



**UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES**

Centro de Ciencias Básicas
Departamento de Morfología

Tesis:

**“El efecto de adrenalina y acetilcolina sobre las propiedades de virulencia
de *Entamoeba histolytica*”**

Presenta:

M. en C. Marina Nayeli Medina Rosales

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Biológicas

Comité Tutorial:

Dr. Javier Ventura Juárez

Dra. Mariana Haydee García Hernández

Dra. Iliana Ernestina Medina Ramírez

Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega

Aguascalientes, Ags. 14 de diciembre 2020

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como Miembros del Comité Tutorial designado del estudiante MARINA NAYELI MEDINA ROSALES con ID 120647 quien realizó la tesis titulada: EL EFECTO DE ADRENALINA Y ACETILCOLINA SOBRE LAS PROPIEDADES DE VIRULENCIA DE *Entamoeba histolytica*, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado. Adicionalmente, los resultados de este proyecto se enviaron a publicación "Acetylcholine upregulates *Entamoeba histolytica* virulence factors, enhancing parasite pathogenicity in experimental liver amebiasis" a la revista *Frontiers Cellular and Infection Microbiology*, el cual ha sido aceptado para publicación.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 17 de diciembre de 2020.

 Dr. Javier Ventura Juárez Tutor de tesis	 Dra. Mariana Haydee García Hernández Co-Tutor de tesis
 Dra. Ilana Ernestina Medina Ramírez Asesor de tesis	 Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado

c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado



DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 01-mar-21

NOMBRE: MARINA NAYELI MEDINA ROSALES ID: 120647
PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS LGAC (del posgrado): Proteínas en la respuesta inmune y la secreción neural
TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo práctico
TITULO: EL EFECTO DE LA ADRENALINA Y ACETILCOLINA SOBRE LAS PROPIEDADES DE VIRULENCIA DE ENTAMOEBA HISTOLYTICA
IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): SE IDENTIFICÓ EL EFECTO DE NORADRENALINA Y ACETILCOLINA SOBRE LA VIRULENCIA DE ENTAMOEBA HISTOLYTICA

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
SI Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI Coincide con el título y objetivo registrado
SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o publicación de los artículos según el nivel del programa
SI El estudiante es el primer autor
SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

SI
No

FIRMAS

Elaboró: * NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

[Firma]

DR. DANIEL CERVANTES GARCÍA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

[Firma]

DRA. ALMA LILIA GONZÁLEZ BARRERA

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial asignado por el NAB

Revisó: NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

[Firma]

DRA. MARCE MARTÍNEZ SUVALCABA

Autorizó: NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

[Firma]

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 305C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 305F las funciones del Secretario Técnico, llevar al argumento de los alumnos.

Agradecimientos

Quiero extender un profundo agradecimiento, a quienes fueron colaboradores en este proyecto. En especial al **Dr. Javier Ventura Juárez** por su apoyo y gran dedicación a este proyecto. Agradezco también a la **Dra. Mariana Haydee García Hernández**, a la **Dra. Iliana Ernestina Medina Ramírez** y al **Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega** por todas sus valiosas aportaciones para el desarrollo de este trabajo. Gracias a la Universidad Autónoma de Aguascalientes y a CONACYT por otorgar la Beca de Doctorado a Marina Nayeli Medina-Rosales (Número CVU: 555426).



Dedicatoria

Este trabajo es dedicado con un profundo cariño y agradecimiento, a mi familia especialmente a mis padres por su apoyo incondicional.



Índice

Índice.....	1
Índice de figuras.....	3
Índice de Tablas	4
Acrónimos	5
Resumen	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
<i>E. histolytica</i>	9
Ciclo de vida.....	9
Epidemiología	10
Patogénesis.....	10
Adherencia.....	11
Citopatogenicidad.....	11
Fagocitosis.....	12
Proteasas de cisteína	12
Migración	13
Respuesta inmune	13
Neuroinmunomodulación	13
El efecto inmunomodulador de adrenalina.....	14
El efecto inmunomodulador de acetilcolina.....	14
Antecedentes.....	16
Hipótesis	18
Justificación	19
Objetivo general	20
Objetivos específicos.....	20
Metodología	21
Cultivo axénico Entamoeba histolytica.....	21
Ensayo proliferación y viabilidad	21
Ensayo de inmunofluorescencia	21
Ensayo de eritrofagocitosis	22
Ensayo de citotoxicidad en monocapa de células Hep G2	23
Ensayo de modificación del citoesqueleto	23

Extracción de ARN	24
Amplificación mediante RT-PCR.....	25
PCR punto final	25
PCR tiempo real (qPCR)	27
Western blot	27
Actividad de proteasas de cisteína	28
Ensayo de migración Transwell.....	28
Absceso hepático amebiano experimental	29
Análisis Estadístico	29
Resultados.....	30
Viabilidad y cinética de crecimiento	30
Identificación y localización celular de proteínas fijadoras de adrenalina y acetilcolina en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	33
Expresión de la subunidad pesada (170 kDa) de la Lectina Gal/GalNAc, amebaporos, CP-2 y CP-5.....	36
Expresión de L220 y β -actina.....	38
Distribución de actina polimerizada	40
Cuantificación estructuras ricas en actina	41
Ensayo de citotoxicidad de la monocapa	44
Actividad de proteasas de cisteína	46
Eritrofagocitosis.....	48
Quimiotaxis y la migración de <i>E. histolytica</i>	50
Efecto de adrenalina y acetilcolina sobre el desarrollo de absceso hepático amebiano	52
Discusión	55
Conclusiones	63
Glosario	64
Bibliografía.....	66
Anexos.....	75
Anexo A.....	75

Índice de figuras

Figura 1. Viabilidad y proliferación de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> tratados con adrenalina.....	31
Figura 2. Viabilidad y proliferación de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> tratados con acetilcolina.....	32
Figura 3. Localización celular de proteínas receptoras de adrenalina y acetilcolina en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	34
Figura 4. Unión de acetilcolina y adrenalina en la membrana de <i>E. histolytica</i>	35
Figura 5. Expresión de factores de virulencia de <i>E. histolytica</i>	37
Figura 6. Expresión de factores de virulencia de <i>E. histolytica</i>	37
Figura 7. Expresión de factores de virulencia de <i>E. histolytica</i>	38
Figura 8. Expresión de β -actina y L220 analizada por western blot.....	39
Figura 9. Identificación de estructuras ricas en F-actina en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	41
Figura 10. Detección y localización de G-actina y F-actina en trofozoítos tratados con acetilcolina.....	43
Figura 11. Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia de actina F y G.....	44
Figura 12. Actividad citopática de <i>E. histolytica</i> . Porcentaje de destrucción de la monocapa de células HepG2.....	45
Figura 13. Actividad citopática de <i>E. histolytica</i> . Porcentaje de destrucción de la monocapa de células HepG2.....	46
Figura 14. Efectos citopáticos y citotóxicos de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> mediados por acetilcolina.....	47
Figura 15. Efecto de adrenalina y acetilcolina sobre la eritrofagocitosis de <i>E. histolytica</i>	49
Figura 16. Acetilcolina y adrenalina inducen la migración de <i>E. histolytica</i> y la actividad quimioatrayente.....	51
Figura 17. Efectos de la acetilcolina y adrenalina sobre el desarrollo de abscesos hepáticos amebianos (AHA).....	53
Figura 18. Daño del tejido hepático causado por trofozoítos de <i>E. histolytica</i> activados por acetilcolina y adrenalina.....	54

Índice de Tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para qPCR.....26



Acrónimos

AC	Adenilato ciclasa
Ach	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Adr	Adrenalina
AHA	Absceso hepática amebiano
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido desoxirribonucleico
CD	Citocalasina D
CHO	Línea celular de ovario de hámster chino
CP-1	Proteasa de cisteína 1
CP-2	Proteasa de cisteína 2
CP-5	Proteasa de cisteína 5
E-64	Inhibidor irreversible de proteasas de cisteína
F-actina	Actina fibrilar
G-actina	Actina glbular
GTP	Guanosín trifosfato
HepG2	Línea celular de cáncer de hígado
IFN- γ	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IL-18	Interleucina 18
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IMF	Intensidad media de fluorescencia
JAK2	Quinasa tipo Janus 2
kDa	Kilodaltons
mA	Miliamperio
NF-κB	Factor nuclear kappa B
PBS	Buffer salino fosfato
PFA	Paraformaldehído
PKC	Proteína quinasa C
qRT-PCR	Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR
Rab	Familia de GTPasas de fusión de membrana
SEM	Error estándar de la media
SFB	Suero Fetal Bovino

SNC	Sistema nervioso central
SNE	Sistema nervioso entérico
STAT3	Traductor de señal y activador de la transcripción
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
UV	Ultravioleta
V	Voltio



Resumen

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) es un parásito que coloniza el intestino grueso del humano, aunque puede llegar a invadir otros órganos como hígado, pulmón y cerebro. La capacidad invasiva de la amiba está asociada a diferentes propiedades intrínsecas con las que cuenta el parásito, también conocidas como factores de virulencia. Recientemente se ha reportado que *E. histolytica* expresa proteínas G y que estas moléculas participan en la regulación de la patogenicidad del parásito, a través de la expresión de sus factores de virulencia, aunque no han sido identificados los posibles receptores ni sus posibles ligandos. Se sugiere que diversos estímulos exógenos pueden regular la virulencia de *E. histolytica* a través de estas vías de señalización. El objetivo de este estudio es analizar los posibles efectos moduladores de la adrenalina y acetilcolina sobre la virulencia de *E. histolytica*. Se ha evaluado la capacidad de los trofozoítos para fijar en su membrana a estos dos neurotransmisores, también, el efecto que tiene acetilcolina y adrenalina sobre la capacidad fagocítica, citopática y distribución de estructuras ricas en actina de *E. histolytica*. Adicionalmente, se determinó la expresión de factores de virulencia por qRT-PCR. Los resultados muestran que trofozoítos de *E. histolytica* fijan en su membrana a ambos neurotransmisores, asimismo, se observa un claro incremento de eritrofagocitosis, citotoxicidad y activación del citoesqueleto de la amiba, después del tratamiento, aumentó la expresión de L220, subunidad pesada de lectina Gal / GalNAc (170 kDa), amebaporo C, cisteína proteinasa 2 (*ehcp-a2*) y cisteína proteinasa 5 (*ehcp-a5*). Del mismo modo, los trofozoítos tratados con los neurotransmisores desarrollaron lesiones hepáticas mayores con múltiples granulomas en hámster. En conclusión, adrenalina y acetilcolina incrementaron la patogenicidad del parásito al regular diversos factores de virulencia, contribuyendo así, a la gravedad de la enfermedad y consecuentemente podría estar asociado al establecimiento de amebiasis invasiva.

Palabras clave: *Entamoeba histolytica*, amebiasis, acetilcolina, adrenalina, factores de virulencia, invasión.

Abstract

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) is a parasite that colonizes the human large intestine, although it can invade other organs such as liver, lung, and brain. The invasive capacity of the amoeba is associated to different parasite intrinsic properties, also known as virulence factors. Recently, it has been reported that *E. histolytica* expresses G proteins and that these molecules participate in the regulation of the pathogenicity of the parasite, although the possible receptors and their possible ligands have not been identified yet. It is suggested that various exogenous stimuli such as adrenaline and acetylcholine may regulate the virulent properties of *E. histolytica* through this cell signaling pathways. The aim of this study is to evaluate the possible modulating effects of adrenaline and acetylcholine over the virulence of *E. histolytica*. The capability of trophozoites to bind these two neurotransmitters to their membrane has been evaluated. The effect of acetylcholine and adrenaline on the phagocytic and cytopathic capacity and the distribution of actin rich structures of *E. histolytica* was also analyzed. Additionally, the expression of virulence factors was determined by qRT-PCR. Similarly, when evaluating the formation of amoebic liver abscess, trophozoites treated with the neurotransmitters developed larger liver lesions with multiple granulomas. In conclusion, adrenaline and acetylcholine increased the pathogenicity of the parasite by regulating various virulence factors, thus contributing to the severity of the disease, and could be associated with the establishment of invasive amebiasis.

Keywords: *Entamoeba histolytica*, amebiasis, acetylcholine, adrenalin, virulence factors, invasiveness.

Introducción

E. histolytica

La gran mayoría de las especies del género *Entamoeba* son consideradas comensales, el ser humano puede ser parasitado por diversas especies de *Entamoeba*, de las cuales *E. histolytica* ha sido identificado como especie patógena (Wilson et al., 2019). El ciclo de vida de *E. histolytica* presenta 2 estadios: quiste y trofozoíto. El quiste es la forma infectiva del parásito, que morfológicamente se distingue por tener cuatro núcleos y cada uno de los núcleos posee un cariosoma central, una cromatina periférica y una pared gruesa de quitina. Los quistes son estructuras muy resistentes ya que puede sobrevivir en ambientes muy adversos, como la cloración, altas temperatura y el pH del estómago. Los portadores de esta fase infectiva son pacientes asintomáticos o pacientes de amebiasis crónica. Los trofozoítos son la fase móvil, es decir la forma patógena que invade tejidos, que pierde su capacidad infectante al ser lábil en el medio ambiente. Se caracteriza por tener un núcleo con un endosoma central y cromatina periférica. Tiene además un citoplasma dividido en dos zonas: ectoplasma y endoplasma. Estas estructuras pueden encontrarse en las heces frescas y tejidos de pacientes infectados (Choudhuri & Rangan, 2012).

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *E. histolytica* comienza con la ingesta de quistes maduros dada por transmisión fecal-oral. Los quistes descienden a través del tracto gastrointestinal, a su paso por el estómago la pared quística se reblandece y una vez en la porción del íleon se da el desenquistamiento, liberando un trofozoíto metaquístico, que contiene cuatro núcleos y cada uno de esos núcleos se dividen dando lugar a ocho trofozoítos que en la luz del intestino se multiplicarán por fisión binaria. Posteriormente, los trofozoítos se enquistan y son desechados en las heces de los pacientes, perpetuándose así el ciclo de vida del parásito (Mi-Ichi et al., 2016).

Epidemiología

A nivel mundial, cada año 50 millones de personas son infectadas por este parásito y, a causa de esta infección, mueren alrededor de 55,000 personas (Lozano et al., 2012; «WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997», 1997). La distribución geográfica de *E. histolytica* es cosmopolita, aunque prevalece mayormente en zonas tropicales donde el saneamiento ambiental es deficiente ya que la infección se da tras el consumo de alimentos y agua contaminada con materia fecal (Ralston & Petri, 2011). Los países con mayores tasas de incidencia incluyen a India, México y África. La amebiasis es un padecimiento que afecta en proporciones parecidas a mujeres y hombres, aunque el desarrollo de abscesos hepático amebiano es más común en hombres de entre 20 y 50 años. Aunque no se conocen las razones de estas diferencias, los niños y mujeres parecen tener como factores de protección la edad y condiciones hormonales (Snow et al., 2008).

Patogénesis

El periodo de incubación es ampliamente variable, *E. histolytica* coloniza el lumen del intestino grueso como comensal o bien pueden adherirse a la mucosa y por consiguiente llegar al epitelio intestinal, los trofozoítos que penetran la mucosa intestinal forman lesiones ulcerosas con bordes necróticos con una presencia abundante de trofozoítos, aunque en las zonas circundantes la presencia de amibas es escasa (Gitler et al., 1984). La característica principal de las lesiones causada por la amebiasis es la naturaleza destructiva de tejidos, con escasa hemorragia, acompañada de necrosis, licuefacción del tejido y con una respuesta inflamatoria relativamente pequeña (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). El progreso de la infección a una enfermedad extraintestinal puede darse cuando los trofozoítos de *E. histolytica* alcanzan la circulación portal, favoreciendo así, la diseminación de la amiba (Haque et al., 2003). La evolución de la enfermedad se relaciona tanto a factores del hospedero como del parásito. La virulencia de *E. histolytica* se encuentra específicamente asociada a la severidad de la enfermedad a través de la adherencia, degradación proteolítica de la mucosa intestinal, la citopatogenicidad y migración (Faust &

Guillen, 2012; Padilla-Vaca & Anaya-Velázquez, 2010). Claramente estos eventos son el resultado de diversos factores y sucesos coordinados durante la invasión de tejidos.

Adherencia

La adherencia de los trofozoítos a tejido del hospedero es un proceso indispensable en la colonización, invasión y citotoxicidad del parásito, que se encuentra mediado por proteínas de membrana como la adhesina de 112 KDa, lectina galactosa y N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNAc 260 kDa) y la lectina de 220 KDa (Rosales-Encina, Meza, López-De-León, Talamás-Rohana, & Rojkind, 1987; Aguirre García, Gutiérrez-Kobeh, & López Vancell, 2015). Otra proteína que participa en la adhesión es la proteína rica en serina de *E. histolytica* (PRSEH) aunque su función no se conoce del todo, se ha sugerido que podría participar también en procesos de fagocitosis (Teixeira & Huston, 2008). Algunos estudios describen que las lectinas no sólo participan en procesos de adhesión, sino que también son esenciales en los mecanismos de invasión a tejidos y citotoxicidad de *E. histolytica*, además se propone que pueden estar involucradas en la transducción de señales (Coppi, Merali, & Eichinger, 2002). Se ha demostrado que ligandos específicos de la lectina Gal/GalNAc, como el colágeno y los eritrocitos llegan a activar vías de señalización que involucran el PIP₂ y Calcio (Goldston et al., 2012). Por lo que se considera de gran importancia la comprensión de estos procesos durante invasión y la participación de estos receptores de membrana en las funciones de virulencia en *E. histolytica*.

Citopatogenicidad

La citotoxicidad amebiana es un proceso indispensable en la patogénesis de *E. histolytica*, la cual puede darse a través de procesos dependientes de contacto, como en la trogocitosis, proceso por el cual la amiba ingiere fragmentos celulares que provocan la muerte de la célula debido al incremento de calcio intracelular (Ralston et al., 2014). En el caso de los procesos contacto independiente por la exposición a factores solubles secretados por trofozoítos, que incluye a las proteínas formadoras de poros. Estas proteínas pertenecen a la familia de pequeños péptidos anfipáticos, que contienen 77 residuos de aminoácidos,

también conocidos como amebaporos, provocando una lisis osmótica al insertarse en la membrana de las células blanco (Zhang et al., 2004).

Fagocitosis

La fagocitosis de bacterias, eritrocitos y restos celulares es otra de las principales características de los trofozoítos de *E. histolytica*, mecanismo que es considerado indispensable en la patogenicidad del parásito (Iyer et al., 2019; Christy & Petri, 2011). Se ha demostrado que la capacidad fagocítica de *E. histolytica* es mayor con respecto a *E. dispar* (una especie no patógena). En otro de los eventos que le preceden a la fagocitosis que es la opsonización de las células blanco se han reportado diferencias entre ambas especies, donde *E. histolytica* muestra mayor capacidad de adherencia y opsonización lo que podría estar asociado al incremento de la fagocitosis, mecanismo que es un importante indicador de virulencia (Boettner et al., 2005; Talamás-Lara et al., 2014).

Proteasas de cisteína

Otro factor de virulencia son las proteasas de cisteína. Estas enzimas participan en la degradación de componentes de matriz extracelular, favoreciendo la invasión del tejido (Thibeaux et al., 2014). Además, se ha descrito que estas proteasas también contribuyen a procesos de citotoxicidad amebiana (Christy & Petri, 2011; Gutiérrez-Kobeh, Cabrera, & Pérez-Montfort, 1997). Asimismo, son consideradas indispensables en la evasión de la respuesta inmune pues en su expresión como proteasas extracelulares, pueden inducir la proteólisis de citocinas proinflamatorias, inmunoglobulinas IgG e IgA y algunas anafilotoxinas del complemento. Además, se ha demostrado que su expresión y actividad son importantes en el desarrollo de abscesos hepático amebiano en modelos animales. El análisis del genoma del parásito revela que 86 genes codifican para posibles peptidasas, de las cuales 50 son proteasas de cisteína (Tillack et al., 2007). Durante la infección por *E. histolytica* la CP-1, CP-2 y CP-5 son responsables del 90% de la actividad de las proteasas de cisteína (Cornick & Chadee, 2017).

Migración

De los mecanismos determinantes en la invasión amebiana son la motilidad y quimiotaxis, procesos regulados tanto por factores físicos como químicos, tal es el caso de quimiocinas, hormonas, neurotransmisores, factores paracrinos y autocrinos (Zaki et al., 2006). El citoesqueleto amebiano rico en actina es indispensable para la motilidad de *E. histolytica*, en este contexto el citoesqueleto es importante en procesos biológicos de la ameba que incluye: fagocitosis, proliferación y adherencia; incluso se ha demostrado que los trofozoítos de *E. histolytica* en procesos invasivos incrementan la expresión de actina (Manich et al., 2018). Para los trofozoítos altamente móviles es necesario la reorganización del citoesqueleto, demostrando la participación de esta estructura en la patogénesis amebiana (Aguilar-Rojas et al., 2016).

Respuesta inmune

Durante la infección, los trofozoítos interactúan con la respuesta inmune del hospedero. El primer encuentro se da con la mucosa intestinal, la cual tiene una función de ser una barrera física frente a patógenos (Cornick & Chadee, 2017; Nakada-Tsukui & Nozaki, 2016). La respuesta inmune es la segunda defensa y el componente más abundante son las inmunoglobulinas, las cuales impiden la adherencia de los patógenos a la mucosa intestinal (Lamm, 1998; Ravdin et al., 2003; Kaur et al., 2004; Bernin et al., 2014). La respuesta inmune celular frente a *E. histolytica* también es de gran importancia, el contacto de la ameba con las células del epitelio intestinal, dando lugar a la producción de citocinas proinflamatorias como IFN- γ , IL-6, IL-1 β y TNF- α (Bansal et al., 2009; Kumar et al., 2011). La presencia de estas citocinas promueve el reclutamiento y activación de células de la respuesta inmune. Los macrófagos y neutrófilos activados a su vez participan en la eliminación del parásito (Lin & Chadee, 1992). Demostrando así, que tanto la respuesta humoral, como la respuesta celular son de gran relevancia frente a la infección amebiana.

Neuroinmunomodulación

Estudios recientes han demostrado que la interacción entre el sistema inmunológico y el sistema nervioso central (SNC) es indispensable en la regulación de la respuesta inflamatoria

frente a patógenos. La activación de regiones específicas del SNC induce la liberación de neurotransmisores, que a su vez activan vías alternas estableciendo conexiones anatómicas entre los sistemas nervioso e inmune, regulando la función de la respuesta inmune a través de neurotransmisores liberados a través de rutas neuronales. Dos de los neurotransmisores considerados inmunomodulares son la adrenalina y acetilcolina (Tanaka et al., 2019; Kerage et al., 2019).

El efecto inmunomodulador de adrenalina

En procesos de estrés, se incrementan considerablemente las concentraciones de adrenalina y noradrenalina, la adrenalina es primordialmente liberada por la médula adrenal (Elenkov et al., 2000). Además, se conoce que los órganos linfoides se encuentran densamente inervados por fibras adrenérgicas, permitiendo así, la interacción del neurotransmisor y el sistema inmune (Downing & Miyan, 2000). Por otro lado, se ha reportado que los linfocitos y macrófagos son capaces de sintetizar y liberar catecolaminas, regulando la actividad de estas células por señalización paracrina (Brown et al., 2003).

Diversos estudios han reportado que la adrenalina posee un efecto inmunomodulador. Se ha demostrado que la administración crónica de catecolaminas disminuye la respuesta inmune celular a través de receptores beta-adrenérgicos, mientras que la liberación aguda tiene un efecto opuesto y se asocia a un incremento de la activación de la respuesta inmune celular a través de receptores alfa-adrenérgicos (Zhou et al., 2014; Oberbeck, 2006). El efecto que puede tener la adrenalina sobre la respuesta inmune frente a *E. histolytica* aún no ha sido estudiado. Evidencias manifiestan que el uso de adrenalina en el tratamiento de enfermedades parasitarias como la malaria puede resultar contraproducente (Pasvol, 2005). Lo que sugiere que la presencia de este neurotransmisor podría determinar la evolución de una enfermedad parasitaria debido a su efecto inmunosupresor.

El efecto inmunomodulador de acetilcolina

Durante los procesos infecciosos el hospedero induce múltiples respuestas para superar la infección y prevenir la diseminación. Un claro ejemplo es que el sistema inmunológico se comunica con el sistema nervioso para amplificar la respuesta inmune local y facilitar la

eliminación del parásito. A través del eje cerebro-intestinal, una red compleja y bidireccional de nervios intrínsecos entre el SNC y el sistema nervioso entérico (SNE), se distribuye a largo del tracto digestivo (de Jonge, 2013; Costa et al., 2000; Furness et al., 2014). El neurotransmisor predominante del sistema nervioso entérico es la acetilcolina, liberada por los nervios parasimpáticos e intrínsecos (Agostoni et al., 1957). Las fibras colinérgicas liberadoras de acetilcolina transportadas en el nervio vago inervan el estómago, el intestino delgado y el colon proximal (Browning & Travagli, 2014; Zheng & Berthoud, 2000). La acetilcolina tiene una función fisiológica relevante en el intestino, regulando la contracción del músculo liso, la dilatación de los vasos sanguíneos, el transporte epitelial, la liberación de hormonas entéricas y la secreción de moco (Keely, 2011; Barry et al., 1995; Specian & Neutra, 1980). Además, informes anteriores indican que la acetilcolina participa en la modulación de la respuesta inmune en el tracto gastrointestinal, en particular, tiene un efecto antiinflamatorio al unirse a la subunidad alfa 7 ($\alpha 7$) del receptor de acetilcolina (Rosas-Ballina et al., 2011), inhibiendo así, la activación de monocitos y macrófagos y reduciendo la producción de citocinas proinflamatorias (Wang et al., 2003).

Se conoce poco sobre la participación de la acetilcolina en la infección por *E. histolytica*. Sin embargo, se ha proporcionado evidencia de que el nervio vago regula la inflamación local durante el desarrollo de un absceso hepático amebiano. De hecho, los hámsteres vagotomizados mostraron un aumento significativo de las citocinas proinflamatorias inducidas principalmente por la degradación del inhibidor de NF- κ B, lo que llevó a la activación de la fosforilación de NF- κ B y STAT3 (Sánchez-Alemán et al., 2015); Van Der Zanden et al., 2009; Yoshikawa et al., 2006). Por lo tanto, la inhibición de la estimulación vagal protege al huésped contra la amiba en las etapas agudas de la enfermedad aumentando la respuesta inflamatoria en el sitio de la infección y apoyando así la eliminación del parásito (Muñoz-Ortega et al., 2011). Por el contrario, la presencia de acetilcolina en el sitio de infección induce una respuesta antiinflamatoria que podría favorecer la evolución de la amebiasis o incluso conducir al desarrollo de una enfermedad

invasiva, debido a que dificulta el aclaramiento del trofozoíto por una respuesta inmunitaria retardada.

Antecedentes

En la patogénesis de la amebiasis, la interacción entre el hospedero y el parásito está determinada por diversas condiciones durante el proceso infectivo, particularmente por características de la amiba necesarias para sobrevivir y adaptarse a diferentes ambientes. En la actualidad se conoce poco de los factores involucrados en la regulación de la virulencia amebiana que determinan la capacidad invasiva, favoreciendo la diseminación de la amiba. Las proteínas G desempeñan una función importante en el reconocimiento de señales extracelulares y que en respuesta a estos estímulos regulan funciones celulares. Evidencias sugieren que algunos de los mecanismos de virulencia de *E. histolytica* como la migración, citotoxicidad y adherencia del trofozoíto, son modulados parcialmente por proteínas G. Mediante estudios de secuenciación se ha demostrado que dentro del genoma de *E. histolytica* se encuentran genes que codifican para las subunidades de proteínas G (Anamika, Bhattacharya, & Srinivasan, 2008), formada por tres subunidades proteína G α , G β y G γ , que se encuentran acopladas a receptores de siete dominios transmembranales, receptores que aún no han sido identificados en este microorganismo (Bosch et al., 2012). La estimulación de estos receptores en células eucariotas resulta en la activación de diversas vías de señalización intracelular incluyendo diferentes efectores como adenilato ciclasa (AC), GTPasas pequeñas y fosfolipasa C, que, a su vez, modulan las concentraciones intracelulares de segundos mensajeros, tal es el caso de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). El sistema adrenérgico es una de las vías clásicas de activación de receptores asociados a proteínas G en células eucariotas que promueve el incremento de AMPc. Los trofozoítos de *E. invadens* (parásito de reptiles que es filogenéticamente cercano a *E. histolytica*), que al ser estimulado con epinefrina exógena aumenta la concentración intracelular de AMPc, adicionalmente se reporta que esta respuesta es dependiente de GTP

demostrando así, que este mecanismo de señalización involucra la participación de la AC (Frederick & Eichinger, 2004). Asimismo, trofozoítos de *E. invadens* en presencia de adrenalina y noradrenalina promueven enquistamiento y se observa que este proceso es dependiente de receptores adrenérgicos β tipo 1 al utilizar agonistas específicos como la dobutamina, mientras que el estímulo con agonistas específicos de receptores α adrenérgicos no muestran incremento en el porcentaje de enquistamiento basal, sumado a esto, se comprobó que los lisados amebianos de *E. histolytica* y *E. invadens* contienen catecolaminas (Coppi, Merali, & Eichinger, 2002). Esta información podría ser indicativo de la presencia de sistemas autocrinos y la importancia de estas moléculas en funciones celulares de *E. histolytica*.

Actualmente, se ha descrito la expresión de proteínas G y de algunos de sus efectores como Ras, Rab y Rho en *E. histolytica*, y se ha reportado que alteraciones en la expresión y función de estas proteínas pueden modificar la virulencia del parásito al modular procesos de adherencia, migración y citotoxicidad. Es importante mencionar que en 1986 se reportó que el aumento de los niveles de acetilcolina en ratas inducido por el tratamiento con fisostigmina (inhibidor reversible de la acetilcolinesterasa) incrementó la severidad de la infección por *E. histolytica* (Kulkarni & Sen, 1986). Este estudio sugiere que la acetilcolina pudo inducir un aumento de la virulencia de este protozoario, aunque no se conocen cuáles son los efectos y mecanismos involucrados en la activación de estos posibles receptores a través de adrenalina y acetilcolina.

De tal manera que, es clave identificar los efectos de estos neurotransmisores sobre las propiedades de virulencia de la amiba y los posibles mecanismos implicados en la patogenicidad que pudieran considerarse como potenciales blancos terapéuticos. En este trabajo se evaluarán mecanismos y efectos asociados a la modulación de la virulencia de trofozoítos de *E. histolytica* a través de adrenalina y acetilcolina.

Hipótesis

La adrenalina y acetilcolina modifican las propiedades de virulencia de *E. histolytica*.



Justificación

La amebiasis se considera como una causa importante de morbilidad y mortalidad en el mundo es la tercera causa por infección parasitaria a nivel mundial.

Se conoce poco sobre los factores que determinan la capacidad invasiva de la amiba en respuesta a estímulos exógenos. La adrenalina y acetilcolina son neurotransmisores del sistema nervioso central y periférico, estas sustancias se encuentran presentes en el tracto digestivo, donde regulan diferencialmente el mantenimiento de la homeostasis del sistema gastrointestinal al participar en la regulación de la absorción intestinal, flujo sanguíneo, motilidad intestinal y la respuesta inmune celular frente al parásito (Beckmann & Lips, 2013; Mittal et al., 2017). Es ahí donde el parásito tiene contacto con estas moléculas, hasta el momento se desconocen los efectos de estos neurotransmisores sobre los mecanismos de virulencia de *E. histolytica* y aún no han sido identificados las posibles proteínas receptoras de adrenalina y acetilcolina ni las vías de señalización involucrados en el reconocimiento de estos neurotransmisores. Por lo tanto, en este estudio se determinó si la adrenalina y acetilcolina modifican las propiedades de virulencia de *E. histolytica* con el propósito de establecer posibles mecanismos de patogenicidad de este parásito.

Objetivo general

Evaluar *in vitro* e *in vivo* los efectos de la adrenalina y acetilcolina sobre las propiedades de virulencia de *E. histolytica*.

Objetivos específicos

1. Identificar posibles mecanismos de interacción de los trofozoítos de *E. histolytica* ante el contacto con adrenalina y acetilcolina.
2. Analizar el efecto de adrenalina y acetilcolina sobre la eritrofagocitosis, modificaciones en el citoesqueleto durante la quimiotaxis y la citotoxicidad de *E. histolytica*.
3. Analizar la expresión génica de factores de patogenicidad, moléculas involucradas en vías de señalización intracelular y relacionadas en el reconocimiento de neurotransmisores en trofozoítos de *E. histolytica* estimulados con adrenalina y acetilcolina.
4. Evaluar los efectos de la virulencia de trofozoítos de *E. histolytica* estimulados con adrenalina y acetilcolina en modelo *in vivo* de absceso hepático amebiano de hámster.

Metodología

Cultivo axénico *Entamoeba histolytica*

Trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM-1:IMSS fueron cultivados en condiciones axénicas a 37°C en medio de cultivo TYI-S-33 (Diamond, 1961), suplementado con vitaminas (Microlab M-2310), antibacterial (Microlab MC-110) y suero bovino adulto inactivado (Microlab SU-120).

Ensayo proliferación y viabilidad

Para determinar el crecimiento y viabilidad de *E. histolytica* en presencia de neurotransmisores, 1×10^5 trofozoítos fueron inoculados en 7 ml de medio TYI-S-33 y fueron tratados con adrenalina y acetilcolina 1×10^{-4} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M durante 24 y 48 horas. El número de parásitos fueron contados cada 24 horas usando el hematocímetro y el colorante de exclusión azul de tripán.

Ensayo de inmunofluorescencia

Para identificar las interacciones de las posibles proteínas receptoras y sus ligandos, 2×10^5 trofozoítos fueron tratados con adrenalina o acetilcolina 1×10^{-6} M y 1×10^{-8} M durante 1 h. Los trofozoítos se lavaron 3 veces con PBS (buffer fosfato salino por sus siglas en inglés, PBS de phosphate buffered saline) y fijados con paraformaldehído (PFA) al 2%. Para bloquear los sitios de uniones inespecíficas a proteínas se utilizó suero bovino fetal (SBF) al 2% y las muestras se incubaron por 1 h. Enseguida se agregaron los anticuerpos anti-acetilcolina IgG acoplado a FITC (LS-C691651 LifeSpan BioSciences, Seattle, WA) y anti-adrenalina acoplado a APC (LS-C739158 LifeSpan BioSciences, Seattle, WA), ambos diluidos 1:1000 en PBS y fueron incubados durante 1 hora. Para una doble inmunodetección, las muestras fueron incubadas por 1 h con α -bungarotoxina o anti-L220 seguido de un anticuerpo secundarios anti-ratón-IgG (H+L) conjugado con Alexa Fluor 594 (1:1000; A-11005, Invitrogen, Eugene, Oregon, E.U.A.) o Alexa Fluor 388 (1:1000; A-10680, Invitrogen, Eugene, Oregon, E.U.A.). Luego los trofozoítos fueron lavados 3 veces con PBS y para la tinción de ADN se añadió Hoechst (1 μ g/mL; Invitrogen, Ciudad de México, México) y se incubó por 15 minutos.

Finalmente, las muestras fueron montadas en Mowiol (Sigma, St Louis, USA) y examinadas en el microscopio invertido Confocal LaserScanning (CLSM, LSM 700, Carl Zeiss, Jena, Alemania). El análisis de imágenes para determinar la colocalización entre acetilcolina y L220 se realizó mediante el software ImageJ (Wayne Rasband, Nat. Inst. Of Health, E.U.A.). El grado de colocalización de los canales rojo y verde se determinó a través de los coeficientes de Manders y Pearsons, considerando como significativos los valores de R superiores a 0.6 valores de umbral.

Ensayo de eritrofagocitosis

En una placa de 24 pocillos, 5×10^4 trofozoítos de *E. histolytica* previamente estimulados con acetilcolina y adrenalina (1×10^{-6} y 1×10^{-8} M) durante 10 y 20 minutos, posteriormente, los trofozoítos fueron incubados con 2.5×10^6 eritrocitos previamente teñidos con ficoeritrina (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker MiniKit for General Cell Membrane Labeling) durante 10 y 20 minutos a 37 °C, después, estas células se lavaron con PBS y se fijaron con PFA (Paraformaldehído) al 2%, luego, mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss AxiosKop 40 con cámara acoplada y programa Image Pro-Plus), se tomaron imágenes y se tomaron en cuenta 100 trofozoítos por condición y contaron los eritrocitos fagocitados por estos. Adicionalmente, se realizó una cuantificación indirecta de eritrofagocitosis por medio de un método espectrofotométrico, como se describe a continuación: 2×10^5 trofozoítos tratados con acetilcolina (1×10^{-6} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M) durante 60 minutos, fueron lavados con PBS, para después ser incubados con 2×10^7 eritrocitos durante 20 minutos a 37 °C. Luego se agregó 1 mL de H₂O destilada para lisar eritrocitos no fagocitados, posteriormente las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 700 x g. Los pellets fueron resuspendidos en 1mL de ácido acético (CH₃COOH) al 2% para eliminar el remanente de eritrocitos, las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 700 x g. Se agregó 1 mL de ácido fórmico (CH₂O₂), provocando la lisis de los trofozoítos. Después se cuantificó la hemoglobina por espectrofotometría a una longitud de onda de 405 nm.

Ensayo de citotoxicidad en monocapa de células Hep G2

2x10⁵ células Hep G2 (Human hepatocellular carcinoma) fueron sembradas en placas de 24 pocillos, una vez que llegaron a un 90% de confluencia, se adicionaron los sobrenadantes o 2x10⁴ trofozoítos de *E. histolytica* tratados durante 60 minutos con adrenalina y acetilcolina (1x10⁻⁴ M, 1x10⁻⁶ M, 1x10⁻⁸ M, 1x10⁻¹⁰ M, 1x10⁻¹² M) y E-64 (inhibidor de proteasas de cisteína). La interacción entre células y trofozoítos fue de 2 horas a 37 °C. Los pocillos se lavaron con PBS y se fijaron con PFA al 2%. Las células se tiñeron con 0.1 % de azul de metileno en buffer de boratos 10 mM por 15 minutos y fueron lavadas 3 veces con buffer de boratos. Después de esto se agregó HCl 0.1 M y se incubó durante 30 minutos. Seguimiento del análisis por triplicado de cada condición en el espectrofotómetro a 655 nm (iMark Microplate Reader, Bio-Rad). Se utilizó la siguiente ecuación para calcular el porcentaje de destrucción de la monocapa para cada condición.

$$\% \text{ destrucción de la monocapa} = \left(\frac{DO \text{ control(monocapa)} - DO \text{ muestra (condición)}}{DO \text{ control (monocapa)}} \right) (100)$$

Ensayo de modificación del citoesqueleto

En una placa de 24 pocillos se colocaron 5x10⁴ trofozoítos en medio TYI-S-33 por pocillo en un cubreobjetos de vidrio y se incubaron durante 20 minutos a 37°C. Luego, las amibas fueron tratadas con adrenalina y acetilcolina 1x10⁻⁴ M por 20 minutos y los controles negativos se trataron con 0.7 μM de citocalasina D (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) (inhibidor de la polimerización y de la elongación de actina) durante 20 minutos. Las células se lavaron con PBS, se fijaron con PFA al 2% y se permeabilizaron con Tritón X 100 en PBS al 0.2%. Los trofozoítos se tiñeron con anticuerpo anti-β-actina (1: 1000; ab8227, Abcam, Cambridge, Reino Unido), se incubaron durante 1 h, luego se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con Alexa Fluor 488 (H + L) (1: 1000; A-11008, Invitrogen, Eugene, Oregón, E.U.A.). Después de esto, las células se tiñeron con 6.6 μM de rodamina-phalloidina (Molecular probes, Oregon, E.U.A.), equivalente a 1 IU/mL y fueron incubadas durante 30 minutos, finalmente se lavaron en PBS. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio con medio de montaje Mowiol (Sigma, St Louis, E.U.A.). Estas muestras se examinaron por microscopía (Microscopio de Fluorescencia Axioskop 40,

ZEISS). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las estructuras de actina fibrilar (F-actina) y actina globular (G-actina) se realizó con el software ImageJ (Wayne Rasband, Nat. Inst. Of Health, E.U.A.). Las imágenes se convirtieron a una escala de grises de 8 bits y se midió la intensidad de fluorescencia media y se expresó como el valor medio de grises, que se define como el valor medio de grises para todos los píxeles dentro del área indicada.

Extracción de ARN

Para el análisis de expresión de genes de factores de virulencia de *Entamoeba histolytica*, se llevó a cabo la extracción total de ARN de trofozoítos estimulados con adrenalina y acetilcolina a una concentración 1×10^{-4} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M a 60 minutos utilizando el RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA), siguiendo las indicaciones del proveedor. A 1×10^6 trofozoítos se le agregaron 350 μ l de TRI-Reagent (Sigma-Aldrich, UK), se homogenizaron en vórtex durante 2 minutos. Luego se centrifugaron durante 10 minutos a 14000 rpm a 4° C. Se agregaron 350 μ l de etanol al 100% y mezclaron en vórtex durante 30 segundos. Se transfirieron los 700 μ l de la muestra a la columna RNeasy para enseguida centrifugar a 8000 rpm durante 30 segundos. Luego se descartó el sobrenadante y se añadieron 700 μ l de Buffer RW1 a la columna RNeasy, después se centrifugaron 30 segundos a 8000 rpm, nuevamente se eliminó el sobrenadante y se agregaron 500 μ l de Buffer RPE a la columna RNeasy y centrifugaron 30 segundos a 8000 rpm, se repitió una vez más este lavado, aunque en esa última ocasión la centrifugación fue durante 2 minutos a 8000 rpm. Enseguida se transfirió la columna RNeasy a un tubo colector y se depositaron en la columna 30 μ l de agua libre de RNAsas y se centrifugó durante 2 minutos a 8000 rpm para la elución de ARN. Se cuantificó y evaluó la pureza del ARN obtenido en el BioDrop μ LITE (Isogen Life Science), en un rango de 260-280 nm. El índice de pureza de las muestras de RNA fue de 1.8 a 2.0. Luego fue almacenado a -80 °C hasta su uso. Finalmente, para evaluar la integridad de las muestras se corrieron en geles de agarosa al 1% en buffer de boratos EDTA (TBE) 1X. Para cargar las muestras se mezcló 1 μ l del buffer de carga (5 \times Green Go Taq Flexi Buffer (Promega, USA) y 4 μ l de la muestra fueron depositados en los carriles del gel además, se usaron 0.3 μ g/ μ l del marcador del peso molecular Gene Ruler 1Kb DNA ladder

(Thermo Scientific, USA). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 45 minutos luego para teñir el gel se utilizó una solución de bromuro de etidio a una concentración de 5 µg/ml por 10 minutos, las bandas de ARN se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

Amplificación mediante RT-PCR

A partir de las muestras previamente obtenidas se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario utilizando el kit Reverse Transcription System (Promega, USA), se realizó la transcripción inversa a partir de 1µg de ARN total en un volumen de reacción de 10 µl, a lo que se le agregó 2 µl de buffer 5x para la RetroTranscriptasa, 1.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 0.5 µl 0.5mM de la mezcla de dNTP, 0.25 µl de RNasin (inhibidor de ribonucleasa) 10 U, 0.5µl de Retrotranscriptasa. La mezcla de reacción se incubó durante 5 minutos a 25°C para alineación 60 minutos a 42 °C en un termociclador con un ciclo final de 70 °C durante 15 minutos.

PCR punto final

La expresión génica de proteasa de cisteína-2 (CP-2), proteasa de cisteína-5 (CP-5), la subunidad pesada (170 kDa) de la Lectina Gal/GalNAc (L170), ameboporos y actina en trofozoítos sin tratamiento y estimulados con adrenalina y acetilcolina fue evaluada por qRT-PCR utilizando los oligonucleótidos enlistados en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para qPCR.

Gen	Secuencia		Tamaño del amplicon
	5'	3'	
Proteasa de cisteína 2	Fwd: TGGACCATTGCTGCTATGA Rev: TAACATGATCCGCATTGTGC		177 pb
Proteasa de cisteína 5	Fwd: AATTCATGGGGAAGTATTGG Rev: CATCAGCAACCCCAACTGG		112 pb
Amebaporo	Fwd: TCCTCTGCAACCTTGCCT Rev: GCACAAATAGCATTGGCATCA		208 pb
Lectina 170 kDa	Fwd: TGACCTTGGTATTATGTCTCG Rev: GTCTCCATGGTTGCATAGC		104 pb
Tubulina	Fwd: TGCACCAATTGTTACACCAGA Rev: CATGGACACCATCCAACAAA		117 pb

Para determinar las condiciones óptimas de la reacción se llevó a cabo una PCR de punto final, para la estandarización de cada condición, se llevó a cabo la amplificación en el termociclador Genius (Techne Incorporated, Burlington NJ, EU) a un volumen final de 10 µl que contenga 1 µg de cDNA, 1µl oligo reverse (10 µM), 1 µl oligo forward (10 µM), 2 µl PCR Master Mix, 2X (Promega, USA) y 5 µl de agua libre de nucleasas. El programa utilizado para la reacción se muestra en el siguiente esquema:

PASO	60	TIEMPO
1	95	5 min
2	95	45 seg
3	55	45 seg
4	72	12 seg
2,3,4	40 ciclos	
5	72	3 min
6	4	99 h

PCR tiempo real (qPCR)

La evaluación de la expresión génica relativa de L170, CP-2, CP-5, amebaporo, peroxiredoxina y COX-1 se realizó por PCR tiempo real. Los niveles de expresión relativa fueron normalizados con α -tubulina como control endógeno. Se llevó a cabo en el equipo StepOne (Applied Biosystems, USA) y utilizó Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Thermo scientific, Pittsburgh, PA), siguiendo la programación:

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
1	50	2 min
2	95	5 min
3	95	30 seg
4	55	30 seg
3,4	40 ciclos	
5	95	15 seg
6	60	1 min
7	95	15 seg

Las diferencias fueron determinadas al emplear el método relativo de $\Delta\Delta Ct$.

Western blot

Para la extracción de proteína, los trofozoítos estimulados durante 1 h con acetilcolina 1×10^{-6} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M y después lavados con PBS, fueron lisados con buffer RIPA (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, E.U.A.) e inhibidores de proteasas (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 5 mM N-etilmaleimida, 3 mM Yodoacetamida, 1 mM Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, and 3 mM N-alfa-Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona Cetona Clorhidrato) durante 30 minutos a 4 °C. La cuantificación de proteína se realizó por el método de Bradford. 50 μ g del extracto de proteína fue separado en un gel SDS-PAGE al 10%. Luego las proteínas fueron transferidas a una membrana Fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 12 mA, durante la noche a 4 °C. Las membranas fueron bloqueadas con Tris-buffer salino (TBS) y leche al 5% durante 1 h a temperatura ambiente. Para la inmunodetección, las membranas fueron incubadas por 24 h a 4 °C con el anticuerpo primario anti- β -actin (1:1,000; ab8227, Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-L220 y anti- α -tubulina como

control de referencia (1:2,000; T6074, Sigma, E.U.A). Posteriormente los blots fueron incubados por 2 h con el anticuerpo correspondiente anti-ratón IgG-HRP (1: 2000; AP127P, Chemicon, E.U.A.) o anti-conejo IgG-HRP (1: 2000; A0545, Sigma, E.U.A.). Después de la incubación, las membranas se lavaron con TBST (Tris buffer salino-Tween 20 al 0.05%) y fueron revelados con sustrato Clarity Western ECL (Bio-Rad, Hercules CA, E.U.A.).

Actividad de proteasas de cisteína

La evaluación de la actividad de las proteasas de cisteína en extractos totales amebianos tratados con E-64 (inhibidor de proteasas de cisteína) y acetilcolina 1×10^{-6} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M. 100 μ g del extracto en conjunto con 2 mg de colágeno dye-impregnated (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, E.U.A.) resuspendidos en 500 μ L de buffer de activación de proteasas (Tris 100 mM pH 7.0 y CaCl_2 10 mM), se incubaron a 37 °C durante 18 h. Después, esta reacción se detuvo añadiendo 500 μ l de TCA al 10%. Las muestras fueron centrifugadas y se descartaron las fibras de colágeno y se colectaron los sobrenadantes para la determinación espectrofotométrica a 540 nm.

Ensayo de migración Transwell

Para evaluar el efecto de acetilcolina y adrenalina sobre la migración de *E. histolytica*, 5×10^4 trofozoítos fueron depositados en el compartimento superior de la cámara de transwell (Costar, Cambridge, Massachusetts, E.U.A.). Se generaron gradientes colocando en el compartimento inferior de la cámara de transwell, 600 μ L de cultivo medio sin suplementar que contenía acetilcolina y adrenalina acetilcolina 1×10^{-6} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M, interferón gamma (IFN- γ), 20% de suero bovino de adulto o interleucina-8 (IL-8). Para inhibir la quimiotaxis, los trofozoítos fueron tratados con CD. La placa de 24 pocillos se mantuvo a una atmósfera de 0.05% de CO_2 a 37°C por 2 h. Las células que migraron al compartimento inferior de la cámara y se fijaron con PFA al 4%, posteriormente se tiñeron con 1 μ g / mL de Hoechst 33342 durante 20 min. Se determinó la migración de trofozoítos contando el número de trofozoítos que se adhirieron al fondo del pozo con un microscopio Carl Zeiss Axiovert 40CFL. Las imágenes se procesaron con el software AxioVision 40V 4.6.3.0 (Göttingen, Alemania).

Se realizó un ensayo de gradiente de quimiotaxis para evaluar trofozoítos migratorios individuales, se inyectaron 50 μ l de acetilcolina 1×10^{-8} M, 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M en un gel de agarosa al 0.75%, se colocaron trofozoítos alrededor de los geles de agarosa con acetilcolina impregnados y luego se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. La quimiotaxis de trofozoítos hacia acetilcolina se visualizó usando microscopía de video de contraste de fase. Los registros de video se realizaron con un microscopio invertido Carl Zeiss Axiovert 40CFL.

Absceso hepático amebiano experimental

Para inducir el absceso hepático amebiano (AHA), 20 hámsteres dorados machos (*Mesocricetus auratus*) fueron agrupados en normal, sham, *E. histolytica* y *E. histolytica* + acetilcolina (5 por cada grupo). Los hígados fueron inoculados con 5×10^5 trofozoítos que se habían incubado con adrenalina y acetilcolina 0,0001 μ M durante 1 h. Después de la incubación, los trofozoítos se lavaron con PBS, se suspendieron en 100 μ l de medio de cultivo y se inyectaron en el lóbulo hepático. Los hámsteres del grupo control tratados de forma simulada se les inyectó solo medio de cultivo. Los animales se sacrificaron después de 4 días mediante anestesia con pentobarbital sódico (50 mg / kg, i.p.). Se diseccionaron las muestras de tejido hepático y se fijaron en PFA al 4% en PBS, se incluyeron en parafina y se procesaron mediante técnicas histológicas convencionales para obtener cortes de tejido. Posteriormente, las muestras se desparafinaron y rehidrataron con PBS. Los portaobjetos de tejido hepático se tiñeron con hematoxilina y eosina para la identificación de células inflamatorias infiltradas y la cuantificación del área de daño tisular.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, California, EE. UU.). Para determinar la normalidad de los datos se realizó la prueba de Shapiro Wilk. Las diferencias entre dos grupos se analizaron con una prueba T de Student o la prueba U de Mann Whitney según la distribución de los datos. El análisis de varianza se realizó con la prueba de Kruskal Wallis y la prueba posterior Dunn o con la prueba ANOVA y prueba posterior de Bonferroni de dos vías, según la distribución de los datos, se consideró significativo un valor de $p < 0,05$ (*).

Resultados

Viabilidad y cinética de crecimiento

El efecto de adrenalina y acetilcolina sobre la proliferación y la viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica* fue evaluado con respecto a trofozoítos no estimulados. Se observó que a las 24 horas el tratamiento de adrenalina 1×10^{-6} M logra disminuir significativamente la proliferación de *E. histolytica* en comparación con el control y adrenalina 1×10^{-4} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M. De manera contraria, a las 48 horas el tratamiento con adrenalina invariablemente de la concentración se redujo significativamente la proliferación celular con respecto a los trofozoítos sin estimular (Fig. 1A). Además, el ensayo demostró que la viabilidad celular no se vio afectada con adrenalina al comparar con el control (Fig. 1B). En el caso de acetilcolina, se mostró que la viabilidad celular a las 48 horas después del estímulo con adrenalina 1×10^{-6} M y 1×10^{-8} M se encontró aumentada con respecto a la viabilidad que presentó el estímulo de 24 horas y los trofozoítos sin tratar (Fig. 2B). El efecto de acetilcolina sobre la proliferación celular a las 24 horas de tratamiento se disminuyó significativamente a la concentración de 1×10^{-4} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-8} M y 1×10^{-12} M cuando se comparó con trofozoítos sin estimular. Se observó un efecto opuesto a las 48 horas pues se incrementó la proliferación a una concentración de 1×10^{-6} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M con respecto al control (Fig. 2A).

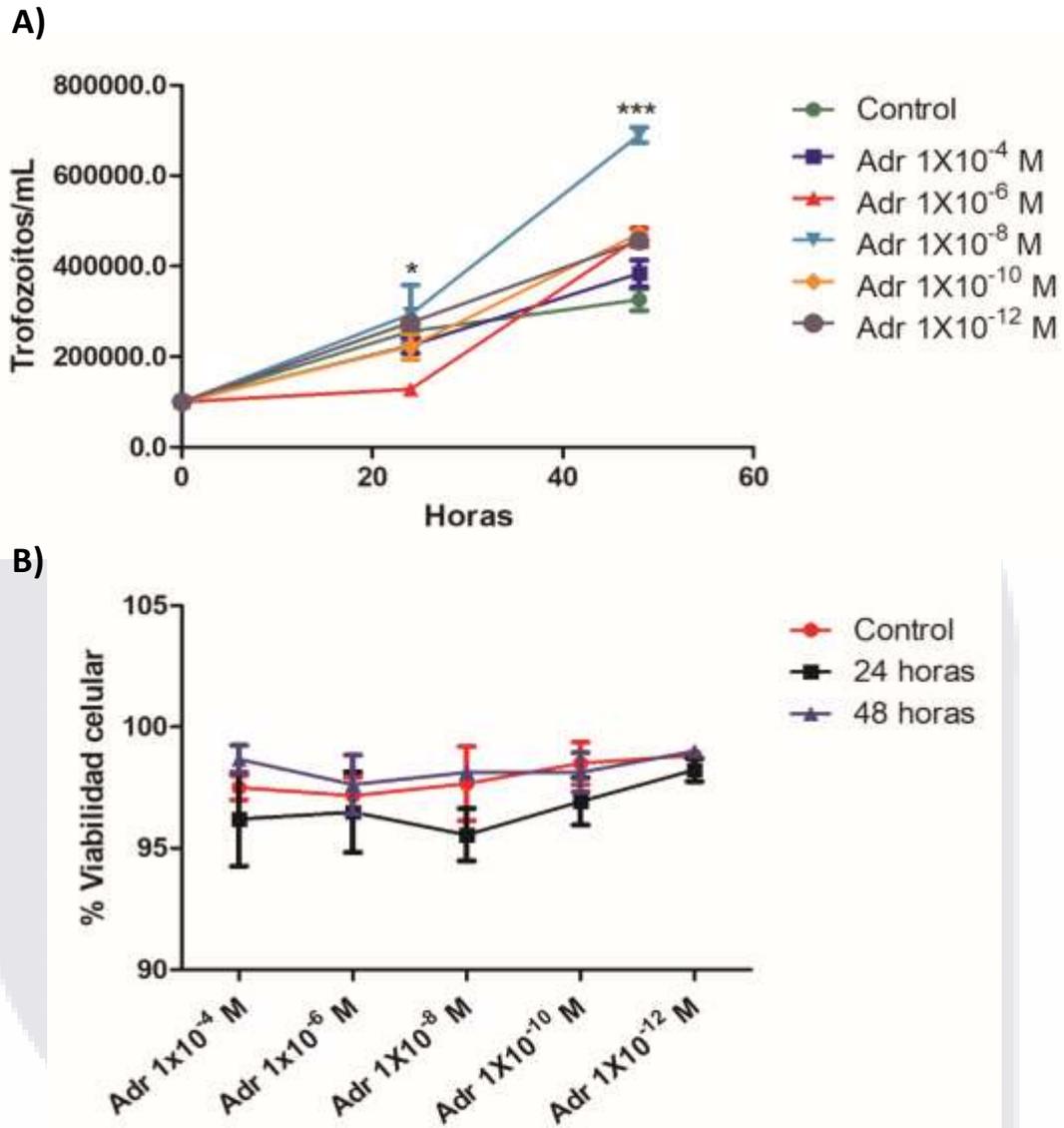


Figura 1. Viabilidad y proliferación de trofozoítos de *E. histolytica* tratados con adrenalina. Las células fueron contadas a las 24 y 48 horas. Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes ($n = 3$). El análisis estadístico se realizó con la prueba de ANOVA de una vía y Tukey post test, donde los valores de * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ fueron considerados significativos.

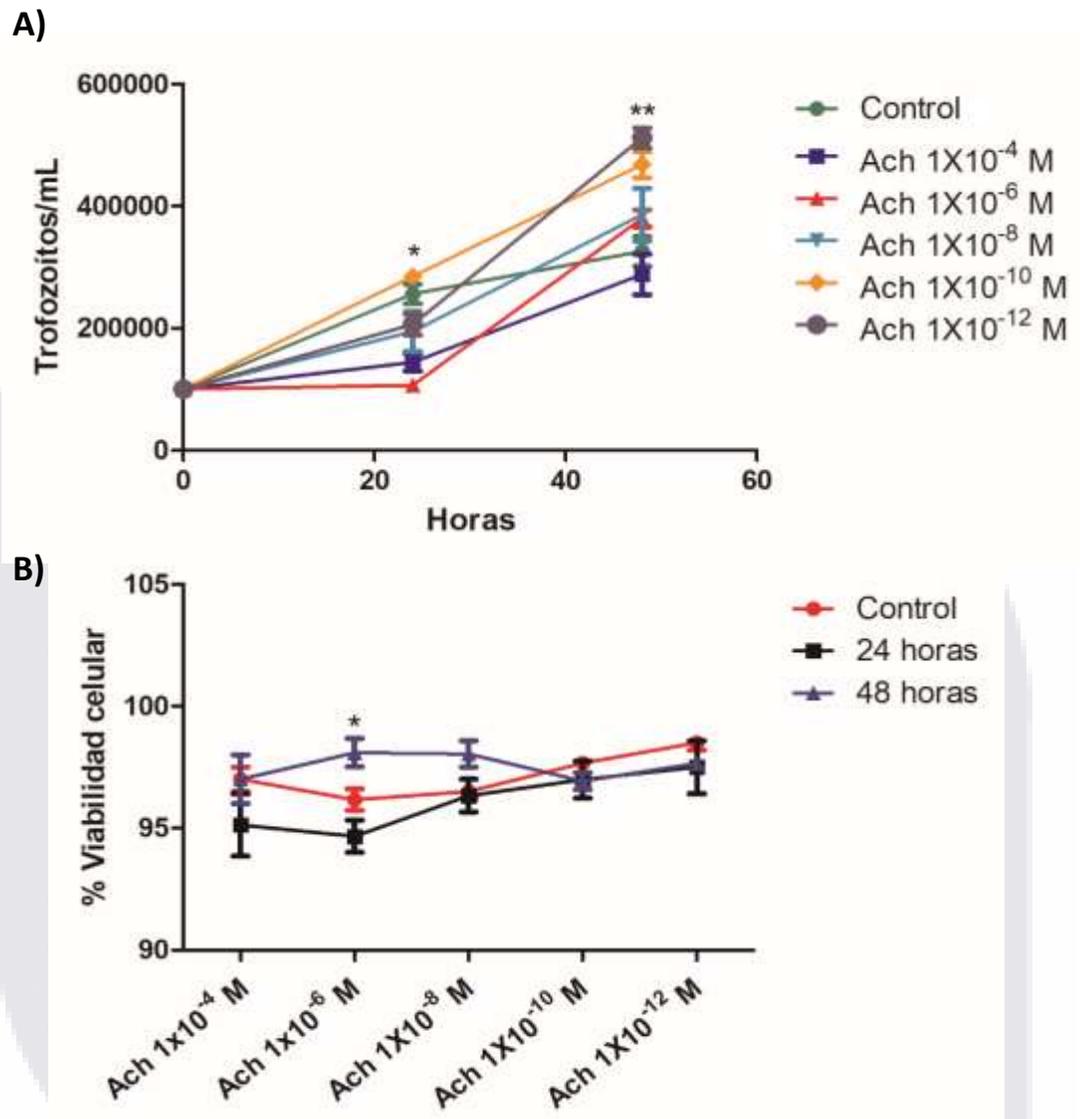


Figura 2. Viabilidad y proliferación de trofozoítos de *E. histolytica* tratados con acetilcolina. Las células fueron contadas a las 24 y 48 horas. Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes (n = 3). El análisis estadístico se realizó con la prueba de ANOVA de una vía y Tukey posttest, donde los valores de * p <0.05 y ** p <0.01 fueron considerados f.

Identificación y localización celular de proteínas fijadoras de adrenalina y acetilcolina en trofozoítos de *E. histolytica*

A través de microscopia confocal se logró detectar la capacidad de la amiba para fijar adrenalina y acetilcolina en la membrana de los trofozoítos previamente tratados con estos neurotransmisores. La localización celular de este tipo de proteínas receptoras podría denotar la importancia de estas moléculas en el reconocimiento de este tipo de ligandos.

Se detectó la unión de adrenalina y acetilcolina en la membrana del parásito (Fig. 3). Para confirmar la ubicación de adrenalina y acetilcolina en la superficie de las membranas de los trofozoítos, utilizamos un anticuerpo contra la lectina de 220 kDa de *E. histolytica* (L220), una proteína de membrana con propiedades de lectina, implicada en la adherencia a tejidos a través de su unión a componentes de la matriz extracelular (Fig.4A and 4B). El análisis de imágenes mostró superposiciones falsas entre píxeles rojos y verdes. Estos resultados demostraron que la amiba une tanto adrenalina como acetilcolina, y que esta interacción tiene lugar en la membrana del trofozoíto. Pero el coeficiente de correlación de Pearson y Mander demostró una baja coincidencia de píxeles, por lo tanto, esta asociación no se considera una verdadera interacción entre L220 y los neurotransmisores (Fig. 4). Con el fin de identificar el tipo de receptores implicados en la unión de acetilcolina, se aplicó α -bungarotoxina-Alexa Flour 647, una neurotoxina que inhibe específicamente los receptores nicotínicos; no pudimos detectar ninguna señal de Alexa Flour 647 (Fig. 4C). En este sentido, identificamos una asociación entre la acetilcolina y adrenalina a la membrana de trofozoítos de *E. histolytica*, pero desconocemos el tipo de interacción o moléculas implicadas en esta unión. Basándonos en estos resultados, nos centramos en el efecto de los neurotransmisores sobre los factores patogénicos inducibles de *E. histolytica*.

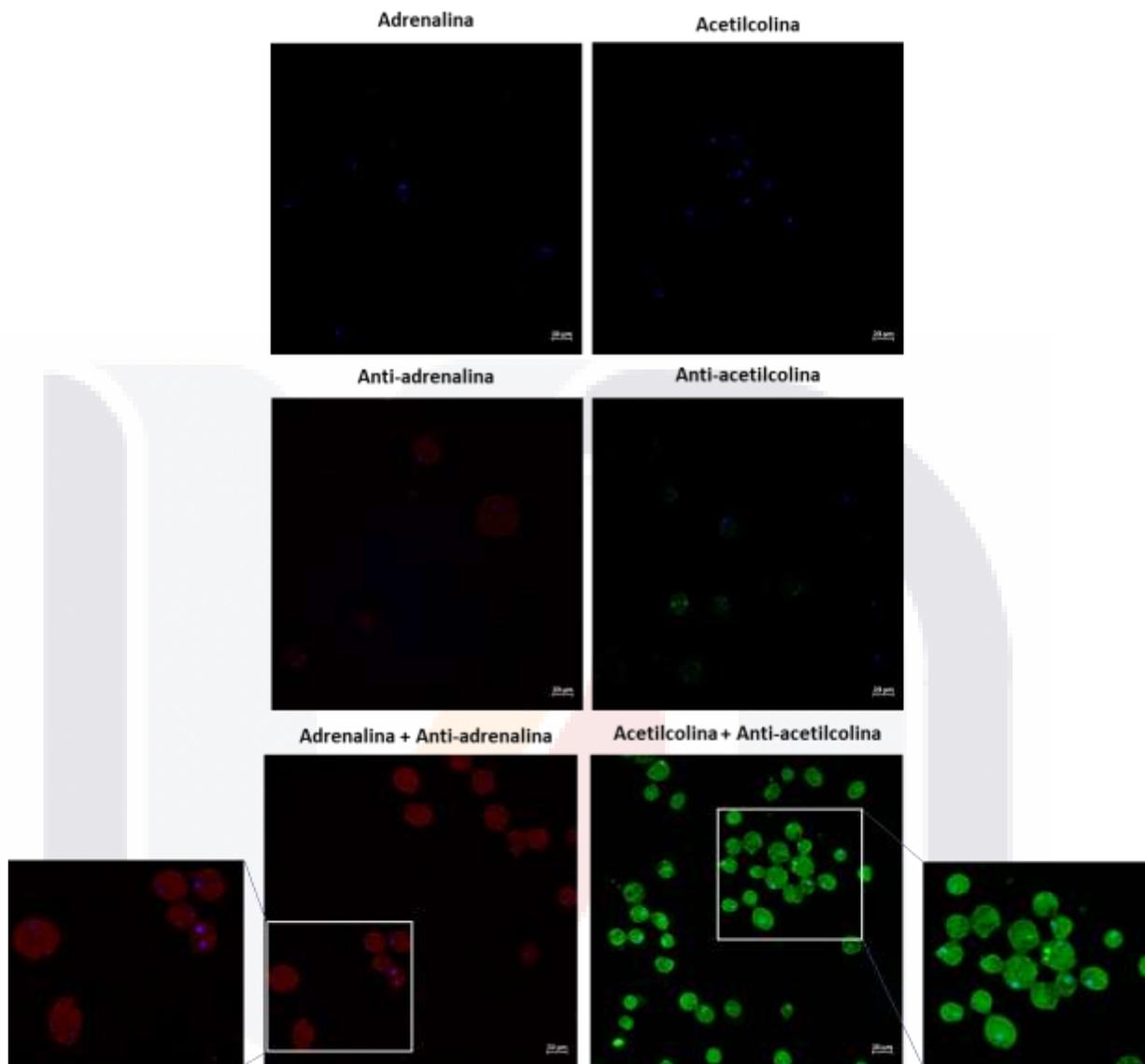


Figura 3. Localización celular de proteínas receptoras de adrenalina y acetilcolina en trofozoítos de *E. histolytica*. Micrografía confocal de trofozoítos de *E. histolytica* tratadas con adrenalina y acetilcolina, para detectar la fijación de estos neurotransmisores en la membrana de los trofozoítos se utilizaron anticuerpos anti-acetilcolina-FITC (verde), anti-adrenalina-APC (rojo) y el núcleo marcado con Hoechst (azul). Se muestran imágenes representativas del análisis por microscopía confocal a 40x (zoom de 230%).

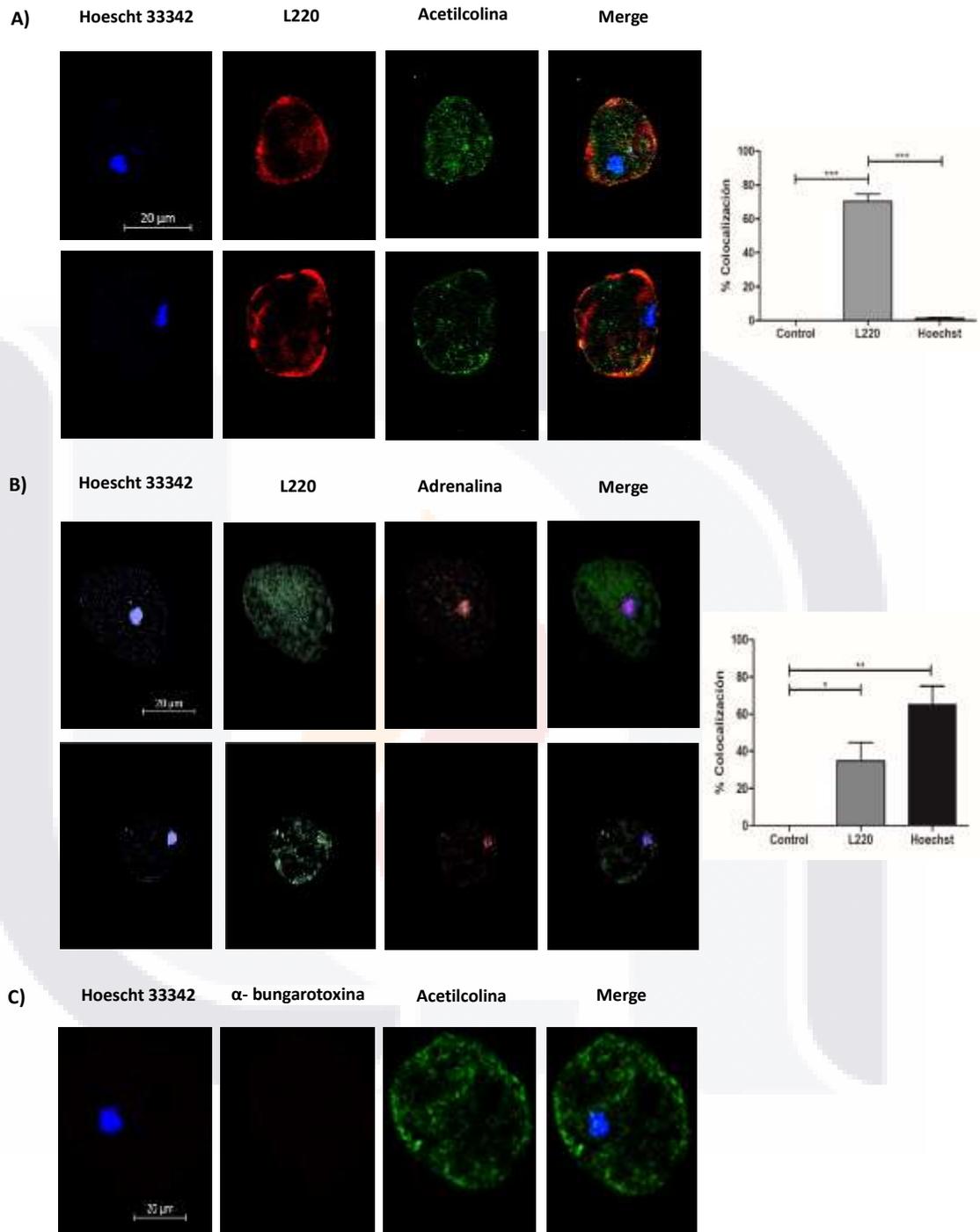


Figura 4. Unión de acetilcolina y adrenalina en la membrana de *E. histolytica*. A) Trofozoítos tratados con acetilcolina $1 \times 10^{-8} M$ durante 1 h. Ubicación celular de acetilcolina en trofozoítos de *E. histolytica* mediante el uso de anticuerpo anti-acetilcolina-FITC (verde) (dilución 1: 800) y un anticuerpo anti-L220 (rojo) (1: 500 dilución). B) Trofozoítos tratados con adrenalina $1 \times 10^{-8} M$ durante 1 h. Ubicación celular de adrenalina en trofozoítos de *E. histolytica* mediante el uso de anticuerpo anti-adrenalina-APC (rojo) (dilución 1: 800) y un anticuerpo anti-L220 (verde) (1: 500 dilución). C) Detección α -bungarotoxina-Alexa Fluor 647 (1: 100). Imágenes representativas del análisis de microscopía confocal en X63. Los datos corresponden a la media \pm

SEM de cinco experimentos independientes (n = 5). El análisis estadístico se realizó con el ANOVA de una vía y el método posttest de Tukey, donde se consideraron significativos los valores * p <0.05 y ** p <0.01.

Expresión de la subunidad pesada (170 kDa) de la Lectina Gal/GalNAc, amebaporos, CP-2 y CP-5

La expresión de genes de patogenicidad en trofozoítos estimulados con adrenalina y acetilcolina a diferentes concentraciones y tiempos fue comparada con trofozoítos sin tratamiento, lo cual se muestra en las figuras 5, 6 y 7. El tratamiento de trofozoítos con adrenalina y acetilcolina 1×10^{-4} M durante 60 minutos al igual que el tratamiento con acetilcolina 1×10^{-8} M aumentó significativamente la expresión de la subunidad pesada (170 kDa) de la Lectina Gal/Gal NAc con respecto a aquellos trofozoítos que no fueron tratados (Fig. 5). En el caso de la expresión de proteasas de cisteína 2 (CP-2) y proteasa de cisteína 5 (CP-5) se aumentó significativamente al estimular a los trofozoítos con adrenalina 1×10^{-10} M, en cambio, cuando los trofozoítos fueron tratados con adrenalina 1×10^{-6} M, se disminuyó la expresión con respecto a la expresión de estas proteasas en aquellos trofozoítos no estimulados (Fig. 6A y 6C). El tratamiento con acetilcolina 1×10^{-4} M aumentó significativamente la expresión de CP-5 (Fig. 6B). De igual manera se reguló positivamente la expresión de CP-5 con el tratamiento de adrenalina 1×10^{-4} M, contrariamente, el estímulo con acetilcolina 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M se observó una disminución significativa en la expresión de CP-2 a los 60 minutos (Fig. 6D). Al estimular los trofozoítos de *E. histolytica* con ambos neurotransmisores por 60 minutos a las concentraciones 1×10^{-4} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M, se incrementó de manera significativa la expresión amebaporos al comparar con el grupo control (Fig. 7).

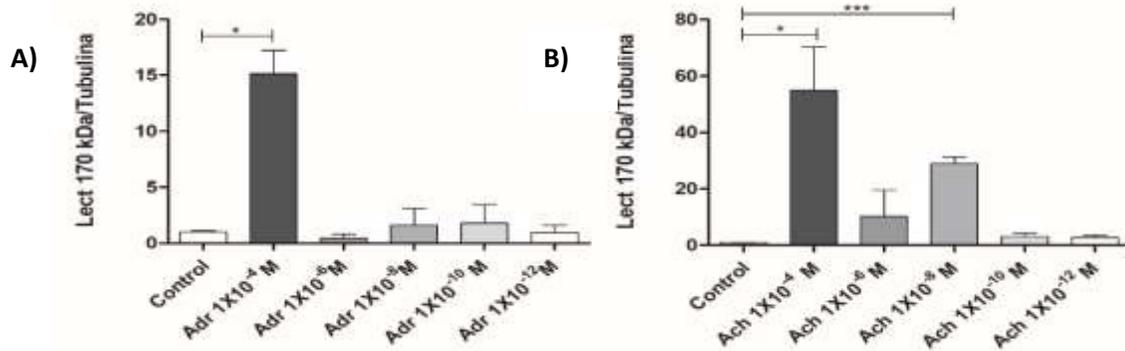


Figura 5. Expresión de factores de virulencia de *E. histolytica*. Análisis cuantitativo de la expresión relativa de la subunidad pesada (170 kDa) de la Lectina Gal/GalNAc en trofozoítos de *E. histolytica*. Amplificación por qRT-PCR de ARN aislado de trofozoítos tratados con adrenalina (Adr) y acetilcolina (Ach) a concentraciones 1x10⁻⁴ M, 1x10⁻⁶ M, 1x10⁻⁸ M, 1x10⁻¹⁰ M y 1x10⁻¹² M durante 60 minutos. Los niveles de expresión relativa fueron normalizados con respecto al gen constitutivo actina. Las diferencias fueron determinadas implementando el método relativo $\Delta\Delta Ct$. Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes (n=3). El análisis estadístico se realizó con la prueba de ANOVA de una vía y Tukey posttest, donde los valores de * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001 fueron considerados significativos.

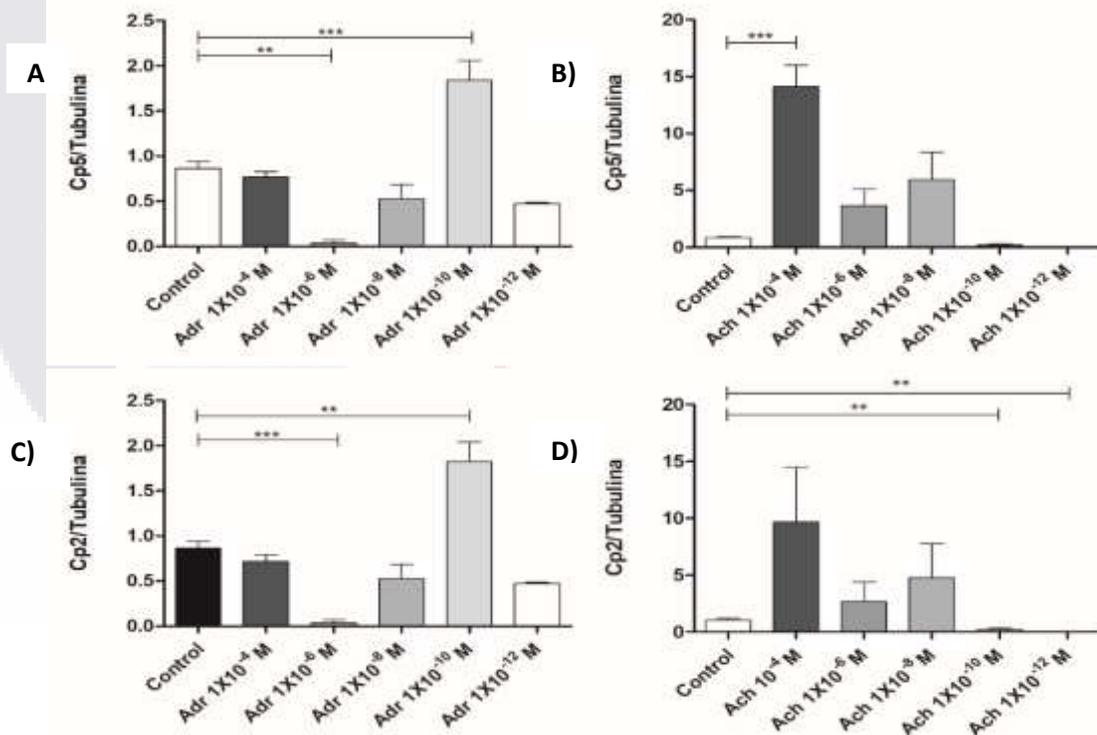


Figura 6. Expresión de factores de virulencia de *E. histolytica*. análisis cuantitativo de la expresión relativa de CP-2 y CP-5 en trofozoítos de *E. histolytica*. Amplificación por qRT-PCR de ARN aislado de trofozoítos tratados con adrenalina (Adr) y acetilcolina (Ach) a concentraciones 1x10⁻⁴ M, 1x10⁻⁶ M, 1x10⁻⁸ M, 1x10⁻¹⁰ M y 1x10⁻¹² M durante 60 minutos. Los niveles de expresión relativa fueron normalizados con respecto al gen constitutivo actina. Las diferencias fueron determinadas implementando el método relativo $\Delta\Delta Ct$. Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes (n=3). El análisis estadístico se realizó con la prueba

de ANOVA de una vía y Tukey posttest, donde los valores de ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ fueron considerados significativos.

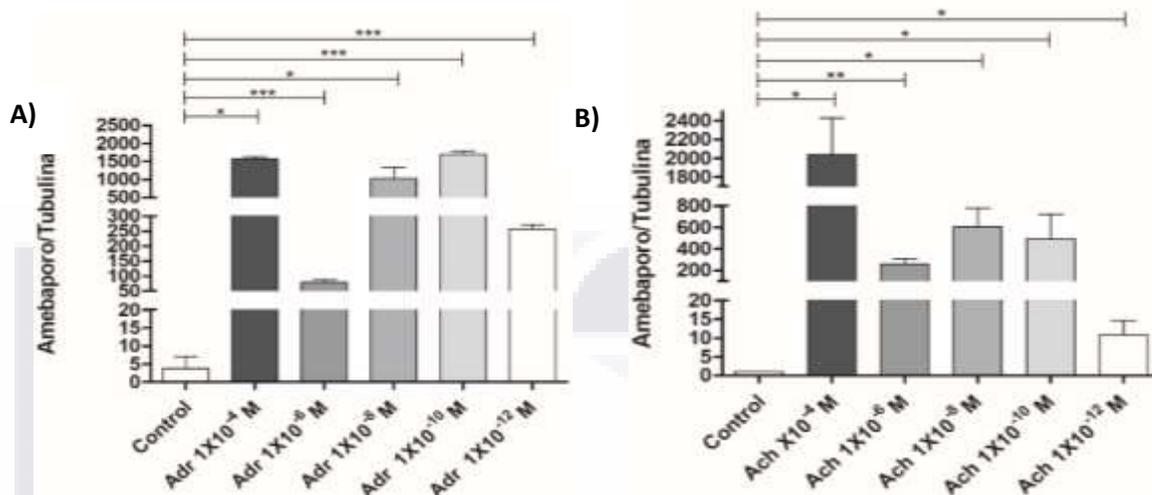


Figura 7. Expresión de factores de virulencia de *E. histolytica*. análisis cuantitativo de la expresión relativa del gen de amebaporos en trofozoítos de *E. histolytica*. Amplificación por qRT-PCR de ARN aislado de trofozoítos tratados con adrenalina (Adr) y acetilcolina (Ach) a concentraciones 1×10^{-4} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M durante 60 minutos. Los niveles de expresión relativa del ARNm fueron normalizados con respecto al gen constitutivo actina. Las diferencias fueron determinadas implementando el método relativo $\Delta\Delta Ct$. Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes ($n=3$). El análisis estadístico se realizó con la prueba de ANOVA de una vía y Tukey posttest, donde los valores de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ fueron considerados significativos.

Expresión de L220 y β -actina

Las características distintivas de virulencia de *E. histolytica* incluyen adhesión, fagocitosis y secreción de factores solubles, siendo L220, el reordenamiento del citoesqueleto y la actividad CP indicadores representativos de patogenicidad, respectivamente. Teniendo esto en cuenta, evaluamos la expresión de proteínas de L220 y β -actina en trofozoítos estimulados con acetilcolina (Fig. 8A). Nuestros resultados demostraron que la acetilcolina 1×10^{-8} M indujo un aumento significativo de la expresión de L220 (Fig. 8B). Esto podría estar indicando que la acetilcolina favoreció la adhesión de los trofozoítos resultando en un mayor efecto citopático. Muchos procesos biológicos de *E. histolytica* dependen del citoesqueleto de actina, incluida la motilidad, la fagocitosis y la secreción. En consecuencia, se analizaron los cambios en el contenido de actina en trofozoíto bajo la presencia de acetilcolina. La expresión de β -actina aumentó a concentraciones de acetilcolina de 1×10^{-6}

M y 1×10^{-8} M después de 1 h de tratamiento (Fig. 8C), lo que sugiere que este neurotransmisor podría estar participando en un mecanismo de reordenamiento del citoesqueleto que aún no se ha dilucidado bajo estimulación con acetilcolina.

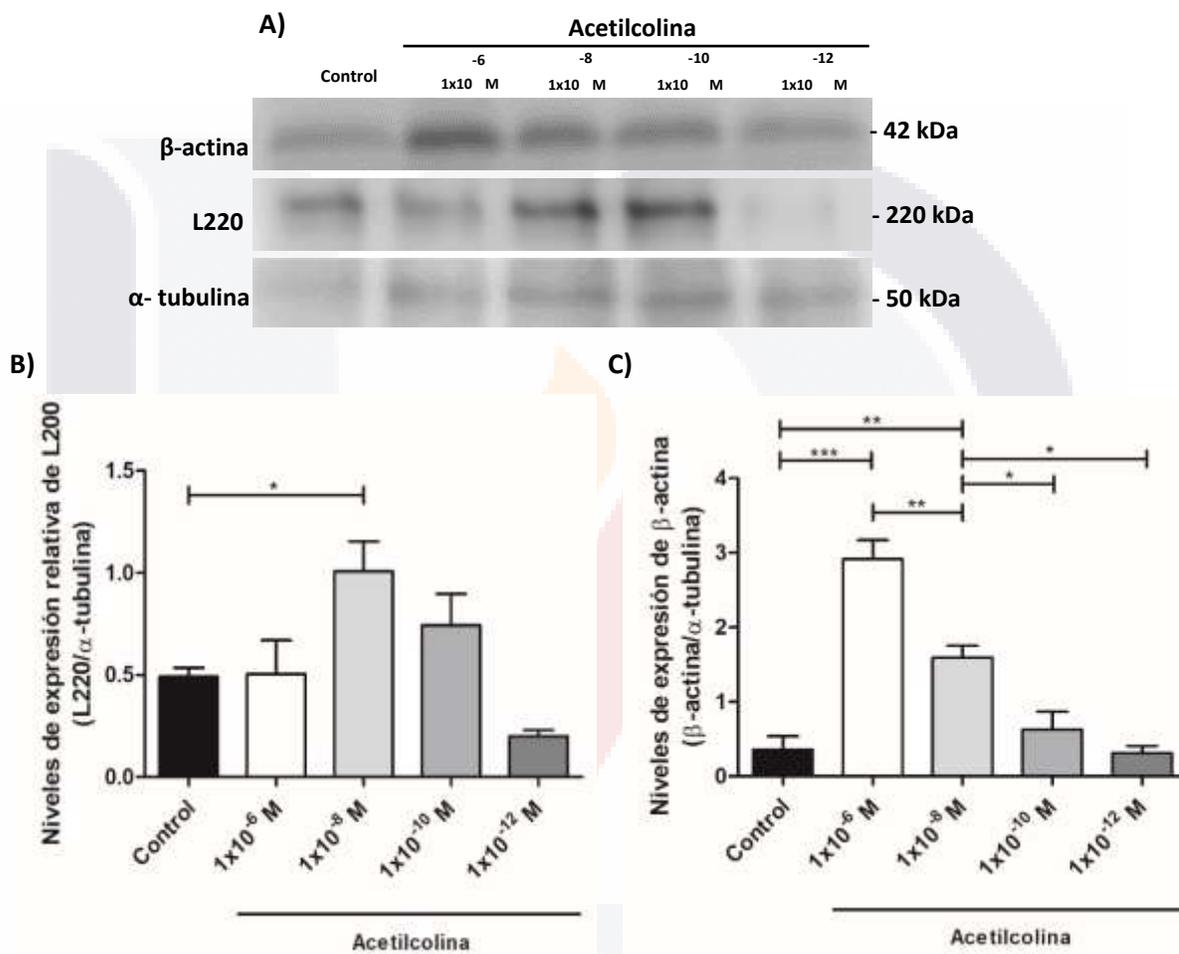


Figura 8. Expresión de β -actina y L220 analizada por western blot. A) Inmunodetección a partir de lisados totales de trofozoítos tratados con diferentes concentraciones de acetilcolina durante 1 h, utilizando anticuerpos anti- β -actina, anti-L220 y anti- α -tubulina en ensayos de Western blot. B) Análisis densimétrico L220 y C) β -actina utilizando el software ImageJ. Los niveles de proteína se normalizaron a α -tubulina. Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes (n = 3). El análisis estadístico se realizó con el ANOVA de una vía y el método posttest de Tukey o Dunnett, donde se consideraron significativos los valores * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001.

Distribución de actina polimerizada

La actina es un componente fundamental del citoesqueleto, esta proteína forma microfilamentos los cuales son esenciales en la mayoría de los eventos motiles de las células eucariotas. En el caso de *E. histolytica*, su citoesqueleto se compone de actina, este microorganismo expresa una única isoforma de esta proteína. Siendo primordial la reorganización dinámica del citoesqueleto para un gran número de funciones celulares esencialmente en aquellos considerados como mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica*. La distribución de actina en el citoplasma amebiano permite la formación de estructuras indispensables para la motilidad y división del parásito. Además, se conoce de su participación en procesos de citólisis y fagocitosis de células del hospedero. Para determinar la distribución de F-actina y la presencia de estructuras ricas en actina se utilizó rodamina-faloidina para detectar microfilamentos de F-actina en trofozoítos de *E. histolytica* tratados con adrenalina y acetilcolina 1×10^{-6} M durante 30 minutos. Se identificaron diferencias en las estructuras presentes en trofozoítos tratados con adrenalina y acetilcolina en comparación con los grupos control. Se reconocieron protrusiones pseudopoidales, regiones de citoesqueleto corticales alrededor de la membrana, focos de adhesión, pequeños puntos citoplasmáticos y estructuras vesiculares multiformes las cuales se asemejan a vesículas endocíticas a través de las cuales las células internalizan fluidos.

En trofozoítos tratados con adrenalina y acetilcolina se observó un aumento marcado en la presencia de macropinosomas y vacuolas. Aunque en menor proporción, también se encontraron más protrusiones pseudopoidales, sobre todo, en aquellos trofozoítos tratados con adrenalina (flechas blancas) en comparación con los grupos controles, tal y como se demuestra en la Figura 9.

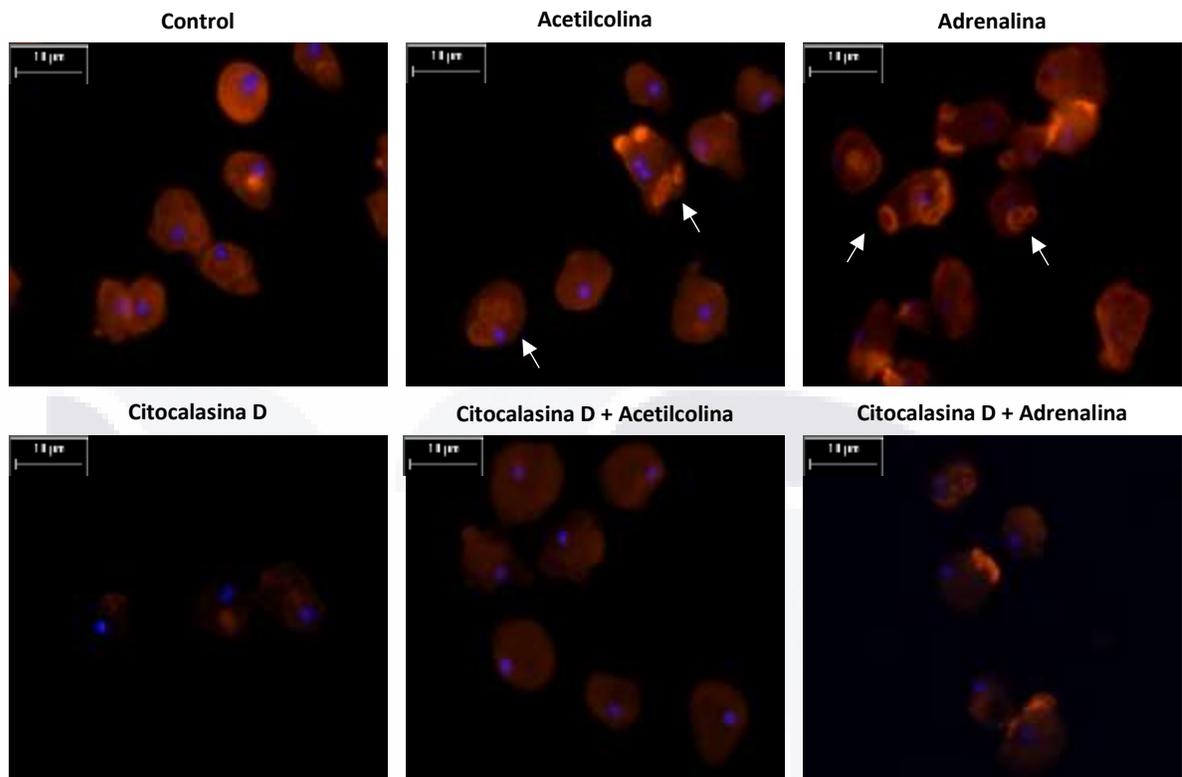


Figura 9. Identificación de estructuras ricas en F-actina en trofozoítos de *E. histolytica*. Detección y análisis de distribución de F-actina marcada con rodamina-faloidina (rojo) y para teñir el ADN nuclear se utilizó Hoechst 33342 (azul) en trofozoítos tratados con adrenalina y acetilcolina 1×10^{-4} M durante 20 minutos. Trofozoítos fueron tratados con Citocalasina D, por su efecto en la motilidad de células eucariotas, al inhibir la polimerización de actina. F-actina está presente en estructuras como macropinosomas, citoesqueleto cortical, vacuolas y placas de adhesión. Se muestran imágenes representativas del análisis por microscopía de fluorescencia a 40x.

Cuantificación estructuras ricas en actina

Para evaluar los cambios y la distribución del citoesqueleto amebiano en trofozoítos de *E. histolytica* después del tratamiento con acetilcolina 1×10^{-6} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M, se analizó la presencia de G-actina y F-actina en trofozoítos estimulados con acetilcolina mediante microscopía confocal. El reordenamiento del citoesqueleto ocurre principalmente a través de la polimerización de actina, formando diferentes estructuras ricas en actina. En este estudio, se identificó la actina monomérica o globular (G-actina) usando un anticuerpo anti- β -actina y la actina polimerizada o fibrilar (F-actina) usando rodamina-faloidina. Los

trofozoítos en medio sin suplementar mostraron un estado basal, donde se observaron estructuras como macropinosomas, placas de adhesión y algunos puntos de F-actina. Las células preincubadas con 1×10^{-6} M de acetilcolina, presentaron mayor cantidad de G-actina en estructuras parecidas a placas de adhesión y menor presencia de F-actina distribuida a lo largo del citoplasma, en comparación con los trofozoítos no tratados. En el caso de un estímulo acetilcolina de 1×10^{-8} M, los trofozoítos mostraron señales predominantes de F-actina concentradas en estructuras periféricas como placas de adhesión, y una disminución significativa de G-actina con respecto al control. En trofozoítos tratados con acetilcolina 1×10^{-10} M, se encontró una baja ocupación de G-actina y una presencia importante de F-actina en estructuras macropinosómicas. Cuando los trofozoítos se incubaron con acetilcolina 1×10^{-12} M, mostraron un aumento tanto de G-actina como de F-actina. La F-actina en forma de placas de adhesión, los puntos de F-actina y los macropinosomas aumentaron en todas las concentraciones de acetilcolina y su presencia disminuyó significativamente cuando los trofozoítos se preincubaron con CD (Fig. 10). La G-actina y la F-actina se cuantificaron determinando la intensidad media de fluorescencia (IMF). La comparación de la presencia de G-actina y F-actina se representa en la Fig. 11A. El análisis estadístico demostró que acetilcolina 1×10^{-6} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-10} M aumentó significativamente la polimerización de actina con respecto al control (Fig. 11B). Es notable que la acetilcolina 1×10^{-6} M aumentó significativamente la G-actina en comparación con el control. Contrariamente a esto, la acetilcolina 1×10^{-8} M redujo significativamente la G-actina, en contraste con los trofozoítos no tratados (Figura 11C).

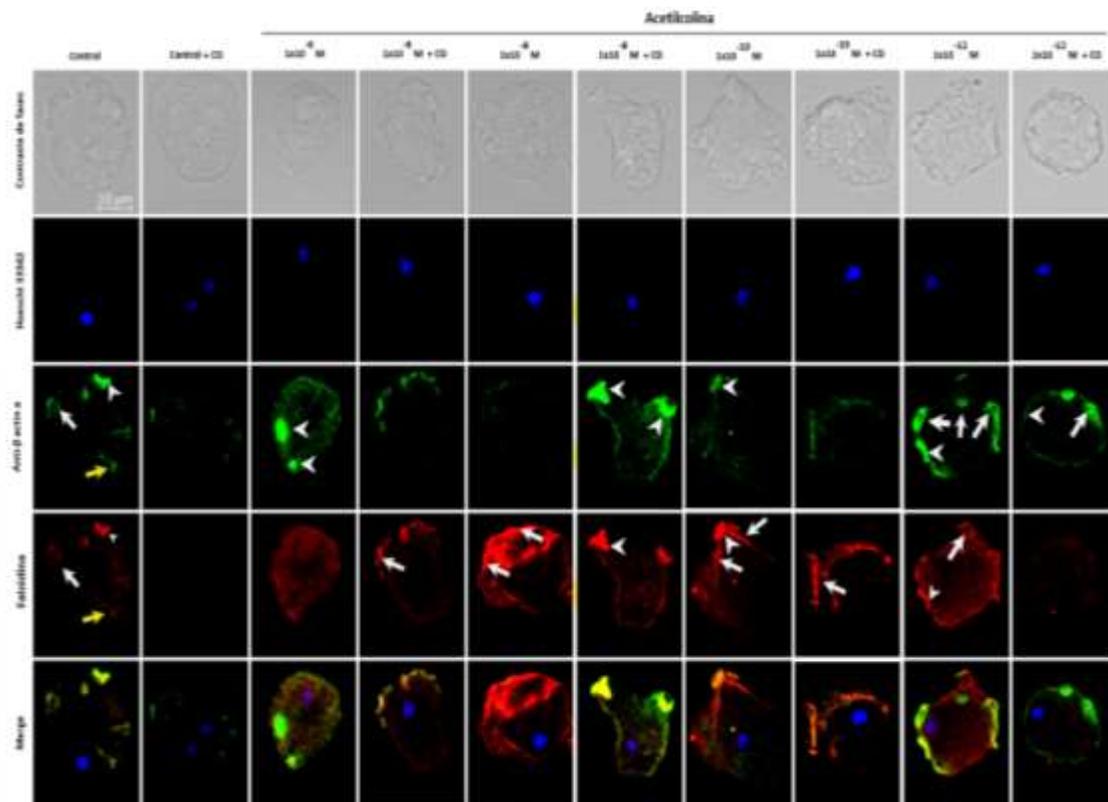


Figura 10. Detección y localización de G-actina y F-actina en trofozoítos tratados con acetilcolina. La G-actina se determinó usando el anticuerpo de conejo anti-β-actina, seguida de anticuerpo Alexa Fluor 488 conjugado de cabra anti-IgG de conejo (1: 1000) (verde); La F-actina se determinó con rodamina-faloidina (rojo); y la tinción del ADN nuclear se realizó mediante Hoechst 33342 (azul). Se utilizó citocalasina D (CD) como control negativo. Imágenes representativas adquiridas por microscopía confocal en X63 muestran estructuras ricas en F-actina como macropinosomas (flechas blancas), placas de adhesión (puntas de flecha blancas) y puntos citoplásmicos de F-actina (flechas amarillas).

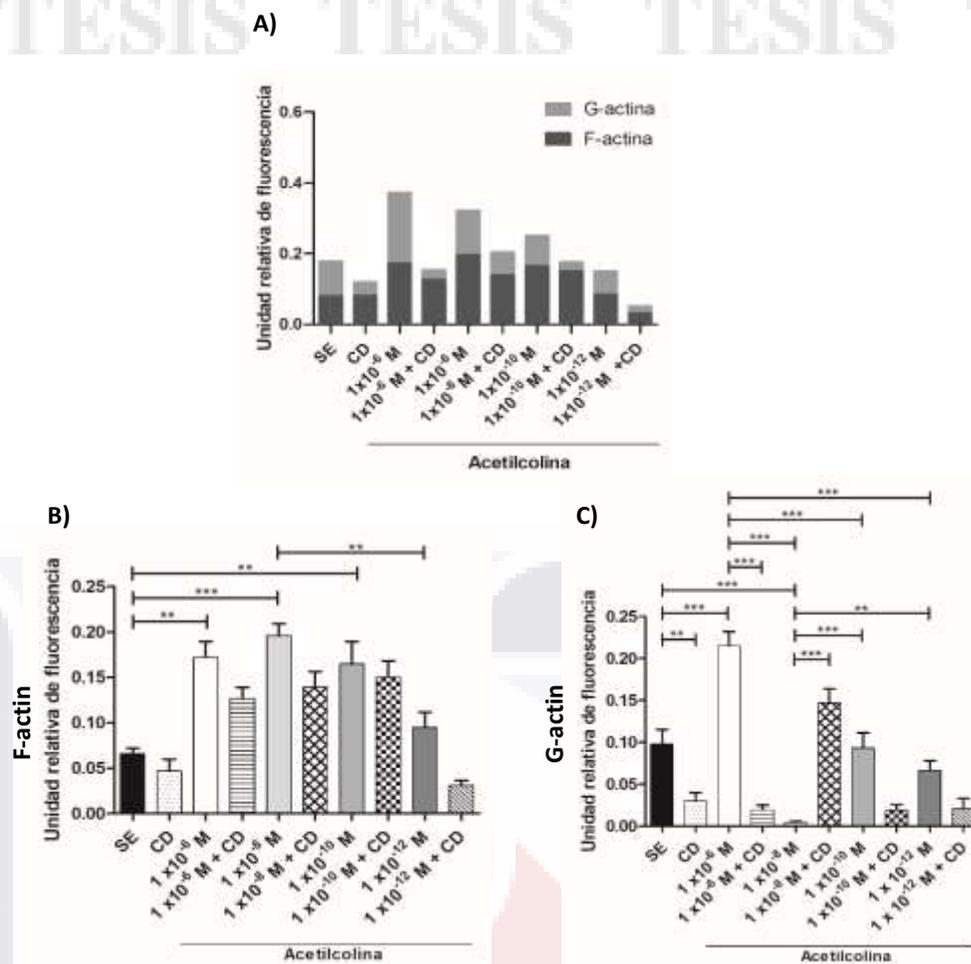


Figura 11. Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia de actina F y G. El análisis de la intensidad de la fluorescencia se realizó midiendo el valor medio de grises con el software ImageJ. A) Determinación combinada de actina F y G en trofozoítos tratados con acetilcolina. Determinación de IMF para B) F-actina y C) G-actina. Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes (n = 3). El análisis estadístico se realizó con el método posttest de Kruskal Wallis y Dunn, donde se consideraron significativos los valores de ** p < 0.01 y *** p < 0.001.

Ensayo de citotoxicidad de la monocapa

Un evento esencial en la patogenicidad del microorganismo es la capacidad de invadir tejidos y causar citólisis. Para determinar la actividad citopática de *E. histolytica* se realizó el ensayo de su capacidad citotóxica sobre la monocapa de células HepG2, en donde, se incrementó significativamente el porcentaje de destrucción de la monocapa en aquellos trofozoítos que fueron tratados con acetilcolina a concentraciones 1x10⁻⁴ M, 1x10⁻⁶ M, 1x10⁻⁸ M, 1x10⁻¹⁰ M y 1x10⁻¹² M durante 60 minutos (Fig. 12A). Al estimular los trofozoítos de *E. histolytica* con adrenalina acetilcolina a concentraciones 1x10⁻⁴ M, 1x10⁻⁶ M y 1x10⁻⁸ M, 1x10⁻¹⁰ M durante 60 minutos (Fig. 12B) se observó un incremento del efecto citopático. Demostrando que la actividad citopática es mayor en trofozoítos estimulados con

adrenalina y acetilcolina al comparar con el porcentaje de destrucción basal. Aunque se desconocen los mecanismos involucrados en este fenómeno, uno de los eventos que podría estar favoreciendo un incremento directo sobre la citotoxicidad de la amiba es que el tratamiento con adrenalina y acetilcolina inducen un incremento importante en la expresión de amebaporos, moléculas que son secretadas por los trofozoítos de *E. histolytica* y que se insertan en la membrana de las células del hospedero generando una lisis osmótica, de tal manera, que se evaluó el daño que han generado los sobrenadantes de los trofozoítos estimulados con adrenalina y acetilcolina, donde se observó una tendencia en el daño que generan estos en el porcentaje de destrucción de la monocapa con respecto al daño que generan los sobrenadante de los trofozoítos sin tratamiento (Fig. 13). Además, hemos determinado que el efecto citopático no se incrementó con el tratamiento de los trofozoítos con L-tirosina 60 minutos a concentraciones 1×10^{-4} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M (Fig. 12C).

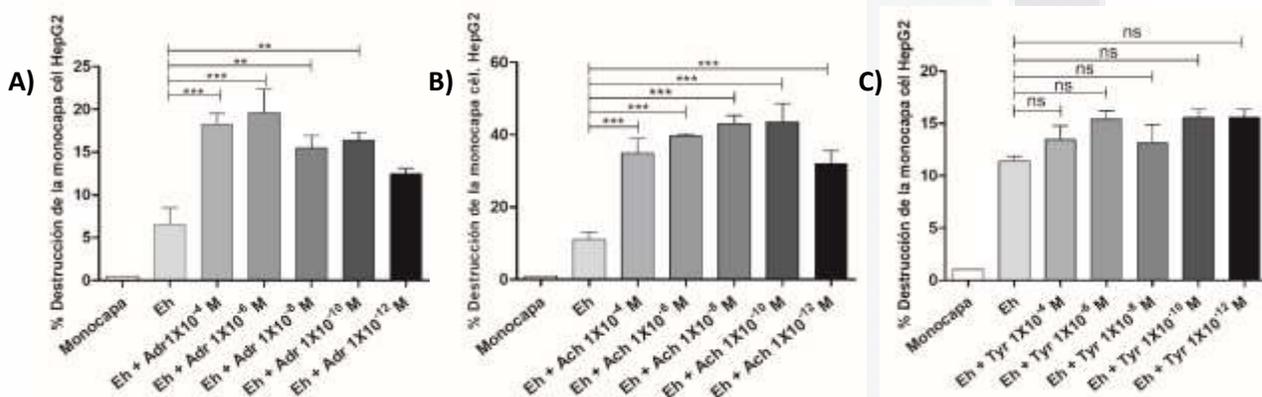


Figura 12. Actividad citopática de *E. histolytica*. Porcentaje de destrucción de la monocapa de células HepG2. Se incrementó significativamente la capacidad citotóxica de los trofozoítos de *E. histolytica* después de ser estimulados con a) adrenalina y b) acetilcolina a diferentes concentraciones durante 60 minutos, c) L-tirosina no tiene efecto sobre la citotoxicidad de *E. histolytica*. Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes (n=3). El análisis estadístico se realizó con la prueba de Kruskal Wallis y Dunn posttest, donde los valores de ** p < 0.01 y *** p < 0.001 fueron considerados significativos.

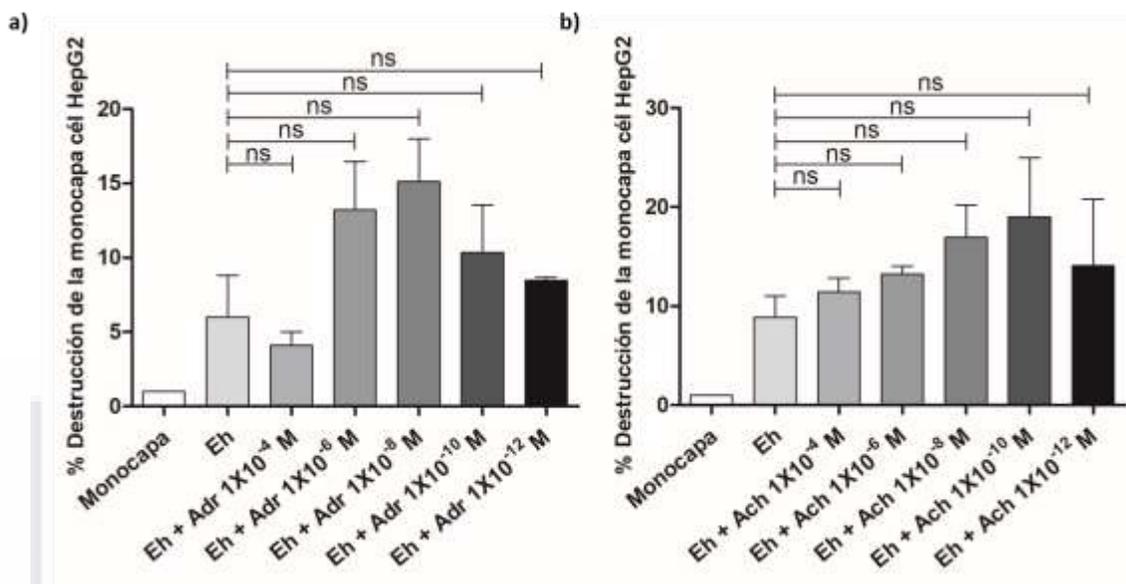


Figura 13. Actividad citotóxica de *E. histolytica*. Porcentaje de destrucción de la monocapa de células HepG2. Se incrementó significativamente la capacidad citotóxica de los sobrenadantes de trofozoítos de *E. histolytica* después de ser estimulados con a) adrenalina y b) acetilcolina a diferentes concentraciones durante 60 minutos. Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes ($n=2$). El análisis estadístico se realizó con la prueba de Kruskal Wallis y Dunn posttest, donde los valores de * $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

Actividad de proteasas de cisteína

Los trofozoítos fueron tratados con acetilcolina y E-64 (inhibidor de la cisteína proteasa), se observó una destrucción de la monocapa dependiente de la concentración inversa, los trofozoítos de *E. histolytica* fueron estimulados con acetilcolina 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M y E-64, el porcentaje de destrucción de la monocapa fue significativamente aumentado en comparación con los controles (Fig. 14A). Algo similar se puede observar en la destrucción de monocapa por sobrenadantes de trofozoítos pretratados con acetilcolina y E-64, donde el efecto citotóxico independiente de CP tiende a aumentar cuando los trofozoítos se estimularon con acetilcolina 1×10^{-8} M (Fig. 14B). Otro mecanismo importante en el efecto citotóxico de *E. histolytica* es la secreción de factores solubles como CP y amebaporos, mediante un ensayo espectrofotométrico se detecta que la actividad de CP de trofozoítos tratados con acetilcolina es mayor en aquellos trofozoítos estimulados con acetilcolina 1×10^{-6} M, 1×10^{-8} , 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M en comparación con el control (Fig. 14C). Estos datos demostraron que la acetilcolina puede modular diferentes procesos celulares dependientes de actina en trofozoítos de *E. histolytica* que puede incluir la secreción de las CP. En el

presente trabajo se demostró un claro incremento del efecto citopático (dependiente del contacto) y citotóxico (independiente del contacto) de los trofozoítos de *E. histolytica* cuando se expone a acetilcolina. El mecanismo por el cual *E. histolytica* destruye las células diana incluye varios procesos como adhesión, muerte celular y fagocitosis. Por tanto, es importante dilucidar si la acetilcolina promueve la capacidad fagocítica de la amiba.

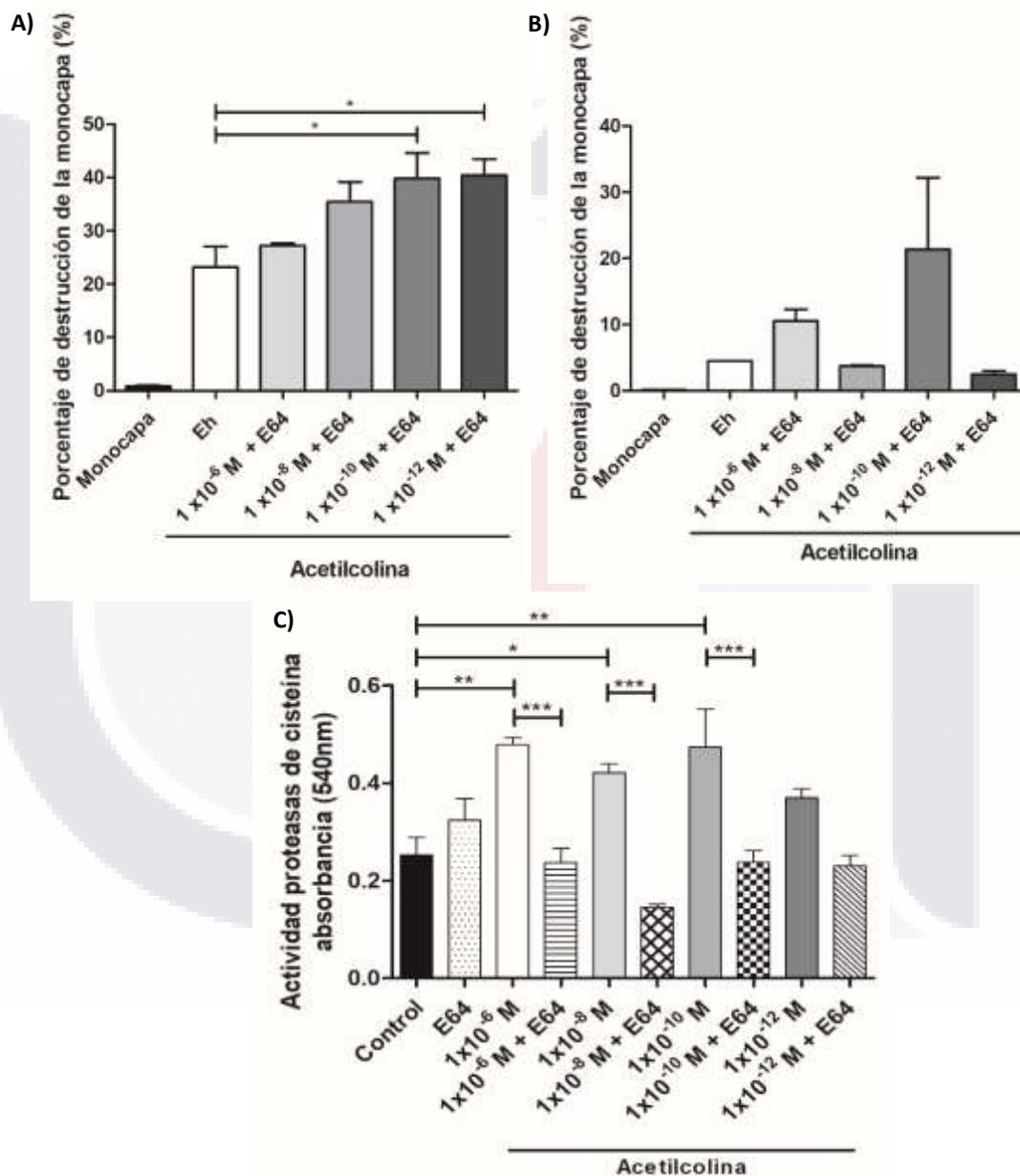


Figura 14. Efectos citopáticos y citotóxicos de los trofozoítos de *E. histolytica* mediados por acetilcolina. A) Células HepG2 en interacción con trofozoítos pretratados con E-64 y diferentes concentraciones de acetilcolina durante 1 h. B) Células HepG2 incubadas con sobrenadantes de trofozoítos de *E. histolytica* pretratados con acetilcolina y E-64 durante 1 h. C) Actividad de cisteína proteasa intracelular evaluada

mediante un ensayo espectrofotométrico de azo-colágeno. Extractos totales de trofozoítos estimulados con acetilcolina en presencia o ausencia de E-64 (un inhibidor de cisteína proteasa). Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes (n = 3). El análisis estadístico se realizó con el método posttest de Kruskal Wallis y Dunn, donde los valores de * p <0.05, ** p <0.01 y *** p <0.001 se consideraron significativos.

Eritrofagocitosis

El proceso de fagocitosis es esencial para la supervivencia y patogenicidad de *E. histolytica*, mismo proceso que es dependiente de la adherencia del trofozoíto a células blanco y principalmente dirigido a células que han sufrido muerte celular, eritrocitos y bacterias. La capacidad de este parásito para establecer una enfermedad invasiva ha sido asociada al proceso de eritrofagocitosis, considerado uno de los criterios más importantes para la identificación de cepas de *E. histolytica* virulentas. Con el objetivo de evaluar el efecto de la acetilcolina y adrenalina sobre las propiedades de virulencia de *E. histolytica*, donde se muestra un incremento significativo en el número de eritrocitos fagocitados por trofozoítos que fueron estimulados con adrenalina y acetilcolina durante 10 y 20 minutos al comparar con el grupo control de trofozoítos sin tratamiento. Se observó un aumento significativo en el número de eritrocitos fagocitados por trofozoíto cuando los trofozoítos fueron tratados con adrenalina, posteriormente se interaccionaron con eritrocitos durante 10 y 20 minutos (Fig. 15A) con respecto a los controles. De igual manera los trofozoítos tratados con acetilcolina demostraron que su capacidad fagocítica se encuentra incrementada a los 10 y 20 minutos de estar en contacto con eritrocitos con respecto a los trofozoítos sin tratamiento (Fig. 15B). En la figura 15C, se muestran imágenes representativas del análisis microscópico de trofozoítos de *E. histolytica*. Un método de cuantificación espectrofotométrica de hemoglobina intracelular demuestra que los trofozoítos estimulados con acetilcolina 1×10^{-6} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-10} M y 1×10^{-12} M presentaron niveles de hemoglobina significativamente aumentados en comparación con los controles no tratados (Fig. 15D). Estos resultados mostraron que la estimulación con acetilcolina puede promover un aumento de la fagocitosis que, junto con la migración, son procesos esenciales

para la proliferación de parásitos y la evasión de la respuesta inmune durante el proceso invasivo.

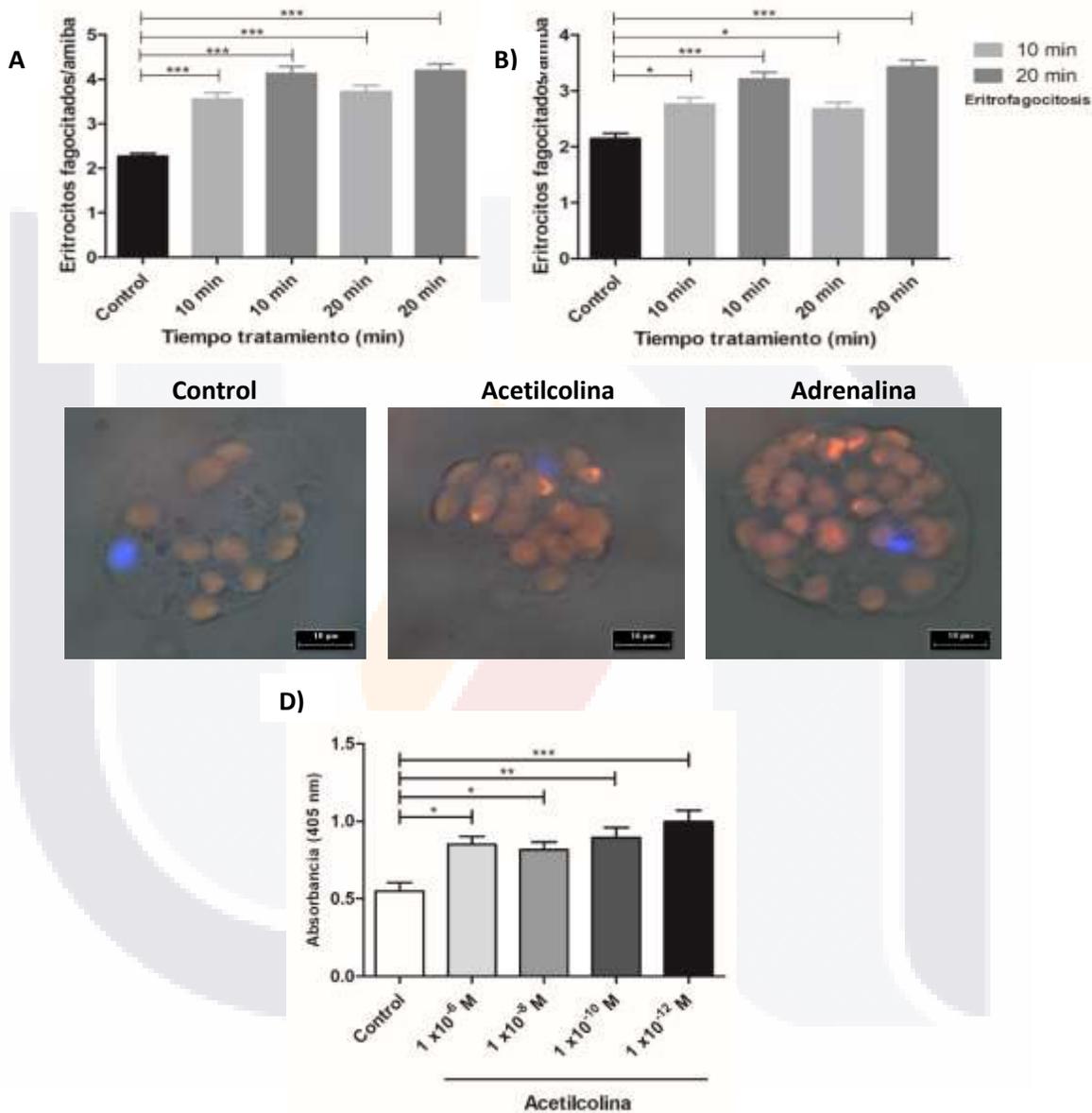


Figura 15. Efecto de adrenalina y acetilcolina sobre la eritrofagocitosis de *E. histolytica*. a) Captación de eritrocitos por trofozoítos de *E. histolytica*. Análisis por microscopía de fluorescencia. Las comparaciones estadísticas mostraron diferencias significativas en la capacidad eritrofagocítica entre diferentes tiempos de pretratamiento (10 y 20 minutos) con a) acetilcolina y b) adrenalina 1×10^{-4} M y durante 10 y 20 minutos de incubación de eritrocitos y trofozoítos en una proporción 20 a 1. c) imágenes representativas del análisis por microscopía de fluorescencia a 40x. d) Cuantificación de hemoglobina mediante análisis espectrofotométrico a 405 nm, para la determinación indirecta de eritrofagocitosis de trofozoítos tratados con diferentes concentraciones de acetilcolina durante 1 h. Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos

independientes (n=3). El análisis estadístico se realizó con la prueba de Kruskal Wallis y Dunn posttest, donde los valores de * p <0.05, ** p <0.01 y *** p <0.001 fueron considerados significativos.

Quimiotaxis y la migración de *E. histolytica*

Luego se utilizó un ensayo de migración transwell para evaluar el efecto de la adrenalina y acetilcolina sobre la capacidad de migración e invasión de los trofozoítos de *E. histolytica*. La migración de trofozoítos en medio sin suplementar mejoró significativamente con el tratamiento con acetilcolina 1×10^{-6} M y 1×10^{-8} M, en comparación con los trofozoítos de control no tratados (Fig. 16B). De igual forma la migración de los trofozoítos tratados con adrenalina a 1×10^{-6} y 1×10^{-8} M (Fig. 16A). Como control positivo, se utilizó interleucina-8 (IL-8), interferón gamma (IFN- γ) o suero fetal bovino (SBF). Para inhibir la polimerización del citoesqueleto de actina, se usó CD como control negativo (Fig. 16A y 16B). Además, la quimiotaxis de *E. histolytica* se evaluó mediante un video. Para cada registro en tiempo real, se seleccionaron trofozoítos representativos de *E. histolytica* para cada condición y se siguieron sus trayectorias durante 15 min. Este análisis mostró que acetilcolina 1×10^{-10} es un quimioatrayente de trofozoítos, cuando se comparó la quimiotaxis con suero o medio sin suplementar (Fig. 16C). Así, aunque los mecanismos implicados en la regulación de la motilidad del trofozoíto aún están en estudio, estos resultados indican que acetilcolina 1×10^{-10} M tiene efecto quimiotáctico, siendo las concentraciones de acetilcolina reguladoras positivas de la migración de *E. histolytica*. Por tanto, es posible que *in vivo*, este neurotransmisor pueda promover la migración amebiana, facilitando así la invasión del huésped.

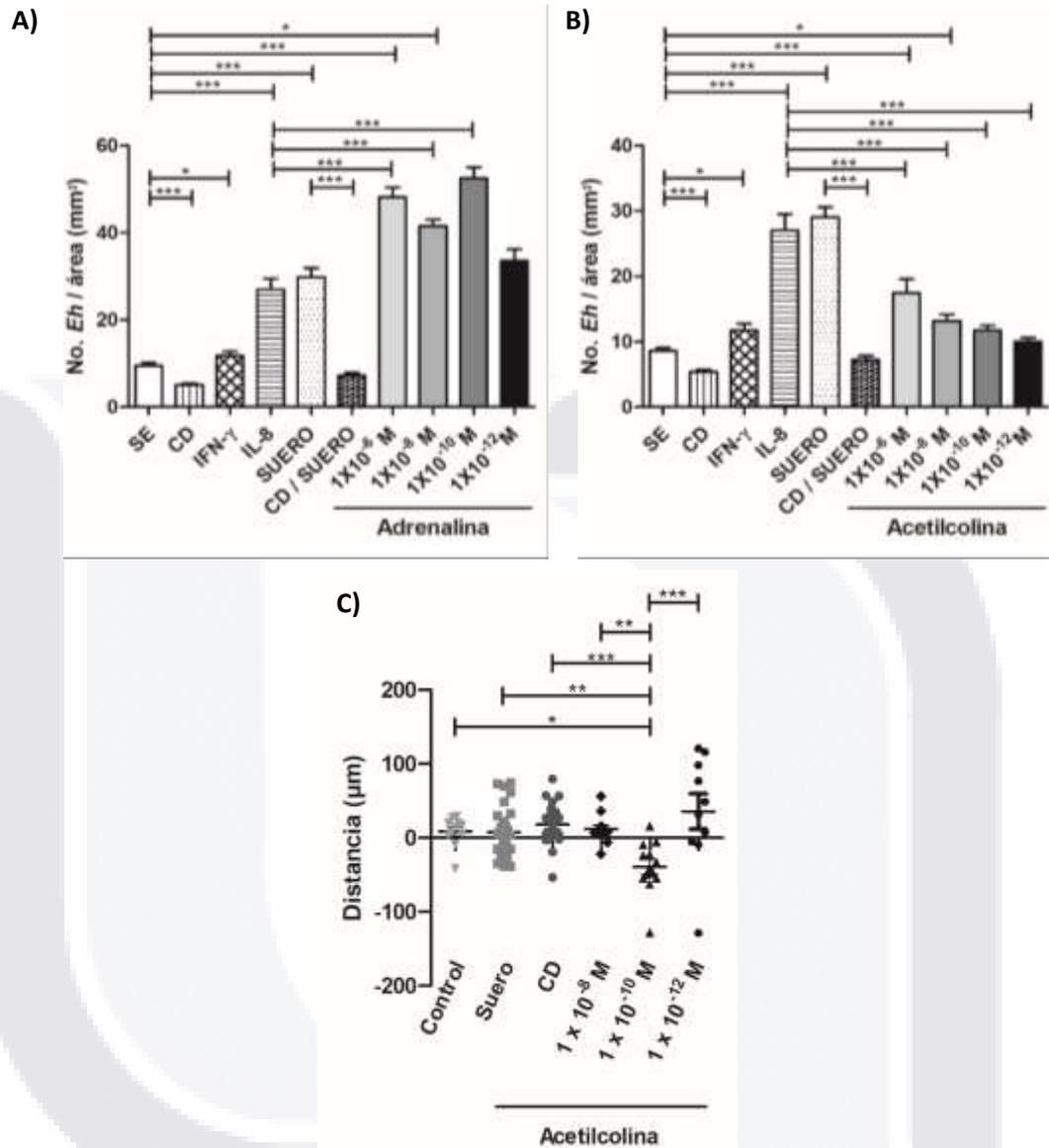


Figura 16. Acetilcolina y adrenalina inducen la migración de *E. histolytica* y la actividad quimioatrayente. Número de trofozoitos por área (mm²), que migraron a través de la cámara transwell en presencia de a) adrenalina, b) acetilcolina, suero, IL-8 e IFN- γ . C) Distancia y dirección de los movimientos amebianos hacia acetilcolina. Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes (n = 3). El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía y método postest de Tukey o Kruskal Wallis y Dunn, respectivamente, donde se consideraron significativos los valores de * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001.

Efecto de adrenalina y acetilcolina sobre el desarrollo de absceso hepático amebiano

Para evaluar el efecto *in vivo* de la estimulación de *E. histolytica* con acetilcolina y adrenalina, se examinó el desarrollo de absceso hepático amebiano (AHA) en hámsteres. El grupo control inoculado con trofozoítos no tratados presentó las lesiones características producidas por *E. histolytica* a los 4 días, es decir, lesiones pequeñas y blancas localizadas en el sitio de inoculación en el lóbulo hepático izquierdo. En contraste, los trofozoítos tratados con acetilcolina y adrenalina produjeron varios granulomas, una lesión típica causada por *E. histolytica* en el hígado de hámster (Fig.17), y el análisis histopatológico (Fig.18) destacó una lesión más grande y zonas de infiltración inflamatoria con áreas necróticas de gran tamaño áreas de los hámsteres inoculados con *E. histolytica* estimulada con adrenalina y acetilcolina. Además, el análisis morfométrico mostró áreas significativamente mayores de daño tisular producidas por *E. histolytica* después del estímulo, en comparación con las lesiones producidas por trofozoítos no tratados (Fig. 18). En conjunto, el análisis tisular macroscópico y microscópico demostró que la acetilcolina y adrenalina promueven la capacidad de diseminación de los trofozoítos, lo que da lugar a abscesos más grandes.

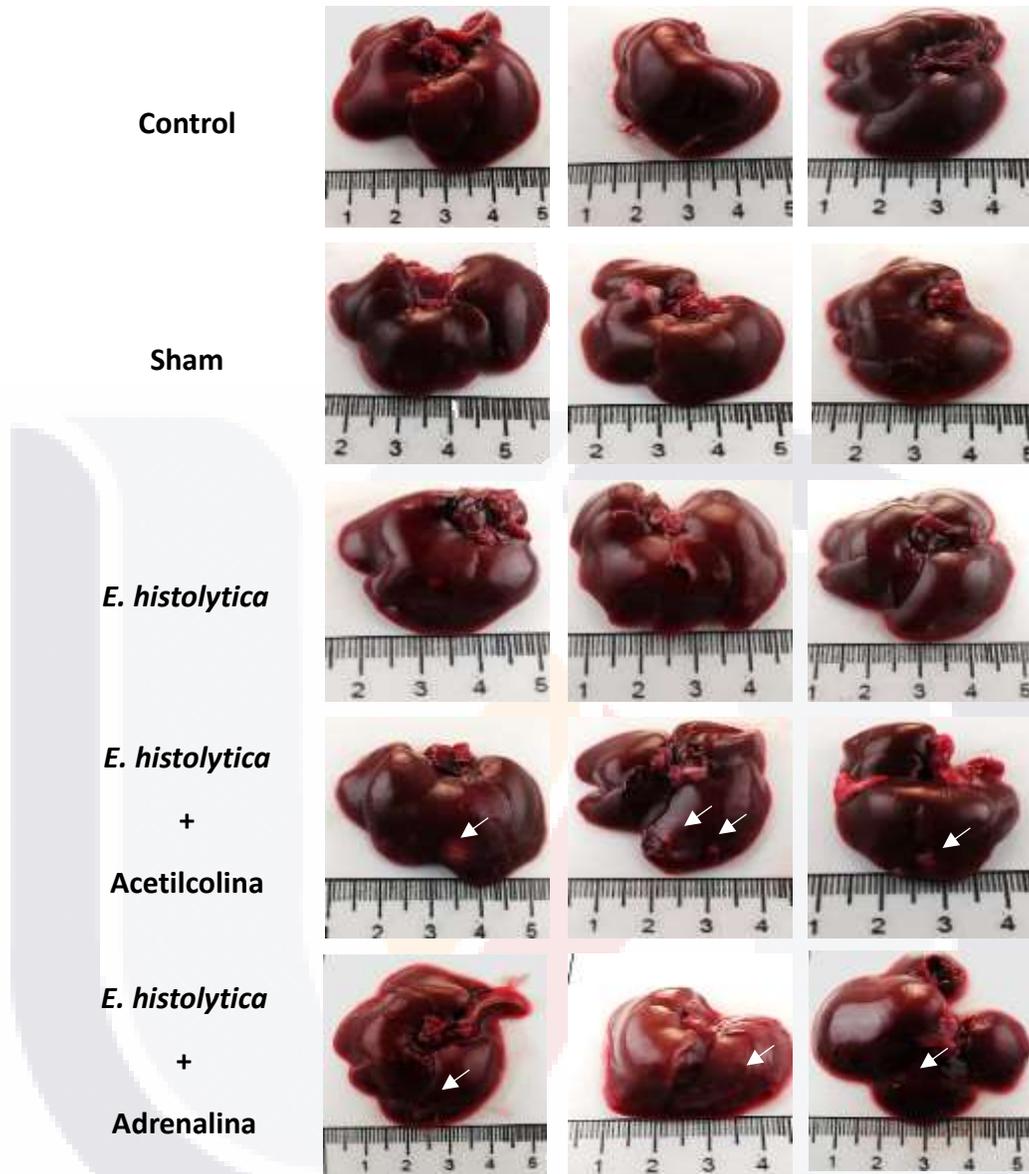


Figura 17. Efectos de la acetilcolina y adrenalina sobre el desarrollo de abscesos hepáticos amebianos (AHA). Hígados de hámsteres inoculados con trofozoítos (5×10^5) estimulados con acetilcolina y adrenalina 1×10^{-8} M durante 1 hora. Se tomaron imágenes representativas de AHA después de 4 días de inoculación para mostrar daño macroscópico. Hígado normal, control de hámsteres no infectados. Sham (inoculada con medio de cultivo) y daño producido por trofozoítos de *E. histolytica* sin tratar. Las flechas muestran lesiones únicas por *E. histolytica*, así como granulomas causados por trofozoítos pretratados con adrenalina y acetilcolina.

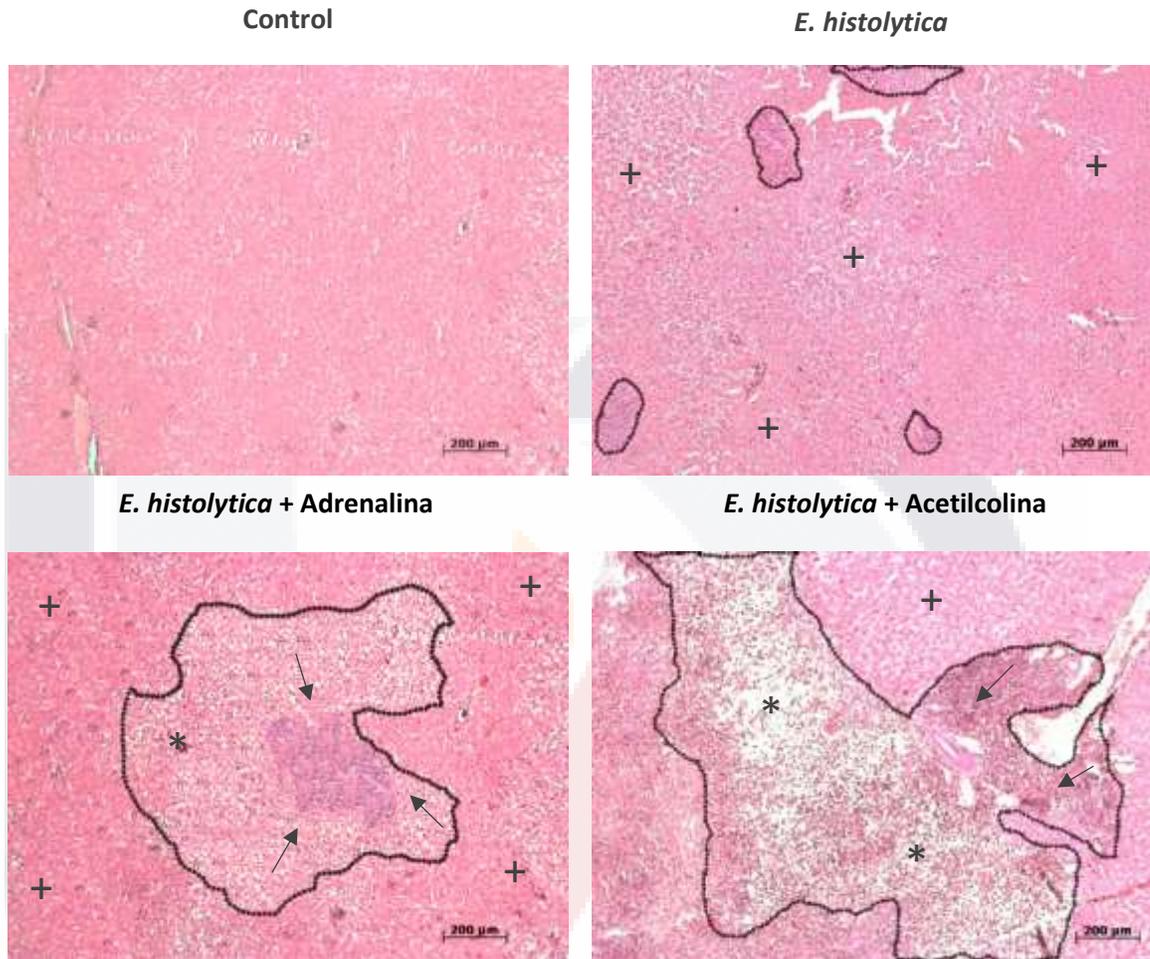


Figura 18. Daño del tejido hepático causado por trofozoítos de *E. histolytica* activados por acetilcolina y adrenalina. Análisis histopatológico de las muestras de hígado. Sección teñida con hematoxilina-eosina de animales intactos, *E. histolytica* y G) animales infectados con trofozoítos pretratados con acetilcolina y adrenalina, se observa un aumento en el desarrollo de abscesos con múltiples zonas de infiltrado inflamatorio y áreas necróticas de gran tamaño en comparación con los controles. Se aprecia tejido necrótico en el centro de la lesión (*), y los bordes muestran áreas de infiltrado inflamatorio (flecha) que están en contacto con áreas sanas del hígado (+). Se muestran imágenes representativas a 5x.

Discusión

E. histolytica ha desarrollado diversas estrategias para utilizar los recursos que puede encontrar en el hospedero. Lo que permitirá que él parásito se adapte, se replique y establezca la infección. La expresión génica de factores de virulencia del parásito se ve influenciada por distintas variables del microambiente brindado por el hospedero y a su vez, esto dependerá de la capacidad del parásito para responder a estímulos que modifiquen su virulencia (Marie & Petri, 2014). En este trabajo se evaluó la capacidad de *E. histolytica* para responder a adrenalina y acetilcolina, neurotransmisores que pudieran estar modificando la capacidad del parásito para evadir la respuesta inmune e incrementar su virulencia. En el actual trabajo se ha demostrado por primera vez la capacidad de *E. histolytica* para fijar adrenalina y acetilcolina en su membrana. Lo que podría sugerir, que el parásito tiene la capacidad de responder a este estímulo a través de receptores de membrana que no han sido aún caracterizados.

La extraordinaria actividad fagocítica de los trofozoítos de *E. histolytica* es un mecanismo indispensable en la capacidad invasiva del parásito, esta información se apoya en un estudio comparativo entre *Entamoeba dispar* (*E. dispar*), una especie no virulenta que presenta una capacidad de fagocitar reducida, y la especie *E. histolytica* (virulenta) muestra una mayor capacidad para adherirse, opsonizar y exponer fosfatidilserina de eritrocitos lo que resulta en una mayor eficiencia para fagocitar eritrocitos, por tanto, este proceso es considerado un indicador de virulencia importante (Talamás-Lara et al., 2014). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con adrenalina y acetilcolina aumenta la capacidad fagocítica de *E. histolytica*, los trofozoítos estimulados con estos neurotransmisores incrementan significativamente el número de eritrocitos ingeridos en comparación con aquellos trofozoítos que no fueron tratados. Sugiriendo así que, tanto adrenalina como acetilcolina pueden regular positivamente la fagocitosis de eritrocitos por trofozoítos de *E. histolytica*. La capacidad fagocítica es uno de los indicadores cardinales de virulencia en este organismo, por tanto, podemos hablar de que estos neurotransmisores regulan positivamente la

virulencia de *E. histolytica* a través de la fagocitosis. Sin embargo, se desconocen los mecanismos a través los cuales estas moléculas logran modular la virulencia de la amiba.

Otra propiedad importante de la amiba es su capacidad para lisar células del hospedero favoreciendo así el daño a tejidos, proceso que a su vez llega a facilitar el establecimiento de una enfermedad invasiva. Este parásito altamente citotóxico inicia el proceso de lisis con la adherencia de los trofozoítos a las células blanco, seguido a esto, los trofozoítos promueven la lisis osmótica de las células del hospedero. Esto lo logra esencialmente a través de dos mecanismos. Puede darse por un mecanismo conocido como trogocitosis (Ralston et al., 2014), en el cual la amiba es capaz de ingerir fragmentos de células vivas del hospedero o bien puede ser a través de la expresión de proteínas formadoras de poros, las cuales se insertan en la membrana de las células blanco comprometiendo la integridad de esta estructura, en ambos casos las células mueren por una lisis osmótica generada por el incremento de calcio intracelular (Zhang et al., 2004). Finalmente, los restos celulares son fagocitados. El tratamiento de lo trofozoítos con adrenalina y acetilcolina durante 60 minutos aumenta significativamente el efecto citopático basal al incrementar el porcentaje de destrucción de la monocapa de células HepG2, sugiriendo que adrenalina y acetilcolina podrían estar modulando positivamente el efecto citopático de la amiba, aunque no se conocen los mecanismos intracelulares que están involucrados en este proceso. Como ya se mencionó anteriormente, que la adherencia es un evento primordial para lograr un efecto citotóxico (Petri, Haque & Maan, 2002), nuestros resultados demuestran que la expresión de la lectina de 170 kDa incrementa significativamente en los trofozoítos estimulados con adrenalina y acetilcolina, fenómeno que de manera indirecta podría estar contribuyendo al aumento del efecto citopático. Adicionalmente, se observa que la expresión de las proteínas formadoras de poros (amebaporos) de igual forma se incrementa después del tratamiento con adrenalina y acetilcolina, es importante mencionar que estas proteínas contribuyen de manera importante a la capacidad citopática de este parásito (Leippe, 1997). Un efecto similar fue observado al tratar trofozoítos de *E. histolytica* con ésteres de forbol, activadores rápidos de la proteína cinasa C (PKC), los cuales mostraron un

incremento en la muerte de células de ovario de hámster chino (CHO), además, se utilizaron inhibidores específicos de PKC y se observó que el efecto citopático de *E. histolytica* sobre las células CHO disminuye significativamente (Weikel, Murphy, Orozco, & Ravdin, 1988). En conjunto esta información propone que la citotoxicidad amebiana es regulada por la PKC de *E. histolytica*. Existen evidencias que prueban que estímulos colinérgicos y adrenérgicos inducen la activación de PCK en diferentes tipos celulares, a través de la estimulación de receptores nicotínicos, muscarínicos y alfa 1 adrenérgicos (Messing, Stevens, Kiyasu, & Sneade, 1989). Aunque hasta el momento se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual la PKC participa en la regulación de citólisis de células blanco, otros estudios coinciden en que la activación de esta enzima, además, es esencial para la adhesión de trofozoítos, la fosforilación proteica, la actividad proteolítica local, la polimerización de actina y la reorganización del citoesqueleto de *E. histolytica* (Guillén, 1996). De manera contacto dependiente se ha señalado que la PKC regula la fosforilación de proteína involucradas en la organización de actina para su motilidad y adhesión (Carbajal, Manning-Cela, Pina, Franco, & Meza, 1996). Lo cual se ve reflejado en este trabajo, ya que se realizó un análisis de la distribución de F- actina e identificación de estructuras ricas en actina, donde se ha logrado observar que aquellos trofozoítos que fueron tratados con adrenalina y acetilcolina durante 20 minutos se detectara un aumento marcado en la presencia de macropinosomas y vacuolas, hecho que también fue observado mediante la activación de PKC por la interacción de trofozoítos y fibronectina, esta induce la exocitosis de vesículas (Santiago, Carbajal, Benítez-King, & Meza, 1994). Aunque en una menor proporción, también, se encontró aumento de las protrusiones pseudopodiales, sobre todo en aquellos trofozoítos tratados con acetilcolina en comparación con los grupos control, fenómeno que puede ser explicado por la activación de PKC a través de adrenalina y acetilcolina. La activación de esta enzima es esencial en la reorganización del citoesqueleto de actina de *E. histolytica*, proceso indispensable para la motilidad del parásito.

Las proteasas de cisteína son las proteasas más abundantes en *E. histolytica*, reportes demuestran que en el genoma de *E. histolytica* se encuentran 20 genes que codifican para

estas enzimas, de las cuales la CP-1, CP-2 y CP-5 tienen una participación predominante y representan hasta en un 90% de la actividad de proteasas de cisteína en cultivos axénicos de *E. histolytica* (Bruchhaus, Loftus, Hall, & Tannich, 2003). Se conoce que las proteasas de cisteína participan en diversos procesos como la evasión de la respuesta inmune del hospedero al degradar compuestos del complemento, anticuerpos y algunas citocinas proinflamatorias, participa, además, en procesos invasivos al degradar componentes de la matriz extracelular favoreciendo la adherencia al degradar la mucosa intestinal o bien facilitando la migración del parásito (Stanley et al., 1995; Matthiesen et al., 2013). Sumado a esto, se ha demostrado que la expresión de estas enzimas se encuentra diferencialmente expresada en la especie *E. dispar*, especie con una capacidad invasiva limitada, en comparación con *E. histolytica* (Bruchhaus et al., 2003). Especialmente la CP-5, proteasa que únicamente se encuentra expresada en lisados amebianos de *E. histolytica* esto habla de la relevancia de esta enzima en la virulencia del parásito y particularmente esta diferencia podría explicar los contrastes entre estas especies en cuanto a su capacidad invasiva (Freitas et al., 2009). (*Entamoeba histolytica* Cysteine Proteinase 5 Binds Integrin on Colonic Cells and Stimulates NFκB-mediated Pro-inflammatory Responses, s.f.) En el caso de CP-2 la expresión de la enzima se encuentra disminuida en la especie *E. dispar* al comparar con *E. histolytica* (Bruchhaus, Loftus, Hall, & Tannich, 2003). En este trabajo se demuestra que el tratamiento de los trofozoítos de *E. histolytica* con adrenalina y acetilcolina incrementa significativamente la expresión de CP-2 y CP-5 en comparación a aquellos trofozoítos que no fueron estimulados. Estos resultados sugieren que ambos neurotransmisores logran regular positivamente virulencia de *E. histolytica* a través de la expresión de estas proteasas las cuales contribuyen de manera importante al establecimiento de una enfermedad invasiva, por tanto, estas enzimas son consideradas como indicadores cardinales de virulencia de *E. histolytica*.

Adicionalmente, la actividad de CP se incrementó después del tratamiento con acetilcolina y esto podría estar directamente asociado a incremento de la expresión *ehcp-a2* y *ehcp-a5*. Además, acetilcolina indujo una mayor expresión de las proteínas de membrana L220 y la

lectina Gal / GalNAc, ambas lectinas participan en la adherencia de los trofozoítos (Aguirre García, Gutiérrez-Kobeh, & López Vancell, 2015), un mecanismo estrechamente relacionado con el reordenamiento del citoesqueleto (Manich et al., 2018). Previamente se ha descrito que la acetilcolina participa en la regulación de la vacuola contráctil de la amiba *A. proteus*, un proceso dependiente de la remodelación del citoesqueleto (Bagrov & Manusova, 2011). En relación con esto, nuestros resultados mostraron que los trofozoítos aumentaron la expresión de β -actina y elevaron la presencia de actina polimerizada (F-actina) en respuesta a estímulos de concentraciones fisiológicas de acetilcolina. La interacción de los trofozoítos de *E. histolytica* con la acetilcolina indujo la reorganización del citoesqueleto, como lo demuestra el hallazgo de estructuras ricas en F-actina, como puntos de F-actina, macropinosomas y placas de adhesión, que fueron significativamente más abundantes después del estímulo con ambos neurotransmisores. Durante la infección, la dinámica del citoesqueleto de *E. histolytica* es esencial para procesos celulares como adhesión, migración, fagocitosis y muerte de células del hospedero incluye mecanismos dependientes e independientes del contacto (Tavares et al., 2005). La regulación positiva de los factores de virulencia, en particular los componentes secretados solubles, indujo aumento significativo de la citotoxicidad de los trofozoítos tratados con acetilcolina contra la monocapa de células HepG2 a través de procesos independientes del contacto, como lo demuestra el aumento de la expresión de amebaporos y CP. Los estímulos acetilcolina también aumentaron el daño citopático de la monocapa de HepG2 (dependiente del contacto), un proceso estrechamente asociado a la trogocitosis y la fagocitosis. Ciertamente, la eritrofagocitosis es un sello distintivo de la patogenicidad amebiana que incluye adhesión, reordenamientos del citoesqueleto, secreción de factores solubles que median la muerte de las células del hospedero y finaliza con la ingestión de restos celulares. La eritrofagocitosis aumentada en trofozoítos tratados con acetilcolina, puede estar asociada al incremento de la expresión de las proteínas de membrana L220 y lectina Gal/GalNAc. De manera consistente, la motilidad, la quimiotaxis y la migración amebiana también aumentaron después del tratamiento con acetilcolina. Nuestras observaciones sugieren que el aumento de las concentraciones de acetilcolina en el hospedero durante la

infección por *E. histolytica*, podría promover el comportamiento invasivo del parásito. Aunque el efecto de la acetilcolina sobre la patogenicidad de *E. histolytica* no se ha estudiado previamente, informes anteriores proporcionaron evidencia indirecta de la participación de vías de señalización activadas por acetilcolina que involucran pequeñas GTPasas, que se consideran reguladoras maestras del citoesqueleto de actina y cuya activación está relacionada con receptores de superficie celular (Tavares et al., 2005). Específicamente, EhRho1, un miembro de la familia Rho GTPasa involucrado en la polimerización de actina, que se encuentra particularmente activo durante procesos invasivos del parásito, promoviendo así la motilidad amebiana, aumentando la migración y modulando la eritrofagocitosis (Franco-Barraza et al., 2006). De manera similar, encontramos que el tratamiento con acetilcolina aumentó la reorganización del citoesqueleto, la capacidad fagocítica amebiana y la migración de parásitos. En conjunto, estos hallazgos sugieren que los trofozoítos responden a él estímulo de acetilcolina. Sin embargo, se necesitan más estudios para describir los mecanismos de señalización, activadores y efectores implícitos.

Adrenalina y acetilcolina incrementaron la virulencia de *E. histolytica* durante la formación del absceso hepático amebiano, ya que los trofozoítos expuestos a los neurotransmisores causaron un daño tisular magnificado y una extensión de la lesión del absceso, produciendo una lesión de mayor tamaño con una importante presencia de infiltrados de células inflamatorias y granulomas múltiples. Informes anteriores demostraron que la acetilcolina aumenta la patogenicidad de *E. histolytica*, sin revelar los mecanismos implicados en la regulación de la virulencia del parásito. Además, durante la infección causada por *E. histolytica*, los pacientes presentan niveles elevados de concentraciones de acetilcolina en sangre que se restablecen a niveles normales después del tratamiento (Banu et al., 2005). De acuerdo con el presente trabajo, estos informes previos apoyaron la hipótesis de que la acetilcolina puede modular la patogenicidad amebiana, favoreciendo el establecimiento de una enfermedad invasiva.

Por lo tanto, la presencia elevada de este neurotransmisor en el sitio de la infección puede afectar la eficiencia del huésped en la eliminación del parásito. La acetilcolina es sintetizada y liberada constantemente por las células epiteliales intestinales y las terminaciones del nervio vago a concentraciones normales de orden nanomolar, controlando así las funciones viscerales y la respuesta inmune intestinal (Rosas-Ballina et al., 2011). Durante la lesión tisular, el reflejo inflamatorio activa una vía anti-inflamatoria colinérgica, aumentando la concentración local de acetilcolina (Tanaka et al., 2019; Pavlov & Tracey, 2012). Esto da como resultado, una producción disminuida de citocinas proinflamatorias por la inhibición del factor de transcripción NF- κ B y la activación de las citocinas anti-inflamatorias a través de la vía de señalización JAK2-STAT3 (de Jonge et al., 2005, p. 3). Por lo tanto, la presencia elevada de acetilcolina en el sitio de la infección podría dificultar la eliminación de *E. histolytica*, al suprimir la respuesta inmunitaria contra la ameba y provocar un daño excesivo en el tejido del hospedador, favoreciendo la diseminación de la infección.

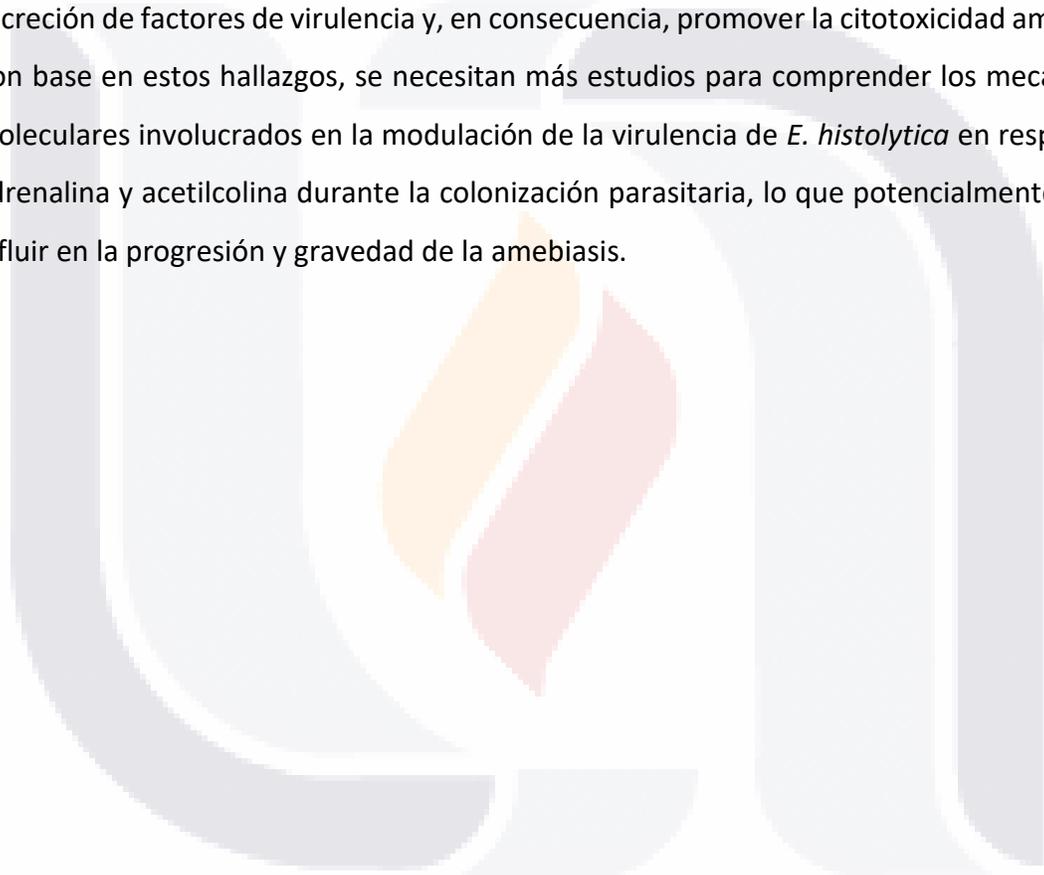
Nuestros resultados sugieren que la exposición de trofozoítos a adrenalina y acetilcolina contribuye al establecimiento de una enfermedad invasiva al modular positivamente la virulencia de *E. histolytica*. Información que coincide con lo ya antes reportado por Kulkarni y colaboradores (1986) quienes reportaron que el aumento de los niveles acetilcolina en ratas inducido por el tratamiento con fisostigmina (inhibidor de la acetilcolinesterasa), incrementa la severidad de la infección por *E. histolytica* en 3 de 7 cepas, sugiriendo que este neurotransmisor podría modular las propiedades virulentas de *E. histolytica* (Kulkarni & Sen, 1986). Por otra parte, se advierte que adrenalina debe participar en la regulación de diversos procesos celulares de *E. histolytica* de manera autocrina, puesto que se ha detectado la presencia de adrenalina en lisado amebiano (McGowan, Guerina, Wicks, & Donowitz, 1985). Es importante mencionar que hasta el momento no habían sido evaluados los efectos de adrenalina y acetilcolina sobre las propiedades de virulencia de *E. histolytica* como se hace en este estudio. No obstante, se requiere de un análisis más extenso que identifique los receptores de acetilcolina y adrenalina, que explique los mecanismos y vías

de señalización involucrados en el reconocimiento de estos neurotransmisores en trofozoítos de *E. histolytica*.



Conclusiones

En conclusión, este es el primer informe que reporta de la capacidad de *E. histolytica* de unir a su membrana adrenalina y acetilcolina. Ambos neurotransmisores tienen un efecto en la regulación de factores de virulencia amebianos, al inducir el reordenamiento del citoesqueleto, la motilidad del parásito y la fagocitosis, así como al aumentar la expresión y secreción de factores de virulencia y, en consecuencia, promover la citotoxicidad amebiana. Con base en estos hallazgos, se necesitan más estudios para comprender los mecanismos moleculares involucrados en la modulación de la virulencia de *E. histolytica* en respuesta a adrenalina y acetilcolina durante la colonización parasitaria, lo que potencialmente puede influir en la progresión y gravedad de la amebiasis.



Glosario

Absceso hepático: Los abscesos hepáticos son colecciones purulentas formadas en el parénquima hepático, como consecuencia de una infección de origen bacteriano, fúngico o parasitario.

Anticuerpos: Proteínas utilizadas por el sistema inmunitario humoral para identificar y neutralizar antígenos y promover su fagocitosis.

Catecolamina: Derivado de la tirosina, como la dopamina, la adrenalina y noradrenalina.

Electroforesis: Técnica utilizada para separar el ADN, el ARN, o moléculas o proteínas en base a su tamaño y carga eléctrica. Se utiliza una corriente eléctrica para mover las moléculas y que se separen a través de un gel.

Factor de virulencia: Componente de un patógeno que ocasiona daño en el hospedador; incluye componentes esenciales para su viabilidad.

Fagocitosis: Captura de partículas microscópicas que realizan ciertas células con fines alimenticios o de defensa, mediante la emisión de pseudópodos.

In vitro: Que significa literalmente 'en vidrio'. Se emplea con el sentido de 'fuera del organismo, utilizando métodos experimentales en el laboratorio'.

In vivo: Que significa 'en el ser vivo'. Se emplea en referencia a los procedimientos de experimentación científica que se realizan con organismos vivos.

Inmunofluorescencia: Conjunto de técnicas en donde se emplean anticuerpos marcados con fluorocromos para detectar y localizar, antígenos específicos en células y/o tejidos.

Lectina: Proteína que se fijan a las moléculas ramificadas de azúcar de las glucoproteínas y glucolípidos de la superficie celular.

Neurotransmisor: Sustancia o un producto: Que transmite los impulsos en la sinapsis nerviosa.

Parásito: Ser vivo que durante una parte o la totalidad de su vida se aloja y/o se alimenta a expensas de otro ser vivo, generalmente de diferente especie y de mayor tamaño (huésped u hospedero).

Patogenicidad: Capacidad de un microorganismo de ocasionar daño en el hospedador.

Patógeno: Microorganismo capaz de producir daño en el hospedador; la definición puede abarcar patógenos primarios y oportunistas; el daño en el hospedador puede ser resultado de la acción directa del microorganismo o de la respuesta inmune.

Quimiotaxis: Respuesta de microorganismos o células que implica dirigir su movimiento según la concentración de un estímulo químico, aproximándose o alejándose de él.

Trogocitosis: Mecanismo amebiano de ingerir fragmentos de células humanas vivas, lo que resulta en la elevación intracelular de calcio y la muerte celular eventual.

Virulencia: Grado de patogenicidad dentro de un grupo o especie de microorganismos o virus, indicado por la tasa de casos fatales y/o la habilidad del organismo para invadir los tejidos del huésped.

Western blot: Técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada.

Bibliografía

- Agostoni, E., Chinnock, J. E., De Daly, M. B., & Murray, J. G. (1957). Functional and histological studies of the vagus nerve and its branches to the heart, lungs and abdominal viscera in the cat. *The Journal of physiology*, *135*(1), 182–205. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1957.sp005703>
- Aguilar-Rojas, A., Olivo-Marin, J. C., & Guillen, N. (2016). The motility of *Entamoeba histolytica*: finding ways to understand intestinal amoebiasis. *Current opinion in microbiology*, *34*, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.016>
- Aguirre García, M., Gutiérrez-Kobeh, L., & López Vancell, R. (2015). *Entamoeba histolytica*: adhesins and lectins in the trophozoite surface. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *20*(2), 2802–2815. <https://doi.org/10.3390/molecules20022802>
- Anamika, K., Bhattacharya, A., & Srinivasan, N. (2008). Analysis of the protein kinome of *Entamoeba histolytica*. *Proteins*, *71*(2), 995–1006. <https://doi.org/10.1002/prot.21790>
- Bagrov, I., & Manusova, N. B. (2011). *Tsitologiya*, *53*(6), 537–541.
- Bansal, D., Ave, P., Kerneis, S., Frileux, P., Boché, O., Baglin, A. C., Dubost, G., Leguern, A. S., Prevost, M. C., Bracha, R., Mirelman, D., Guillén, N., & Labruyère, E. (2009). An ex-vivo human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *PLoS neglected tropical diseases*, *3*(11), e551. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000551>
- Banu, N., Zaidi, K. R., Mehdi, G., & Mansoor, T. (2005). Neurohumoral alterations and their role in amoebiasis. *Indian journal of clinical biochemistry: IJCB*, *20*(2), 142–145. <https://doi.org/10.1007/BF02867414>
- Barry, M. K., Aloisi, J. D., & Yeo, C. J. (1995). Cholinergic agents modulate transport in the isolated, perfused ileum. *The Journal of surgical research*, *59*(6), 681–686. <https://doi.org/10.1006/jsre.1995.1223>
- Beckmann, J., & Lips, K. S. (2013). The non-neuronal cholinergic system in health and disease. *Pharmacology*, *92*(5-6), 286–302. <https://doi.org/10.1159/000355835>
- Bernin, H., Marggraff, C., Jacobs, T., Brattig, N., Le, V. A., Blessmann, J., & Lotter, H. (2014). Immune markers characteristic for asymptotically infected and diseased *Entamoeba histolytica* individuals and their relation to sex. *BMC infectious diseases*, *14*, 621. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0621-1>
- Boettner, D. R., Huston, C. D., Sullivan, J. A., & Petri, W. A., Jr (2005). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* utilize externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of erythrocytes. *Infection and immunity*, *73*(6), 3422–3430. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3422-3430.2005>

Bosch, D. E., Kimple, A. J., Muller, R. E., Giguère, P. M., Machius, M., Willard, F. S., Temple, B. R., & Siderovski, D. P. (2012). Heterotrimeric G-protein signaling is critical to pathogenic processes in *Entamoeba histolytica*. *PLoS pathogens*, 8(11), e1003040. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003040>

Brown, S. W., Meyers, R. T., Brennan, K. M., Rumble, J. M., Narasimhachari, N., Perozzi, E. F., Ryan, J. J., Stewart, J. K., & Fischer-Stenger, K. (2003). Catecholamines in a macrophage cell line. *Journal of neuroimmunology*, 135(1-2), 47–55. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(02\)00435-6](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(02)00435-6)

Browning, K. N., & Travagli, R. A. (2014). Central nervous system control of gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions. *Comprehensive Physiology*, 4(4), 1339–1368. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130055>

Bruchhaus, I., Loftus, B. J., Hall, N., & Tannich, E. (2003). The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryotic cell*, 2(3), 501–509. <https://doi.org/10.1128/ec.2.3.501-509.2003>

Carbajal, M. E., Manning-Cela, R., Pina, A., Franco, E., & Meza, I. (1996). Fibronectin-induced intracellular calcium rise in *Entamoeba histolytica* trophozoites: effect on adhesion and the actin cytoskeleton. *Experimental parasitology*, 82(1), 11–20. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0002>

Choudhuri, G., & Rangan, M. (2012). Amebic infection in humans. *Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology*, 31(4), 153–162. <https://doi.org/10.1007/s12664-012-0192-2>

Christy, N. C., & Petri, W. A., Jr (2011). Mechanisms of adherence, cytotoxicity and phagocytosis modulate the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Future microbiology*, 6(12), 1501–1519. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.120>

Coppi, A., Merali, S., & Eichinger, D. (2002). The enteric parasite *Entamoeba* uses an autocrine catecholamine system during differentiation into the infectious cyst stage. *The Journal of biological chemistry*, 277(10), 8083–8090. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111895200>

Coppi, A., Merali, S., & Eichinger, D. (2002). The enteric parasite *Entamoeba* uses an autocrine catecholamine system during differentiation into the infectious cyst stage. *The Journal of biological chemistry*, 277(10), 8083–8090. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111895200>

Cornick, S., & Chadee, K. (2017). *Entamoeba histolytica*: Host parasite interactions at the colonic epithelium. *Tissue barriers*, 5(1), e1283386. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1283386>

Costa, M., Brookes, S. J., & Hennig, G. W. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut*, 47 Suppl 4(Suppl 4), iv15–iv26. https://doi.org/10.1136/gut.47.suppl_4.iv15

de Jonge W. J. (2013). The Gut's Little Brain in Control of Intestinal Immunity. *ISRN gastroenterology*, 2013, 630159. <https://doi.org/10.1155/2013/630159>

Downing, J. E., & Miyan, J. A. (2000). Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunology today*, 21(6), 281–289. [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(00\)01635-2](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(00)01635-2)

Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P., & Vizi, E. S. (2000). The sympathetic nerve -an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological reviews*, 52(4), 595–638.

Espinosa-Cantellano, M., & Martínez-Palomo, A. (2000). Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clinical microbiology reviews*, 13(2), 318–331. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.2.318-331.2000>

Faust, D. M., & Guillen, N. (2012). Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes and infection*, 14(15), 1428–1441. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.013>

Franco-Barraza, J., Zamudio-Meza, H., Franco, E., del Carmen Domínguez-Robles, M., Villegas-Sepúlveda, N., & Meza, I. (2006). Rho signaling in *Entamoeba histolytica* modulates actomyosin-dependent activities stimulated during invasive behavior. *Cell motility and the cytoskeleton*, 63(3), 117–131. <https://doi.org/10.1002/cm.20105>

Frederick, J., & Eichinger, D. (2004). *Entamoeba invadens* contains the components of a classical adrenergic signaling system. *Molecular and biochemical parasitology*, 137(2), 339–343. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.07.003>

Freitas, M. A., Fernandes, H. C., Calixto, V. C., Martins, A. S., Silva, E. F., Pesquero, J. L., & Gomes, M. A. (2009). *Entamoeba histolytica*: cysteine proteinase activity and virulence. Focus on cysteine proteinase 5 expression levels. *Experimental parasitology*, 122(4), 306–309. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.04.005>

Furness, J. B., Callaghan, B. P., Rivera, L. R., & Cho, H. J. (2014). The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Advances in experimental medicine and biology*, 817, 39–71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_3

Gitler, C., Calef, E., & Rosenberg, I. (1984). Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 307(1131), 73–85. <https://doi.org/10.1098/rstb.1984.0110>

Goldston, A. M., Powell, R. R., Koushik, A. B., & Temesvari, L. A. (2012). Exposure to host ligands correlates with colocalization of Gal/GalNAc lectin subunits in lipid rafts and phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate signaling in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic cell*, 11(6), 743–751. <https://doi.org/10.1128/EC.00054-12>

Guillén N. (1996). Role of signalling and cytoskeletal rearrangements in the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Trends in microbiology*, 4(5), 191–197. [https://doi.org/10.1016/0966-842x\(96\)10033-0](https://doi.org/10.1016/0966-842x(96)10033-0)

Gutiérrez-Kobeh, L., Cabrera, N., & Pérez-Montfort, R. (1997). A mechanism of acquired resistance to complement-mediated lysis by *Entamoeba histolytica*. *The Journal of parasitology*, 83(2), 234–241.

Haque, R., Huston, C. D., Hughes, M., Houpt, E., & Petri, W. A., Jr (2003). Amebiasis. *The New England journal of medicine*, 348(16), 1565–1573. <https://doi.org/10.1056/NEJMra022710>

Hou, Y., Mortimer, L., & Chadee, K. (2010). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 5 binds integrin on colonic cells and stimulates NFkappaB-mediated pro-inflammatory responses. *The Journal of biological chemistry*, 285(46), 35497–35504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.066035>

Iyer, L. R., Verma, A. K., Paul, J., & Bhattacharya, A. (2019). Phagocytosis of Gut Bacteria by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 34. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00034>

Kaur, U., Sharma, A. K., Sharma, M., & Vohra, H. (2004). Distribution of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin-specific antibody response in an endemic area. *Scandinavian journal of immunology*, 60(5), 524–528. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01512.x>

Keely S. J. (2011). Epithelial acetylcholine—a new paradigm for cholinergic regulation of intestinal fluid and electrolyte transport. *The Journal of physiology*, 589(Pt 4), 771–772. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.204263>

Kerage, D., Sloan, E. K., Mattarollo, S. R., & McCombe, P. A. (2019). Interaction of neurotransmitters and neurochemicals with lymphocytes. *Journal of neuroimmunology*, 332, 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.04.006>

Kulkarni, R. B., & Sen, P. C. (1986). In vivo effect of histamine & acetylcholine on the virulence of *Entamoeba histolytica*. *The Indian journal of medical research*, 84, 279–282.

Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*, 30(1), 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>

Lamm M. E. (1998). Current concepts in mucosal immunity. IV. How epithelial transport of IgA antibodies relates to host defense. *The American journal of physiology*, 274(4), G614–G617. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.274.4.g614>

Leippe M. (1997). Amoebapores. *Parasitology today (Personal ed.)*, 13(5), 178–183. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(97\)01038-7](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(97)01038-7)

Lin, J. Y., & Chadee, K. (1992). Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 148(12), 3999–4005.

Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., Andrews, K. G., Atkinson, C., Baddour, L. M., Barker-Collo, S., Bartels, D. H., Bell, M. L., Benjamin, E. J., ... Memish, Z. A. (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)

Manich, M., Hernandez-Cuevas, N., Ospina-Villa, J. D., Syan, S., Marchat, L. A., Olivo-Marin, J. C., & Guillén, N. (2018). Morphodynamics of the Actin-Rich Cytoskeleton in *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 179. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00179>

Marie, C., & Petri, W. A., Jr (2014). Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annual review of microbiology*, 68, 493–520. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103550>

Matthiesen, J., Bär, A. K., Bartels, A. K., Marien, D., Ofori, S., Biller, L., Tannich, E., Lotter, H., & Bruchhaus, I. (2013). Overexpression of specific cysteine peptidases confers pathogenicity to a nonpathogenic *Entamoeba histolytica* clone. *mBio*, 4(2), e00072-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00072-13>

McGowan, K., Guerina, V., Wicks, J., & Donowitz, M. (1985). Secretory hormones of *Entamoeba histolytica*. *Ciba Foundation symposium*, 112, 139–154. <https://doi.org/10.1002/9780470720936.ch8>

Messing, R. O., Stevens, A. M., Kiyasu, E., & Sneade, A. B. (1989). Nicotinic and muscarinic agonists stimulate rapid protein kinase C translocation in PC12 cells. *The Journal of*

neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 9(2), 507–512. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-02-00507.1989>

Mi-Ichi, F., Yoshida, H., & Hamano, S. (2016). *Entamoeba* Encystation: New Targets to Prevent the Transmission of Amebiasis. *PLoS pathogens*, 12(10), e1005845. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005845>

Mittal, R., Debs, L. H., Patel, A. P., Nguyen, D., Patel, K., O'Connor, G., Grati, M., Mittal, J., Yan, D., Eshraghi, A. A., Deo, S. K., Daunert, S., & Liu, X. Z. (2017). Neurotransmitters: The Critical Modulators Regulating Gut-Brain Axis. *Journal of cellular physiology*, 232(9), 2359–2372. <https://doi.org/10.1002/jcp.25518>

Muñoz-Ortega, M., Quintanar-Stephano, A., García Lorenzana, M., Campos-Esparza, M. R., Silva-Briano, M., Adabache-Ortíz, A., Campos-Rodríguez, R., Rodríguez, M. G., & Ventura-Juárez, J. (2011). Modulation of amoebic hepatic abscess by the parasympathetic system. *Parasite immunology*, 33(1), 65–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01245.x>

Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2016). Immune Response of Amebiasis and Immune Evasion by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in immunology*, 7, 175. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00175>

Oberbeck R. (2006). Catecholamines: physiological immunomodulators during health and illness. *Current medicinal chemistry*, 13(17), 1979–1989. <https://doi.org/10.2174/092986706777584997>

Padilla-Vaca, F., & Anaya-Velázquez, F. (2010). Insights into *Entamoeba histolytica* virulence modulation. *Infectious disorders drug targets*, 10(4), 242–250. <https://doi.org/10.2174/187152610791591638>

Pasvol G. (2006). The treatment of complicated and severe malaria. *British medical bulletin*, 75-76, 29–47. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldh059>

Peña, G., Cai, B., Liu, J., van der Zanden, E. P., Deitch, E. A., de Jonge, W. J., & Ulloa, L. (2010). Unphosphorylated STAT3 modulates alpha 7 nicotinic receptor signaling and cytokine production in sepsis. *European journal of immunology*, 40(9), 2580–2589. <https://doi.org/10.1002/eji.201040540>

Ralston, K. S., & Petri, W. A., Jr (2011). Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends in parasitology*, 27(6), 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.02.006>

Ralston, K. S., Solga, M. D., Mackey-Lawrence, N. M., Somlata, Bhattacharya, A., & Petri, W. A., Jr (2014). Trophocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion. *Nature*, 508(7497), 526–530. <https://doi.org/10.1038/nature13242>

Ravdin, J. I., Abd-Alla, M. D., Welles, S. L., Reddy, S., & Jackson, T. F. (2003). Intestinal antilectin immunoglobulin A antibody response and immunity to *Entamoeba dispar* infection following cure of amebic liver abscess. *Infection and immunity*, 71(12), 6899–6905. <https://doi.org/10.1128/iai.71.12.6899-6905.2003>

Rosales-Encina, J. L., Meza, I., López-De-León, A., Talamás-Rohana, P., & Rojkind, M. (1987). Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of infectious diseases*, 156(5), 790–797. <https://doi.org/10.1093/infdis/156.5.790>

Rosas-Ballina, M., Olofsson, P. S., Ochani, M., Valdés-Ferrer, S. I., Levine, Y. A., Reardon, C., Tusche, M. W., Pavlov, V. A., Andersson, U., Chavan, S., Mak, T. W., & Tracey, K. J. (2011). Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6052), 98–101. <https://doi.org/10.1126/science.1209985>

Sánchez-Alemán, E., Quintanar-Stephano, A., Escobedo, G., Campos-Esparza, M., Campos-Rodríguez, R., & Ventura-Juárez, J. (2015). Vagotomy induces deregulation of the inflammatory response during the development of amoebic liver abscess in hamsters. *Neuroimmunomodulation*, 22(3), 166–180. <https://doi.org/10.1159/000362240>

Santiago, A., Carbajal, M. E., Benítez-King, G., & Meza, I. (1994). *Entamoeba histolytica*: PKC transduction pathway activation in the trophozoite-fibronectin interaction. *Experimental parasitology*, 79(3), 436–444. <https://doi.org/10.1006/expr.1994.1105>

Snow, M., Chen, M., Guo, J., Atkinson, J., & Stanley, S. L., Jr (2008). Differences in complement-mediated killing of *Entamoeba histolytica* between men and women--an explanation for the increased susceptibility of men to invasive amebiasis?. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 78(6), 922–923.

Stanley, S. L., Jr, Zhang, T., Rubin, D., & Li, E. (1995). Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infection and immunity*, 63(4), 1587–1590. <https://doi.org/10.1128/IAI.63.4.1587-1590.1995>

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 comparative study. *BioMed research international*, 2014, 626259. <https://doi.org/10.1155/2014/626259>

Tanaka, S., Hammond, B., Rosin, D. L., & Okusa, M. D. (2019). Neuroimmunomodulation of tissue injury and disease: an expanding view of the inflammatory reflex pathway. *Bioelectronic medicine*, 5, 13. <https://doi.org/10.1186/s42234-019-0029-8>

Tavares, P., Rigotherier, M. C., Khun, H., Roux, P., Huerre, M., & Guillén, N. (2005). Roles of cell adhesion and cytoskeleton activity in *Entamoeba histolytica* pathogenesis: a delicate balance. *Infection and immunity*, *73*(3), 1771–1778. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1771-1778.2005>

Teixeira, J. E., & Huston, C. D. (2008). Participation of the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein in amebic phagocytosis of apoptotic host cells. *Infection and immunity*, *76*(3), 959–966. <https://doi.org/10.1128/IAI.01455-07>

Thibeaux, R., Avé, P., Bernier, M., Morcelet, M., Frileux, P., Guillén, N., & Labruyère, E. (2014). The parasite *Entamoeba histolytica* exploits the activities of human matrix metalloproteinases to invade colonic tissue. *Nature communications*, *5*, 5142. <https://doi.org/10.1038/ncomms6142>

Tillack, M., Biller, L., Irmer, H., Freitas, M., Gomes, M. A., Tannich, E., & Bruchhaus, I. (2007). The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC genomics*, *8*, 170. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-170>

Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J. H., Wang, H., Yang, H., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C. J., & Tracey, K. J. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, *421*(6921), 384–388. <https://doi.org/10.1038/nature01339>

Weikel, C. S., Murphy, C. F., Orozco, E., & Ravdin, J. I. (1988). Phorbol esters specifically enhance the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infection and immunity*, *56*(6), 1485–1491. <https://doi.org/10.1128/IAI.56.6.1485-1491.1988>

WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. (1997). *Epidemiological bulletin*, *18*(1), 13–14.

Wilson, I. W., Weedall, G. D., Lorenzi, H., Howcroft, T., Hon, C. C., Deloger, M., Guillén, N., Paterson, S., Clark, C. G., & Hall, N. (2019). Genetic Diversity and Gene Family Expansions in Members of the Genus *Entamoeba*. *Genome biology and evolution*, *11*(3), 688–705. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz009>

Yoshikawa, H., Kurokawa, M., Ozaki, N., Nara, K., Atou, K., Takada, E., Kamochi, H., & Suzuki, N. (2006). Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7. *Clinical and experimental immunology*, *146*(1), 116–123. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03169.x>

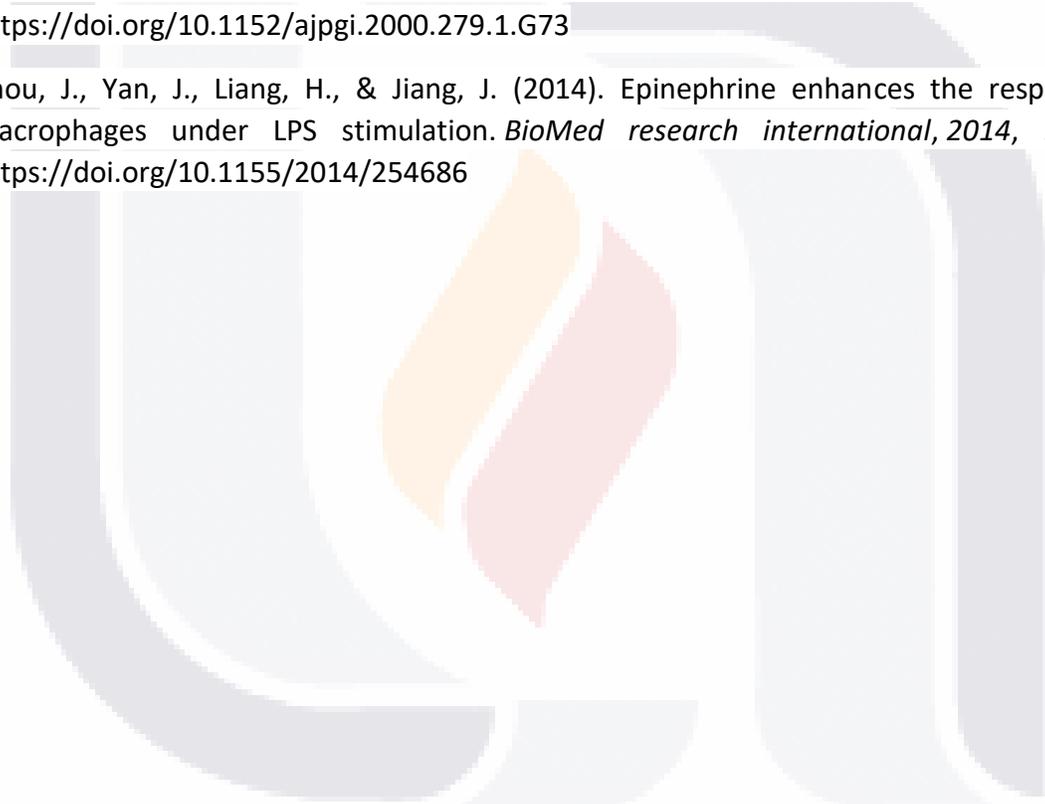
Zaki, M., Andrew, N., & Insall, R. H. (2006). *Entamoeba histolytica* cell movement: a central role for self-generated chemokines and chemorepellents. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 103(49), 18751–18756.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0605437103>

Zhang, X., Zhang, Z., Alexander, D., Bracha, R., Mirelman, D., & Stanley, S. L., Jr (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), 678–683.
<https://doi.org/10.1128/iai.72.2.678-683.2004>

Zheng, H., & Berthoud, H. R. (2000). Functional vagal input to gastric myenteric plexus as assessed by vagal stimulation-induced Fos expression. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 279(1), G73–G81.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.279.1.G73>

Zhou, J., Yan, J., Liang, H., & Jiang, J. (2014). Epinephrine enhances the response of macrophages under LPS stimulation. *BioMed research international*, 2014, 254686.
<https://doi.org/10.1155/2014/254686>



Anexos
Anexo A



Acetylcholine Upregulates *Entamoeba histolytica* Virulence Factors, Enhancing Parasite Pathogenicity in Experimental Liver Amebiasis

OPEN ACCESS

Edited by:

Jesús Velázquez,
Instituto Politécnico Nacional de
México (CINVESTAV), Mexico

Reviewed by:

Cecilia Bahueles,
Instituto Politécnico Nacional de
México (CINVESTAV), Mexico
Luili López-Contreras,
Autonomous University of the State of
Hidalgo, Mexico

***Correspondence:**

Javier Ventura-Juárez
jventura@comciqaas.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Parasite and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 23 July 2020

Accepted: 08 December 2020

Published: 28 January 2021

Citation:

Medina-Rosales MN,
Muñoz-Ortega MH,
García-Hernández MH,
Talamás-Rohana P,
Medina-Ramírez E, Salas-Morón LG,
Martínez-Hernández SL,
Ávila-Blanco ME, Medina-Rosales B
and Ventura-Juárez J (2021)
Acetylcholine Upregulates *Entamoeba*
histolytica Virulence Factors,
Enhancing Parasite Pathogenicity in
Experimental Liver Amebiasis.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 10:586354.
doi: 10.3389/fcimb.2020.586354

Marina Nayeli Medina-Rosales¹, Martín Humberto Muñoz-Ortega²,
Mariana Haydee García-Hernández³, Patricia Talamás-Rohana⁴,
Iliana Ernestina Medina-Ramírez³, Larissa Guadalupe Salas-Morón¹,
Sandra Luz Martínez-Hernández¹, Manuel Enrique Ávila-Blanco¹,
Beatriz Medina-Rosales¹ and Javier Ventura-Juárez^{1*}

¹ Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico, ² Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico, ³ Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de Investigación Biomédica Zacatecas, Zacatecas, Mexico, ⁴ Departamento de Infectología y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, Mexico

Entamoeba histolytica is an invasive enteric protozoan, whose infections are associated to high morbidity and mortality rates. However, only less than 10% of infected patients develop invasive amebiasis. The ability of *E. histolytica* to adapt to the intestinal microenvironment could be determinant in triggering pathogenic behavior. Indeed, during chronic inflammation, the vagus nerve limits the immune response through the anti-inflammatory reflex, which includes acetylcholine (ACh) as one of the predominant neurotransmitters at the infection site. Consequently, the response of *E. histolytica* trophozoites to ACh could be implicated in the establishment of invasive disease. The aim of this study was to evaluate the effect of ACh on *E. histolytica* virulence. Methods include binding detection of ACh to plasma membrane, quantification of the relative expression of virulence factors by RT-PCR and western blot, evaluation of the effect of ACh in different cellular processes related to *E. histolytica* pathogenesis, and assessment of the capability of *E. histolytica* to migrate and form hepatic abscesses in hamsters. Results demonstrated that *E. histolytica* trophozoites bind ACh on their membrane and show a clear increase of the expression of virulence factors, that were upregulated upon stimulation with the neurotransmitter. ACh treatment increased the expression of L220, Gal/GalNAc lectin heavy subunit (170 kDa), amebapore C, cysteine proteinase 2 (*ahcp-a2*), and cysteine proteinase 5 (*ahcp-a5*). Moreover, erythrophagocytosis, cytotoxicity, and actin cytoskeleton remodeling were augmented after ACh treatment. Likewise, by assessing the formation of amebic liver abscess, we found that stimulated trophozoites to develop greater hamster hepatic lesions with multiple granulomas. In conclusion, ACh