively producing IFN- γ (35). IFN- γ activates macrophages and neutrophils that kill *E. histolytica* *in vitro* (35, 36), and high levels of IFN- γ have been related to resistance to

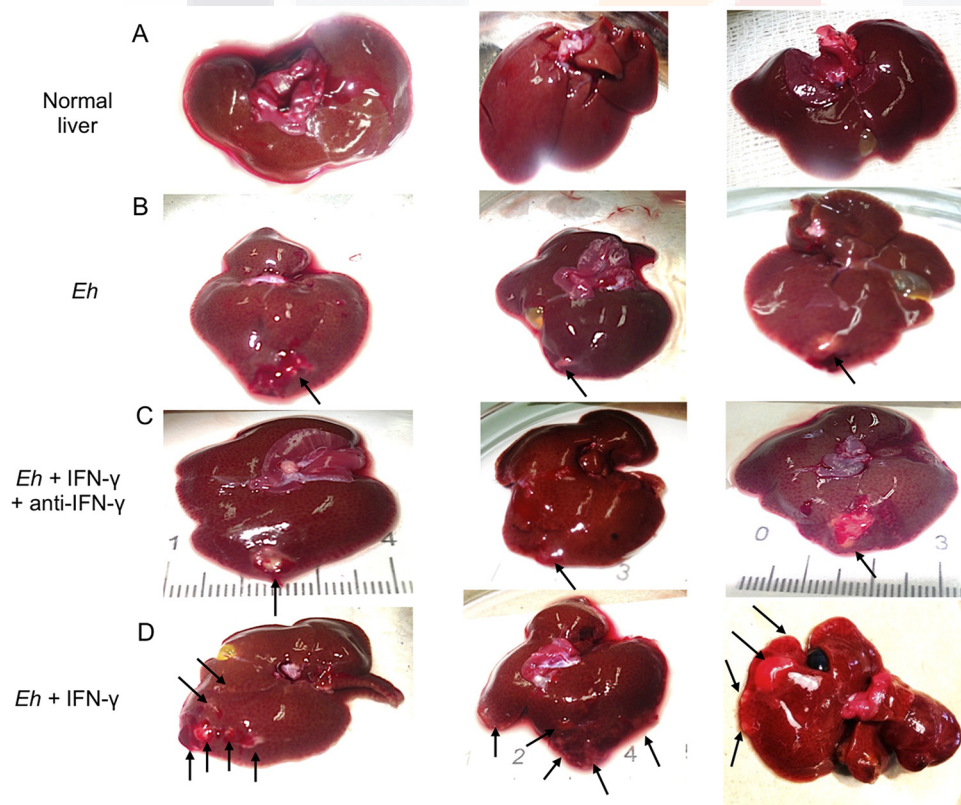


FIG 10 Amebic liver abscesses (ALA) 4 days postinoculation. Macroscopic development of ALA in male hamsters inoculated with *E. histolytica* trophozoites with or without stimulation with IFN- γ for 20 min. (A) Control uninfected livers of hamsters. (B) Single lesions (arrows) are seen in the liver lobes inoculated with *E. histolytica*. (C) The lesions (arrows) in the livers of hamsters treated with IFN- γ and anti-IFN- γ antibody appear similar to the ALA formed by control *E. histolytica* trophozoites, shown in panel B. (D) Morphology of ALA when *E. histolytica* trophozoites were pretreated with IFN- γ , demonstrating several granulomas distributed in the left and right lobes of the livers (arrows).

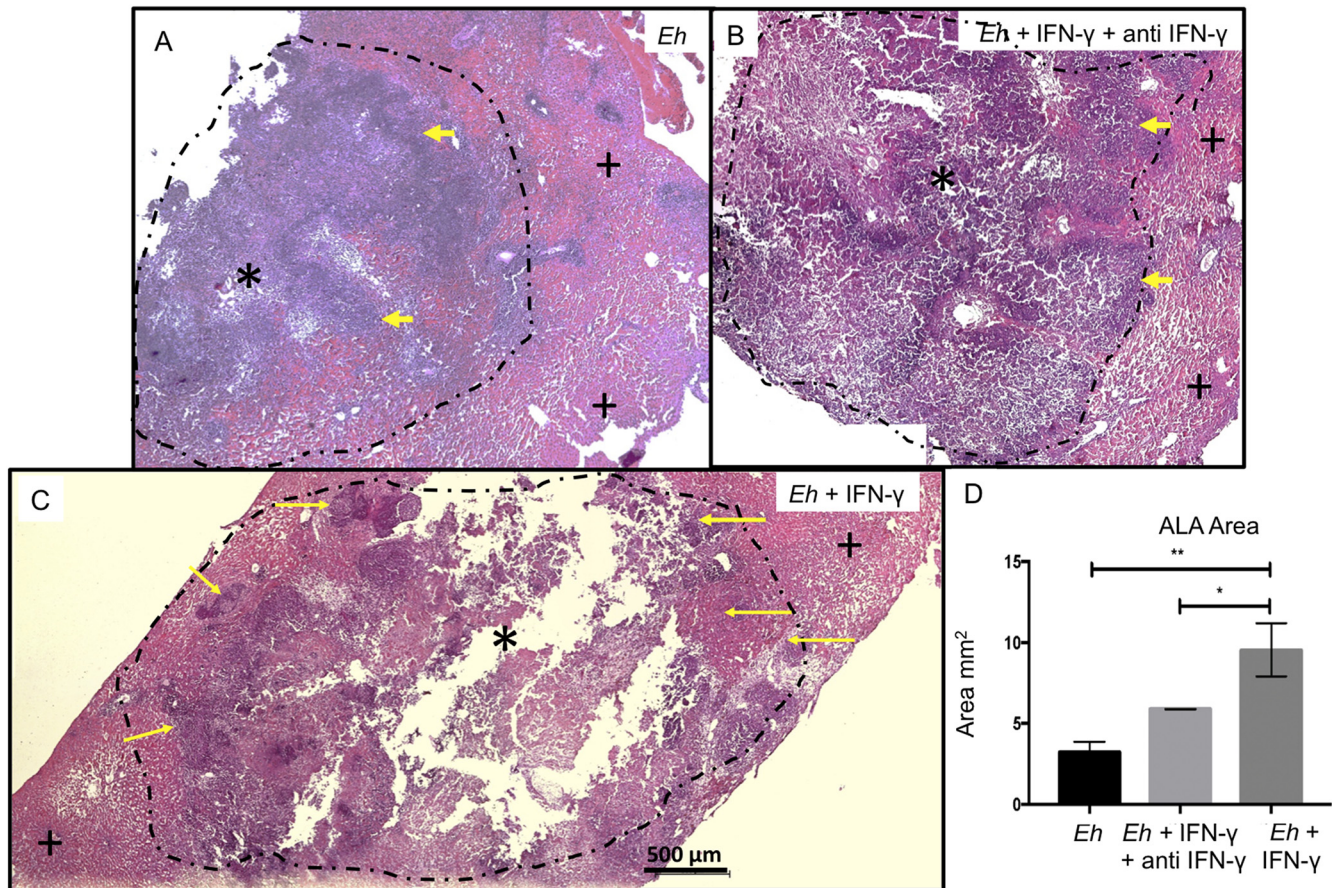


FIG 11 (A) Normal development of ALA. Necrotic tissue is seen in the center of the lesion (*), and the edges show areas of inflammatory infiltrate (arrowheads) that are in contact with healthy areas of the liver (+). (B) ALA formed by *E. histolytica* trophozoites in the presence of IFN- γ -anti-IFN- γ antibody complex: the distribution of necrotic area and inflammatory infiltrates is similar to those of ALA induced by *E. histolytica* trophozoites. (C) ALA formed by *E. histolytica* trophozoites preincubated with IFN- γ (100 ng/ml). Note increased ALA development with multiple zones of new inflammatory infiltrate (yellow arrows) at the periphery of the lesions. The black dashed-line circles indicate the zones of ALA development. Hematoxylin-and-eosin staining was used. (D) Quantification of ALA development. One-way ANOVA and Tukey's *post hoc* test were used. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

intestinal amebiasis in children (37). In tissues, *E. histolytica* evades host immune cells by phagocytosis or apoptosis (38), by trogocytosis (39), or by inhibiting IFN- γ production with prostaglandin E₂ (PGE₂) from the cyclooxygenase (Cox)-like enzyme (5, 40, 41). By Western blot analysis, using an anti-human IFN- γ R1 antibody, we detected the presence of an *E. histolytica* protein of ~200 kDa in membrane fractions. This suggests that IFN- γ produced at the site of lesions is likely to bind the 200-kDa *E. histolytica* protein. By sequencing and *in silico* analysis, the 200-kDa protein showed similarity to a putative tyrosine kinase protein, with 50% homology in amino acid and physico-chemical characteristics to the motif that binds human IFN- γ receptor.

The binding between IFN- γ and human immune cells is well characterized (42) for functional activity, including the release of various proinflammatory mediators critical in inflammation. Our finding of an IFN- γ receptor-like protein on the *E. histolytica* membrane with homology to the binding motif of human IFN- γ receptor is remarkable. Consistent with an IFN- γ receptor-like protein, exposure of *E. histolytica* trophozoites to IFN- γ increased their phagocytosis of erythrocytes by 15 times in a STAT1-dependent manner and upregulated several virulence genes that enhance adherence to host cells and proteases that degrade extracellular substrates. Equally important was the finding of chemotaxis of *E. histolytica* trophozoites toward IFN- γ , which demonstrates that *E. histolytica* can sense proinflammatory cytokines in lesions. Similar findings have been described for *E. histolytica* sensing IL-8 and TNF- α (21, 22). IFN- γ also significantly increased *E. histolytica*'s cytotoxicity against Caco2 and HepG2 cells. This effect may be

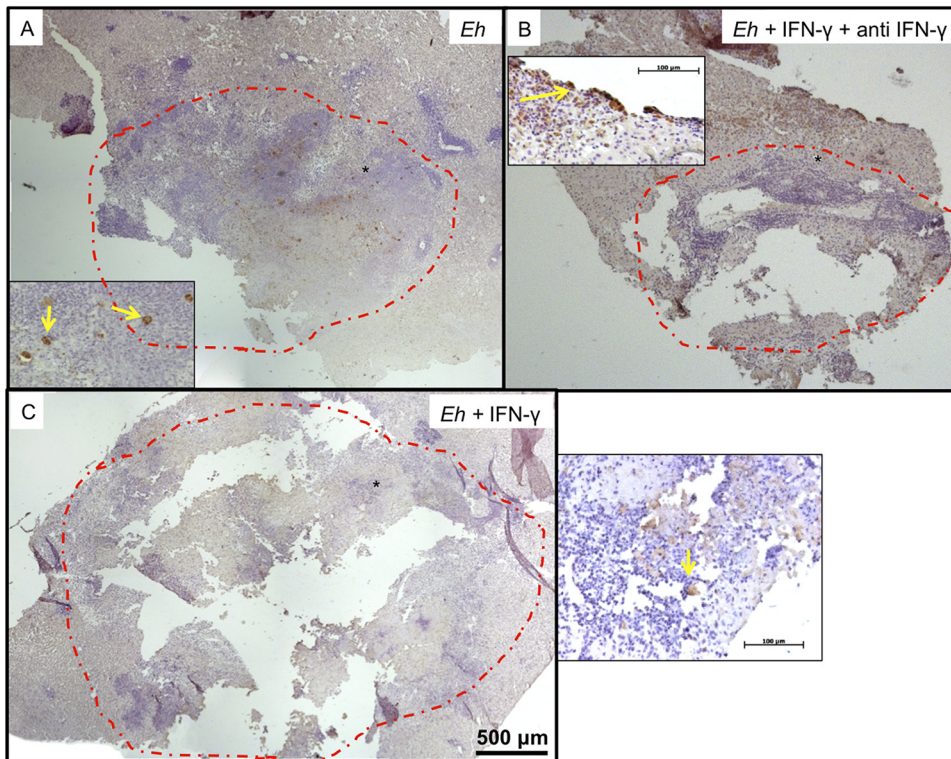


FIG 12 Immunohistochemical detection of *E. histolytica* trophozoites in hamster ALA. (A) ALA formed by control *E. histolytica* trophozoites. (B) ALA formed by *E. histolytica* trophozoites treated with IFN- γ -anti-IFN- γ complex. (C) ALA formed by *E. histolytica* trophozoites treated with IFN- γ . The red dashed-line circles indicate the zones of ALA development. In insets, the yellow arrows show *E. histolytica* trophozoites in liver tissues. The asterisk indicates the location zone of *E. histolytica* trophozoites.

related to increased expression of EhCpPs and upregulation of the Gal/GalNAc lectin to allow the parasite to disrupt innate mucosal barriers (29, 30, 43). ALA formation in hamster livers showed that *E. histolytica* trophozoites exposed to IFN- γ became more virulent, resulting in greater lesion sizes with multiple granulomas and metastatic foci to other liver lobes. Increased ALA formation due to preexposure of *E. histolytica* trophozoites to IFN- γ is a novel observation and perhaps is a strategy used by *E. histolytica* to bind to and deplete IFN- γ in ALA lesions. This is especially important as IFN- γ can activate newly recruited inflammatory macrophages and neutrophils to sites of infection, which is detrimental to *E. histolytica*. Thus, the ability of *E. histolytica* to bind and increase cytotoxicity toward inflammatory cells represents a strong immune evasion strategy by the parasite. In summary, our findings show that *E. histolytica* expresses a functional protein similar to human IFN- γ R1 that functions by upregulating several key virulence factors that enhance erythrophagocytosis and cytotoxicity of epithelial cells and are critical in disease pathogenesis and immune evasion.

MATERIALS AND METHODS

***E. histolytica* culture.** *E. histolytica* HM-1:IMSS trophozoites were grown axenically in TYI-5-33 medium containing 10% bovine serum and supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), and 10% heat-inactivated adult bovine serum, as previously described (43). To maintain virulence, trophozoites were regularly passed through golden hamster (*Mesocricetus auratus*) livers as described previously (44). Trophozoites were harvested in the logarithmic phase of growth (48 to 72 h) by cooling the culture tubes on ice and centrifuging the cell suspensions at $300 \times g$ for 15 min. Recovered *E. histolytica* trophozoites were suspended in culture medium without serum, pH 7.2, for the assays.

Immunofluorescence detection of IFN- γ fixed on *E. histolytica* trophozoites. For double immunofluorescence assays, *E. histolytica* trophozoites (2×10^5) were cultured in coverslips in a petri dish with TYI-5-33 medium (Trypticase, yeast extract, iron serum) for 15 min at 37°C. Coverslips were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), medium supplemented with IFN- γ (100 ng/ml; Peprotech,

Rocky Hill, NJ, USA) was added, and the trophozoites were incubated for 20, 60, or 180 min at 37°C. Coverslips were washed three times with PBS, and the trophozoites were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and blocked with 10% fetal bovine serum in PBS for 1 h at 37°C. The preparations were incubated overnight at 4°C with primary antibodies anti-IFN- γ antibody (1:100) (catalog number 500-P32; Peprotech) and anti-IFN- γ R1 antibody (1:100) (catalog number MA5-16583; Thermo Fisher Scientific). After three washes with PBS, secondary antibodies (1:1,000) Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse IgG(H+L) (catalog number A11005; Thermo Fisher Scientific) and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG(H+L) (catalog number A11008; Thermo Fisher Scientific) were added and the preparations were incubated overnight at 4°C. Nuclei were stained with Hoechst stain (1 μ g/ml; Thermo Fisher Scientific) in PBS for 10 min at room temperature. Coverslips were mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and analyzed in an LMS700 microscope (Zeiss). Images were processed with ZEN 2009 Light Edition software (Zeiss). To quantify colocalization, 1- μ m z-stacks of entire cells or an area around the plasma membrane were analyzed according to the Costes methodology, which includes the elimination of autofluorescence with the Coloc2 plugin of Fiji software (ImageJ). Graphing was done with GraphPad Prism 7 software (45).

Western blot analysis for detecting IFN- γ R1 on *E. histolytica* trophozoite membranes. *E. histolytica* trophozoites were cultured in the presence or absence of 100 ng/ml of recombinant IFN- γ (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) for 20 min at 37°C. After incubation, trophozoites were washed with PBS. For protein extraction, approximately 1×10^6 cells were resuspended in 1 ml of lysis buffer with protease inhibitors (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 5 mM *N*-ethylmaleimide, 3 mM iodoacetamide, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, and 3 mM tosyl-L-lysine chloromethyl ketone). All inhibitors were purchased from Sigma-Aldrich. The cells were homogenized with $-70^\circ\text{C}/37^\circ\text{C}$ incubation cycles. The lysates were centrifuged at $40,000 \times g$ for 1 h at 4°C. The supernatant and pellet correspond to the cytosolic and membrane fraction, respectively. Positive-control human leukocyte total lysates were collected as well. Then, the pellets were suspended in 200 μ l lysis buffer and 2.5% Triton X-100. Protein quantification was performed with the Bradford method (46). For Western blotting, 50 μ g of each protein extract was separated in a 10% SDS-PAGE gel, and proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The membranes were blocked with Tris-buffered saline (TBS) and 5% skimmed milk for 1 h at room temperature. For immunodetection, the membranes were incubated for 24 h at 4°C with the primary antibody, a mouse anti-IFN- γ R1 monoclonal antibody (1:1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Blots were incubated with goat anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor 594 (1:5,000; Millipore, Burlington, MA, USA). After the incubation, the membranes were washed with TBST (Tris-buffered saline–0.05% Tween 20) and blots were developed with Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad, Hercules CA, USA) for chemiluminescence imaging.

Isolation of total RNA and qPCR. Total RNA was isolated from 1×10^6 *E. histolytica* trophozoites incubated or not with IFN- γ for 0, 10, 20, 30, and 60 min, using the SV total RNA isolation system (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed with 50 ng of total RNA from *E. histolytica* trophozoites using the GoScript reverse transcription system (catalog number a5001; Promega), followed by real-time quantitative PCR (qPCR) analysis using qPCR GreenMaster with UNG, clear (Jena Bioscience, Jena, Germany) in a StepOne machine (Applied Biosystems) with the following program: 50°C for 2 min, 95°C for 3 min, and 40 cycles of 95°C for 30 s and 60°C for 30 s. Oligonucleotides were designed to target genes encoding *E. histolytica* cysteine proteases 1, 2, 4, and 5, amebapore, Cox-1, Gal/GalNAc lectin, and peroxiredoxin (Table S1 in the supplemental material). Relative expression levels were normalized against the expression of the respective *E. histolytica* genes from cells cultured without stimuli as an internal control, and differences were determined by employing the $\Delta\Delta C_T$ relative method. The rRNA gene was used as the housekeeping gene, using the StepOne machine (Applied biosystem).

Erythrophagocytosis. *E. histolytica* trophozoites were cultured in glass tubes under axenic conditions. Trophozoites (2×10^6) were harvested by chilling the culture tubes at 4°C in a water-ice bath for 10 min and then centrifuging them at $300 \times g$ for 5 min and washing with sterile Dulbecco's PBS (DPBS) (catalog number D8537; Sigma-Aldrich). To abrogate signaling via IFN- γ R1, trophozoites were pretreated with the STAT1 inhibitor fludarabine at 50 μ M (catalog number Sc-204755; Santa Cruz) for 30 min before exposure to IFN- γ (100 ng/ml) for 20 min. Following incubation, trophozoites were washed twice with DPBS before the assay. Fresh human erythrocytes in DPBS solution were stained with PKH26 (catalog number MINI26; Sigma-Aldrich), counted, and used at a 1:100 (trophozoites/erythrocytes) ratio. To establish the interaction, erythrocytes were added, and the interaction was carried out for 20 min at 37°C in DPBS, after which they were washed twice with DPBS. Lysis buffer (red blood cell [RBC] lysing buffer) (catalog number R7757; Sigma-Aldrich) was added for 1 min at room temperature. Fetal bovine serum (FBS; 0.5 ml) (catalog number 10437-028; Gibco) was added for 1 min at room temperature, and the cells were washed once with DPBS. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature and washed with DPBS, removing as much liquid as possible from the sample. To each tube was added a drop of FluorSave reagent (catalog number 345789; Calbiochem), and the contents were mixed carefully, placed on a clean slide, and stored in the dark at 4°C for at least 24 h before being observed under a microscope.

Immunoprecipitation. *E. histolytica* trophozoites were cultured in glass tubes under axenic conditions. Trophozoites were harvested by chilling the culture tubes at 4°C in a water-ice bath for 10 min, and then they were centrifuged at $300 \times g$ for 5 min and washed with sterile DPBS (Sigma-Aldrich). Trophozoites were treated with fludarabine (50 μ M) at 37°C for 30 min and then stimulated with IFN- γ (100 ng/ml) at 37°C for 20 min. Lysates were prepared from trophozoites by using a modified protocol (47). *E. histolytica* trophozoites were washed twice in cold PBS and suspended in radioimmunoprecipi-

tation assay (RIPA) buffer containing protease inhibitor cocktail (Sigma), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), sodium fluoride, and sodium orthovanadate. Lysates were centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min. Immunoprecipitation was carried out using 200 μg of protein, and the primary antibody (anti-phospho-Tyr antibody, 1.5 μg ; BD transduction laboratories) was incubated with the supernatant for 8 h at 4°C, followed by 12 h at 4°C with protein A/G plus-agarose (Santa Cruz Biotechnology). Samples were run on 7.5% SDS-PAGE gels and probed with antibodies as follows: anti-STAT1 antibody (Santa Cruz) and anti-phospho-STAT1 antibody (Abcam).

Chemotaxis. Chemotaxis of *E. histolytica* trophozoites toward IFN- γ was monitored in Transwell migration chambers (catalog number 3464; Corning) as previously reported (48). The chemoattractant gradients were generated by placing 600 μl of culture medium without serum and containing 100 ng/ml of IFN- γ in the lower chamber of the migration units and 30,000 *E. histolytica* trophozoites on the filter of the upper Transwell chamber. Cells were maintained under 0.05% CO₂ conditions at 37°C for 30 min. Cells that migrated toward IFN- γ and reached the lower chamber were recovered, stained with crystal violet, and quantified in an inverted microscope. To inhibit chemotaxis toward IFN- γ , trophozoites were treated with cytochalasin D, which depolymerizes actin/myosin filaments, as previously described (21). A coverslip chemotaxis gradient assay was used to visualize individual migrating *E. histolytica* trophozoites; for this, 180 μl of serum-depleted medium containing 100 ng/ml of IFN- γ was injected into a 0.75% agarose strip placed along one edge of each coverslip. On the opposite edge, trophozoites were placed along a narrow band and allowed to attach to the glass for 20 min. Chemotaxis of trophozoites toward IFN- γ (100 ng) was visualized using phase-contrast video microscopy. Video registers were made with a Carl Zeiss Axiovert 40CFL inverted microscope and the digital camera used in the immunofluorescence assays. Time-lapse videos were generated from 114 spaced frames, with 2 s between each frame acquired for 4-min real-time registers. Each video was processed with AxioVision 40V 4.6.3.0 software. To register random motility of trophozoites in the absence of IFN- γ , agarose strips not containing IFN- γ and only injected with serum-free culture medium were placed on one edge of coverslips, and migration was recorded as described above. The data analysis was performed using ImageJ 1.51n (<http://imagej.nih.gov/ij>).

Cytotoxicity assay. Human adenocarcinoma Caco-2 cells and human liver cancer HepG2 cells from ATCC were grown to confluent monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (catalog number 11995-040; Thermo Fisher) with 10% serum, penicillin, and streptomycin for 3 days (modified from the procedures in references 49 and 50). Cells grown in 24-well plates to 80 to 90% confluence were washed twice with DPBS, and 500 μl of DMEM medium was added per well. *E. histolytica* trophozoites (1×10^5 per well) were treated or not with the STAT1 inhibitor fludarabine (50 μM) (catalog number Sc-204755; Santa Cruz) for 30 min prior to IFN- γ (100 ng/ml) stimulation for 20 min. For the interaction, trophozoites were added to each well for 1 h. After incubation, the cells were placed on ice, washed with DPBS, and fixed with 2.5% paraformaldehyde for 10 min. The monolayer was stained with 0.1% methylene blue in 0.1 M borate buffer (pH 8) for 10 min at room temperature. The plates were washed with 0.1 M borate buffer twice to remove excess stain. Finally, 1 ml of 1 N HCl was added to each well for 30 min at 37°C to extract the stain, and the absorbance read on a spectrometer at 655 nm (optical density at 655 nm [OD₆₅₅]). The percentage of monolayer destruction was calculated as follows: $[\text{OD}_{655}(\text{control wells}) - \text{OD}_{655}(\text{experimental wells})/\text{OD}_{655}(\text{control wells})] \times 100$.

Animals. Male golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) weighing 140 to 160 g were used in this study. The animals were maintained on standard diet with free access to drinking water. All animals received humane care according to the guidelines of the Committee on Bioethics in the animal facilities of the Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico, which are based on the guidelines for animal research published by the National Institutes of Health (51).

Experimental hepatic amebiasis. *E. histolytica* trophozoites (5×10^5) were incubated in the presence or absence of 100 ng/ml of recombinant IFN- γ (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) for 20 min. After incubation, trophozoites were washed with PBS and inoculated into the left liver lobe of hamsters in 100 μl of culture medium as previously described (44, 52). After 4 days, the animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg of body weight intraperitoneally), the liver was excised for macroscopic evaluation, and several specimens that included ALA were taken, fixed in 4% paraformaldehyde, and processed for histological analysis.

H&E staining. To visualize ALA development, we performed hematoxylin and eosin (H&E) staining as described in the *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces* (53). The sample tissues were analyzed to determine the percentages of necrotic and inflammatory areas using ImageJ software.

Immunohistochemistry. To visualize the presence of *E. histolytica* trophozoites in liver tissue, sections were subjected to immunohistochemistry as described previously (53). For *E. histolytica* immunodetection, the samples were incubated with the primary antibody rabbit anti-*E. histolytica* antibody, raised in our laboratory, diluted 1:400 at 4°C. The secondary antibody, goat anti-rabbit IgG, was diluted 1:500 (Sigma-Aldrich) and incubated for 2 h at room temperature. Slides were washed with PBS-Tween 20 for 10 min, and peroxidase activity was developed with diaminobenzidine (DAB) (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA) for 5 min.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Student's *t* test and one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's *post hoc* test were used. Differences between groups were assessed as significant at a *P* value of <0.05. Experimental results are represented in the figures as the mean values from three independent experiments \pm standard deviations (SD).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/IAI.00540-19>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.04 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 2, MP4 file, 2.2 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 3, MP4 file, 3.4 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank UAA for the PIBB16-2 grant to Javier Ventura-Juárez and acknowledge a discovery grant (grant number RGPIN-2019-04136) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada awarded to Kris Chadee, CONACYT doctoral fellowships to Julieta Pulido-Ortega (grant number 290934) and Aralia Leon-Coria (grant number 314101), postdoctoral support given to Liseth Rubí Aldaba-Muruato (grant number 176507), and a CONACYT grant to Javier Ventura-Juárez (grant number 286184).

We thank Manuel Enrique Avila-Blanco for image analysis.

We declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Bruckner DA. 1992. Amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 5:356–369. <https://doi.org/10.1128/cmr.5.4.356>.
- Chávez-Munguía B, Talamás-Rohana P, Castañón G, Salazar-Villatoro L, Hernández-Ramírez V, Martínez-Palomo A. 2012. Differences in cap formation between invasive *Entamoeba histolytica* and non-invasive *Entamoeba dispar*. *Parasitol Res* 111:215–221. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2820-2>.
- García-Nieto RM, Rico-Mata R, Arias-Negrete S, Avila EE. 2008. Degradation of human secretory IgA1 and IgA2 by *Entamoeba histolytica* surface-associated proteolytic activity. *Parasitol Int* 57:417–423. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.04.013>.
- Talamás-Rohana P, Schlie-Guzmán MA, Hernández-Ramírez VI, Rosales-Encina JL. 1995. T-cell suppression and selective in vivo activation of TH2 subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220-kilodalton lectin. *Infect Immun* 63:3953–3958.
- Wang W, Chadee K. 1995. *Entamoeba histolytica* suppresses gamma interferon-induced macrophage class II major histocompatibility complex la molecule and I-A beta mRNA expression by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *Infect Immun* 63:1089–1094.
- Sabeti PC, Schaffner SF, Fry B, Lohmueller J, Varilly P, Shamovsky O, Palma A, Mikkelsen TS, Altshuler D, Lander ES. 2006. Positive natural selection in the human lineage. *Science* 312:1614–1620. <https://doi.org/10.1126/science.1124309>.
- Woolhouse MEJ, Webster JP, Domingo E, Charlesworth B, Levin BR. 2002. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat Genet* 32:569–577. <https://doi.org/10.1038/ng1202-569>.
- Moncada D, Keller K, Chadee K. 2003. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. *Infect Immun* 71:838–844. <https://doi.org/10.1128/iai.71.2.838-844.2003>.
- Dey I, Chadee K. 2008. Prostaglandin E2 produced by *Entamoeba histolytica* binds to EP4 receptors and stimulates interleukin-8 production in human colonic cells. *Infect Immun* 76:5158–5163. <https://doi.org/10.1128/IAI.00645-08>.
- Gilchrist CA, Petri WA. 1999. Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. *Curr Opin Microbiol* 2:433–437. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80076-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80076-9).
- Chadee K, Petri WA, Innes DJ, Ravdin JI. 1987. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* 80:1245–1254. <https://doi.org/10.1172/JCI113199>.
- Lidell ME, Moncada DM, Chadee K, Hansson GC. 2006. *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9298–9303. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600623103>.
- Kelsall BL, Ravdin JI. 1993. Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 168:1319–1322. <https://doi.org/10.1093/infdis/168.5.1319>.
- Gilmartin AA, Ralston KS, Petri WA. 2017. Inhibition of amebic lysosomal acidification blocks amebic trophocytosis and cell killing. *mBio* 8:e01187-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01187-17>.
- Calderón J, de Lourdes Muñoz M, Acosta HM. 1980. Surface redistribution and release of antibody-induced caps in entamoebae. *J Exp Med* 151:184–193. <https://doi.org/10.1084/jem.151.1.184>.
- Bruchhaus I, Richter S, Tannich E. 1997. Removal of hydrogen peroxide by the 29 kDa protein of *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* 326:785–789. <https://doi.org/10.1042/bj3260785>.
- Davis PH, Zhang Z, Chen M, Zhang X, Chakraborty S, Stanley SL. 2006. Identification of a family of BspA like surface proteins of *Entamoeba histolytica* with novel leucine rich repeats. *Mol Biochem Parasitol* 145: 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.08.017>.
- Flores-Romo L, Tsutsumi V, Estrada-García T, Shibayama M, Aubry JP, Bacon KB, Martínez-Palomo A. 1994. CD59 (protectin) molecule, resistance to complement, and virulence of *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88:116–117. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90530-4).
- Goplen M, Lejeune M, Cornick S, Moreau F, Chadee K. 2013. *Entamoeba histolytica* contains an occludin-like protein that can alter colonic epithelial barrier function. *PLoS One* 8:e73339. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073339>.
- Mancilla-Herrera I, Méndez-Tenorio A, Wong-Baeza I, Jiménez-Urbe AP, Alcántara-Hernández M, Ocádiz-Ruiz R, Moreno-Eutimio MA, Arriaga-Pizano LA, López-Macias C, González-y-Merchand J, Isibasi A. 2012. A Toll/IL-1R/resistance domain-containing thioredoxin regulates phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Parasit Vectors* 5:224. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-224>.
- Díaz-Valencia JD, Pérez-Yépez EA, Ayala-Sumano JT, Franco E, Meza I. 2015. A surface membrane protein of *Entamoeba histolytica* functions as a receptor for human chemokine IL-8: its role in the attraction of trophozoites to inflammation sites. *Int J Parasitol* 45:915–923. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.07.007>.
- Blazquez S, Zimmer C, Guigon G, Olivo-Marin J-C, Guillén N, Labruyère E. 2006. Human tumor necrosis factor is a chemoattractant for the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 74:1407–1411. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.1407-1411.2006>.
- Castellanos C, Ramos C, Ortiz-Ortiz L. 1989. Effects of gamma interferon on syntheses of DNA and proteins by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 57:2771–2775.
- Sierra-Puente RE, Campos-Rodríguez R, Jarillo-Luna RA, Muñoz-Fernández L, Rodríguez MG, Muñoz-Ortega MH, Ventura-Juárez J. 2009. Expression of immune modulator cytokines in human fulminant amoebic colitis. *Parasite Immunol* 31:384–391. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01118.x>.
- Talamás-Lara D, Chávez-Munguía B, González-Robles A, Talamás-Rohana P, Salazar-Villatoro L, Durán-Díaz Á, Martínez-Palomo A. 2014. Erythrophagocytosis in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: a com-

- parative study. *BioMed Res Int* 2014;1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/626259>.
26. Bailey GB, Leitch GJ, Day DB. 1985. Chemotaxis by *Entamoeba histolytica*. *J Protozool* 32:341–346. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1985.tb03063.x>.
 27. Yu Y, Chadee K. 1997. *Entamoeba histolytica* stimulates interleukin 8 from human colonic epithelial cells without parasite-enterocyte contact. *Gastroenterology* 112:1536–1547. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(97\)70035-0](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(97)70035-0).
 28. Katz U, Anki S, Stolarsky T, Nuchamowitz Y, Mirelman D. 2002. *Entamoeba histolytica* expressing a dominant negative N-truncated light subunit of its gal-lectin are less virulent. *Mol Biol Cell* 13:4256–4265. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-06-0344>.
 29. Begum S, Quach J, Chadee K. 2015. Immune evasion mechanisms of *Entamoeba histolytica*: progression to disease. *Front Microbiol* 6:1394. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01394>.
 30. Nakada-Tsukui K, Nozaki T. 2016. Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*. *Front Immunol* 7:175. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00175>.
 31. Olivos-García A, Saavedra E, Ramos-Martínez E, Nequiz M, Pérez-Tamayo R. 2009. Molecular nature of virulence in *Entamoeba histolytica*. *Infect Genet Evol* 9:1033–1037. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.04.005>.
 32. Rico G, Leandro E, Rojas S, Giménez JA, Kretschmer RR. 2003. The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Parasitol Res* 90:264–267. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0780-7>.
 33. del Villalobos-Gómez FR, García-Lorenzana M, Escobedo G, Talamás-Rohana P, Salinas-Gutiérrez R, Hernández-Ramírez V-I, Sánchez-Alemán E, del Campos-Esparza MR, Muñoz-Ortega MH, Ventura-Juárez J. 2018. *Entamoeba histolytica* L220 induces the in vitro activation of macrophages and neutrophils and is modulated by neurotransmitters. *Acta Parasitol* 63:270–279. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0031>.
 34. Ngobeni R, Abhyankar MM, Jiang NM, Farr LA, Samie A, Haque R, Moonah SN. 2017. *Entamoeba histolytica*-encoded homolog of macrophage migration inhibitory factor contributes to mucosal inflammation during amebic colitis. *J Infect Dis* 215:1294–1302. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix076>.
 35. Guo X, Stroup SE, Houpt ER. 2008. Persistence of *Entamoeba histolytica* infection in CBA mice owes to intestinal IL-4 production and inhibition of protective IFN- γ . *Mucosal Immunol* 1:139–146. <https://doi.org/10.1038/mi.2007.18>.
 36. Salata RA, Pearson RD, Ravdin JI. 1985. Interaction of human leukocytes and *Entamoeba histolytica*. Killing of virulent amebae by the activated macrophage. *J Clin Invest* 76:491–499. <https://doi.org/10.1172/JCI111998>.
 37. Haque R, Mondal D, Shu J, Roy S, Kabir M, Davis AN, Duggal P, Petri WA, Jr. 2007. Correlation of interferon- γ production by peripheral blood mononuclear cells with childhood malnutrition and susceptibility to amebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 76:340–344. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.340>.
 38. Huston CD, Boettner DR, Miller-Sims V, Petri WA, Jr. 2003. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 71:964–972. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.964-972.2003>.
 39. Ralston KS. 2015. Taking a bite: amoebic trophocytosis in *Entamoeba histolytica* and beyond. *Curr Opin Microbiol* 28:26–35. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.07.009>.
 40. Dey I, Keller K, Belley A, Chadee K. 2003. Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13561–13566. <https://doi.org/10.1073/pnas.1835863100>.
 41. Shahi P, Moreau F, Chadee K. 2019. *Entamoeba histolytica* cyclooxygenase-like protein regulates cysteine protease expression and virulence. *Front Cell Infect Microbiol* 8:447. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00447>.
 42. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. 1997. The IFN- γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15:563–591. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.563>.
 43. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72:431–432. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(78\)90144-x](https://doi.org/10.1016/0035-9203(78)90144-x).
 44. Tsutsumi V, Mena-Lopez R, Anaya-Velazquez F, Martinez-Palomo A. 1984. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol* 117:81–91.
 45. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
 46. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
 47. Cruz-Vera J, Clara L, Hernández-Kelly R, Alfredo-Méndez J, Pérez-Salazar E, Ortega A. 2003. Collagen-induced STAT family members activation in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *FEMS Microbiol Lett* 229:203–209. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00822-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00822-X).
 48. Franco E, Vazquez-Prado J, Meza I. 1997. Fibronectin-derived fragments as inducers of adhesion and chemotaxis of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *J Infect* 6:1597–1602. <https://doi.org/10.1086/514160>.
 49. Ravdin JI, Guerrant RL. 1981. Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* 68:1305–1313. <https://doi.org/10.1172/jci110377>.
 50. Lee J, Park S-J, Yong T-S. 2008. Effect of iron on adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* to CHO cell monolayers. *Korean J Parasitol* 46:37–40. <https://doi.org/10.3347/kjp.2008.46.1.37>.
 51. National Research Council. 2011. Guide for the care and use of laboratory animals, 8th ed. National Academies Press, Washington, DC.
 52. Ventura-Juarez J, Campos-Rodríguez R, Tsutsumi V. 2002. Early interactions of *Entamoeba histolytica* trophozoites with parenchymal and inflammatory cells in the hamster liver: an immunocytochemical study. *Can J Microbiol* 48:123–131. <https://doi.org/10.1139/w01-136>.
 53. Munro BH. 1971. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. *Pathology* 3:249. [https://doi.org/10.1016/S0031-3025\(16\)39410-7](https://doi.org/10.1016/S0031-3025(16)39410-7).