



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

**TESIS**

**Exposición de *E. histolytica* a Norepinefrina y Acetilcolina y su efecto de virulencia en el absceso hepático amebiano en hámster.**

PRESENTA

Andrea Araceli Guillén Meléndez

Para obtener el grado de Maestría en Ciencias Área de Toxicología

Tutor.

Dr. Javier Ventura Juárez

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL

Cotutora. Dra. Raquel Guerrero Alba

Asesora. Dra. Sandra Luz Martínez Hernández

Aguascalientes, Ags, junio 2021



**M en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ  
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**

**PRESENTE**

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **ANDREA ARACELI GUILLÉN MELENDEZ** con ID 163003 quien realizó la tesis titulado: **EXPOSICIÓN DE *E. histolytica* A NOREPINEFRINA Y ACETILCOLINA Y SU EFECTO DE VIRULENCIA EN EL ABSCESO HEPÁTICO AMEBIANO EN HÁMSTER**, 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.

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 10 de junio de 2021.**

**Dr. Javier Ventura Juárez**  
**Tutor de tesis**

**Dra. Raquel Guerrero Alba**  
**Co-Tutor de tesis**

**Dra. Sandra Luz Martínez Hernández**  
**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: 15/06/2021

NOMBRE: Andrea Araceli Guillén Meléndez ID 163003

PROGRAMA: Maestría en Ciencias área Biotecnología Vegetal o Toxicología LGAC (del posgrado): Toxicología

TIPO DE TRABAJO: ( X ) Tesis ( ) Trabajo práctico

TITULO: Exposición de Entamoeba histolytica a norepinefrina y acetilcolina y su efecto de virulencia en el absceso hepático amebiano en hámster

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Conocer los mecanismos de interacción de la amiba con respecto a los neurotransmisores que modulan las funciones del aparato digestivo

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
SI 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
NA 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
NA Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos Institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- NA Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
NA El estudiante es el primer autor
NA El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
NA En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
NA Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
NA 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 X No

FIRMAS

Elaboró: \* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN: Dra. en C. Élsa Marcela Ramírez López

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: Dra. en C. Rafael Guerrero Alba

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

Revisó: NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO: Dra. en C. Haydee Martínez-Rovalcaba

Autorizó: NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO: M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado. En cumplimiento con el Art. 105C 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. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
Aprobado por: D. Control Escolar/D. Apoyo al Posg.

Código: DO-SEE-FO-15
Actualización: 01
Emisión: 20/06/19

## Agradecimientos

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes por darme la oportunidad de estudiar mi posgrado.

A mi comité conformado por Dr. Javier Ventura Juárez, Dra. Sandra Luz Martínez Hernández y Dra. Raquel Guerrero Alba que me apoyaron desde el inicio hasta el final y sobre todo que no perdieron la confianza en mi

A mi Familia que siempre me han apoyado en todo lo que siempre he querido hacer los quiero mucho.

A mi compañera de vida Lía Valadez Esparza por estar conmigo y creer en mí.

A mis amigos que son aquellas personas que he elegido como mi familia en Especial a mi Amigo M en C César Adrián Martínez Carrasco quien ha estado conmigo siempre que lo necesito, también a mis amigos que conocí y me acompañaron durante la maestría Emmanuel Bernal, Marisa Rodela y Marie Balli.

Haciendo que suceda

## Índice General

Resumen.....	5
Abstract.....	7
Capítulo 1. Introducción .....	9
1.1 <i>Entamoeba histolytica</i> .....	9
1.2 Epidemiología de la amebiasis .....	9
1.3 Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i> .....	10
1.4 Factores de patogenicidad de <i>E. histolytica</i> .....	12
1.4.1 Adhesinas tipo lectinas .....	12
1.4.2 Amebaporos .....	13
1.4.3 Cisteína proteasas.....	13
1.4.4 Otras enzimas y complejos patogénicos de <i>E. histolytica</i> .....	14
1.4.5 Fagocitosis .....	14
1.5 Patología.....	16
1.6 Absceso hepático amebiano (AHA) .....	16
1.7 Sistema Nervioso Autónomo .....	18
1.8 Neurotransmisores.....	19
1.8.1 Acetilcolina .....	19
1.8.2 Noradrenalina .....	19
1.9 Receptores .....	20
1.9.1 Receptores alfa y beta adrenérgicos .....	20
1.9.2 Receptores muscarínicos y nicotínicos.....	21
Capítulo 2. Antecedentes.....	25
Capítulo 3. Justificación .....	27
Capítulo 4. Hipótesis .....	28
Capítulo 5. Objetivo general.....	29
5.1 Objetivos particulares .....	29
Capítulo 6. Material y métodos.....	30
6.1 Cultivo axénico de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	30
6.2 Tratamiento de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> con neurotransmisores.....	30

6.3 Ensayo de viabilidad .....	30
6.4 Extracción de ARN.....	31
6.4.1 Síntesis de ADN complementario (ADNc) .....	31
6.4.2 PCR tiempo real (qPCR) .....	32
6.5 Tratamiento de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> pre-inoculación por vía intrahepática. ....	32
6.6 Modelo de absceso hepático amebiano.....	33
6.6.1 Animales de experimentación.....	33
6.7 Procesamiento de tejido hepático .....	35
6.7.1 Tinción de Hematoxilina y Eosina.....	35
6.10 Inmunodetección de proteínas: Western-blot .....	35
6.10.1 Extracción de proteínas .....	36
6.10.2 Cuantificación de proteína.....	36
6.10.3 Electroforesis en gel SDS-PAGE.....	36
6.10.4 Electrotransferencia.....	36
6.10.5 Inmunodetección .....	37
6.11 Análisis estadístico .....	38
Capítulo 7. Resultados.....	39
7.1 Acetilcolina influye sobre la viabilidad de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> ....	39
7.2 Norepinefrina influye sobre la viabilidad de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	41
7.3 Expresión de los factores de virulencia de <i>E. histolytica</i> .....	44
7.4 Inducción del absceso hepático amebiano .....	46
7.4.1 Trofozoítos de <i>E. histolytica</i> tratados con los neurotransmisores, generan daño a nivel hepático después de ser inoculados. ....	48
7.5 Detección de apoptosis mediante la identificación de Caspa 3, en el absceso hepático amebiano.....	52
Discusión .....	55
Conclusión .....	59
Referencias.....	60
Anexos .....	69

## Índice de Tablas

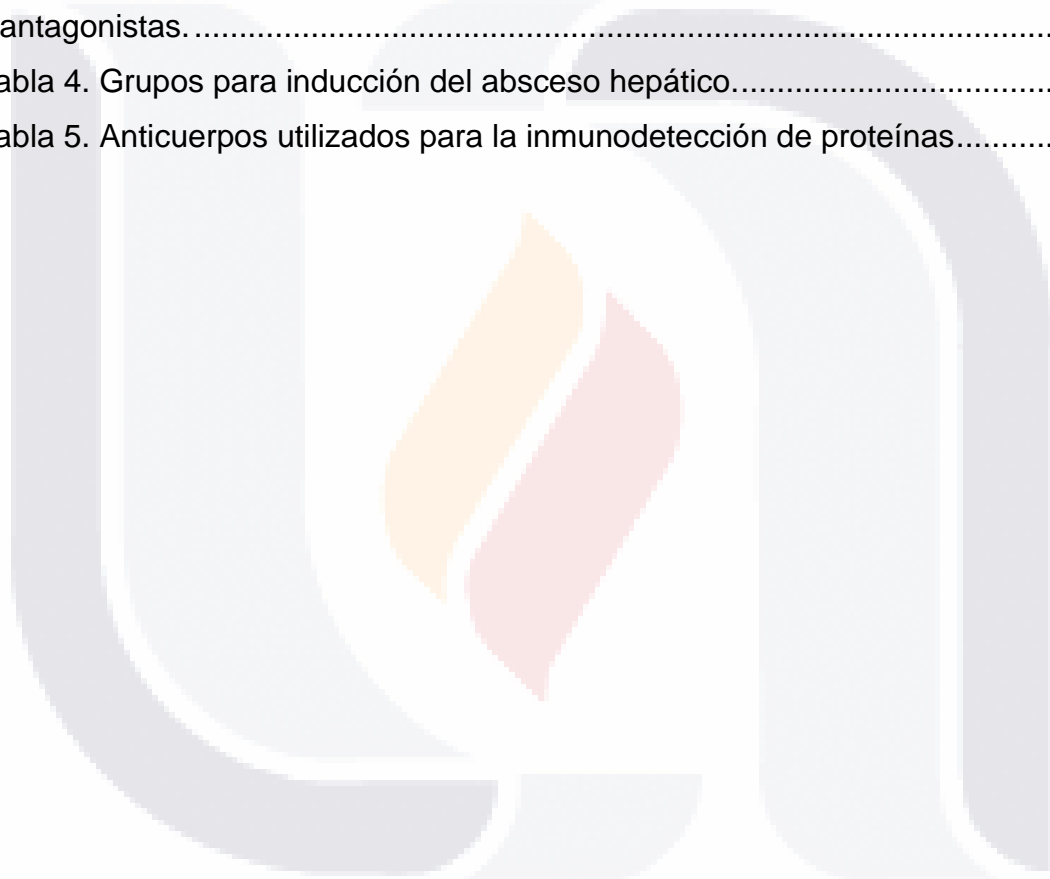
Tabla 1. Principales funciones de las proteínas secretadas/excretadas por los trofozoítos de *E. histolytica* (Castaño-Osorio, 2009). ..... 15

Tabla 2. Tratamiento de los trofozoítos de *E. histolytica* con los neurotransmisores ..... 30

Tabla 3. Tratamiento de los trofozoítos de *E. histolytica* con los neurotransmisores y antagonistas. .... 33

Tabla 4. Grupos para inducción del absceso hepático. .... 34

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas. .... 37



### Índice de Gráficas

Grafica 1. Acetilcolina modifica la viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica*. . 41

Grafica 2. Norepinefrina modifica la viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica*.  
..... 44

Grafica 3. Análisis cuantitativo de Caspasa 3 en hígados de hámsteres inoculados con trofozoítos de *E. histolytica* tratados con neurotransmisores. .... 54

### Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. (“CDC - DPDx - Amebiasis,” n.d.)  
..... 11

Figura 2..... 12

Figura 3. . Estructura y células del hígado (González-Ponce et al., 2018)..... 17

Figura 4. Figura 4. Concentraciones altas de Acetilcolina modifica la viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica*..... 40

Figura 5. Concentraciones altas de Norepinefrina provoca muerte de los trofozoítos.  
..... 43

Figura 6. Análisis de la expresión génica de Factores de virulencia de *E. histolytica* por qPCR. .... 45

Figura 7. Inducción del absceso hepático amebiano, análisis microscópico..... 47

Figura 8. Figura 8. Comparación histológica del hígado después de la inoculación de los trofozoítos por vía intrahepática. .... 49

Figura 9. Los trofozoítos tratados con Norepinefrina ocasionan mayor zona de inflamación que los trofozoítos tratados Carvedilol + Norepinefrina. .... 50

Figura 10. Figura 10. Comparación del comportamiento entre trofozoítos de *E. histolytica* tratados con Atropina + Acetilcolina y los que solo fueron tratados con Acetilcolina..... 51

Figura 11. Presencia de Caspasa 3 en hígados de hámsteres inoculados con trofozoítos de *E. histolytica* expuestos a diferentes tratamientos..... 52



## Resumen

El parásito *E. histolytica* ocasiona la amibiasis en humanos, a nivel mundial se estima que existen alrededor de 500 millones de parasitados, ocasionando al año entre 50,000 y 100,000 muertes. En México, por año se registran aproximadamente 16 millones de portadores, 1.3 millones de enfermos y de 10 a 30 mil muertes provocadas por *E. histolytica* por lo tanto esta infección representa un importante problema de salud pública.

Clínicamente, *E. histolytica* provoca enfermedades intraintraestinales que van desde una disentería amebiana, rectocolitis aguda, ameboma y puede complicarse hasta una colitis fulminante, también puede provocar daño en órganos fuera del intestino como el hígado, donde la formación del absceso hepático amebiano puede presentarse como una complicación, esta es la manifestación extraintestinal más común; el parásito también puede migrar a pulmón y cerebro, formando abscesos en esos órganos.

El Sistema Nervioso consta de tres divisiones: Sistema Nervioso Central, Sistema Nervioso Periférico y Sistema Nervioso Autónomo. El Sistema Nervioso Autónomo (SNA) en particular se divide en Simpático y Parasimpático, están constituidos por un complejo conjunto de neuronas y vías nerviosas que se encargan de controlar la función de los sistemas viscerales involuntarios del organismo, por lo tanto, su principal función es mantener la homeostasis y tener la capacidad de respuesta de adaptación ante cambios que se presenten en el medio interno o externo, los neurotransmisores clásicos del SNA son la Acetilcolina y la Norepinefrina.

En este campo, se conoce poco de la interacción que existe entre el huésped y el parásito, sin embargo, existe evidencia que muestra que el SNA juega un papel dentro de la respuesta que tiene el hospedero ya que, algunos experimentos con

animales vagotomizados inoculados con *E. histolytica* por vía intrahepática mostraron aumento del daño hepático ocasionado por el parásito, mientras que animales simpactetomizados mostraron disminución en el daño hepático amebiano.

Por lo tanto, es importante conocer si la interacción de los neurotransmisores del SNA (Norepinefrina y Acetilcolina) influyen en la virulencia de *E. histolytica*, esto, podría ayudarnos a entender porque un porcentaje de la población es más susceptible a esta enfermedad.



## Abstract

The parasite *E. histolytica* causes amoebiasis in humans, worldwide it is estimated that there are around 500 million parasites, causing between 50,000 and 100,000 deaths per year. In Mexico, per year there are approximately 16 million carriers, 1.3 million patients and 10 to 30 thousand deaths caused by *E. histolytica*, therefore this infection represents an important public health problem.

Clinically, *E. histolytica* causes intractable diseases ranging from amoebic dysentery, acute rectocolitis, amoeboma and can be complicated to fulminant colitis, it can also cause damage to organs outside the intestine such as the liver, where the formation of amoebic liver abscess can present as a complication, this is the most common extraintestinal manifestation; the parasite can also migrate to the lung and brain, forming abscesses in those organs

The Nervous System consists of three divisions: Central Nervous System, Peripheral Nervous System and Autonomous Nervous System. The Autonomous Nervous System (ANS) in particular is divided into Sympathetic and Parasympathetic; they are made up of a complex set of neurons and nerve pathways that are responsible for controlling the function of the body's involuntary visceral systems, therefore, its main function is maintain homeostasis and have the capacity to adapt to changes that occur in the internal or external environment, the classic neurotransmitters of the ANS are Acetylcholine and Norepinephrine.

In this field, little is known about the interaction that exists between the host and the parasite, however, there is evidence that shows that the ANS plays a role in the response of the host, since some experiments with vagotomized animals inoculated with *E. histolytica* by the intrahepatic route showed increased liver damage caused by the parasite, while sympathectomized animals showed decreased amoebic liver damage.

Therefore, it is important to know if the interaction of the ANS neurotransmitters (Norepinephrine and Acetylcholine) influence the virulence of *E. histolytica*, this could help us understand why a percentage of the population is more susceptible to this disease.



## Capítulo 1. Introducción

### 1.1 *Entamoeba histolytica*

*Entamoeba histolytica* es un parásito protozooario causante de la parasitosis conocida como **amebiasis**, la cual es una patología que puede presentarse tanto a nivel intestinal como extraintestinal. La **amebiasis** tiene una importancia clínica significativa, ya que, durante la enfermedad se presenta una severa destrucción tisular y, además, por el número de casos reportados anualmente a nivel mundial. Desde el descubrimiento de *E. histolytica* en 1875 por Friedrich Losch, a la actualidad se ha descrito toda la biología del parásito, y es considerado un organismo cosmopolita; es decir que se encuentra prácticamente en cualquier ambiente, siendo los países con clima cálido y húmedo los de mayor incidencia. Otro de los aspectos importantes que influyen en su incidencia es la condición socioeconómica deficiente, la cual, se ve reflejada en una pobre sanidad ambiental y una mala alimentación (Cabello R. 2007).

### 1.2 Epidemiología de la amebiasis

A nivel mundial, la amebiasis está catalogada como una enfermedad tropical de poca importancia (neglected tropical diseases), sin embargo, es la tercera parasitosis causante de muerte, se estima que existen alrededor de 500 millones de personas parasitadas y que anualmente debido a complicaciones hay de 50,000 a 100,000 muertes. En México la tasa de incidencia de la amebiasis intestinal desde 1995 hasta el 2000 fue entre 1,000 y 5,000 por cada 100,000 habitantes, por lo que se encuentra catalogada como una de las veinte principales causas de enfermedad (Ximénez *et al.*, 2011).

En México, la tasa de mortalidad a causa de este parásito ha disminuido en los últimos 40 años, esto se debe a la mejora de los fármacos anti-amebianos, sin

embargo, en un estudio epidemiológico reciente se informó que el 8.41% de la población mexicana ha desarrollado anticuerpos anti-amebianos, lo que indica que existe una alta exposición a este parásito (Ximénez *et al.*, 2011).

El parásito *E. histolytica* puede migrar del intestino a diferentes órganos, por lo que puede llegar al hígado, pulmones o cerebro formando un absceso en alguno de estos órganos, lo más común es que pase al hígado y se forme un absceso llamado absceso hepático amebiano. La tasa de incidencia del absceso hepático amebiano (AHA) en México, entre los años 1995 hasta el 2000, fueron de 10 casos por cada 100,000 habitantes (Ximénez *et al.*, 2011).

El absceso hepático amebiano, se observa principalmente en adultos jóvenes (20 a 50 años), en donde los hombres son más propensos a desarrollar esta enfermedad que las mujeres, en una proporción de una mujer por cada diez o quince hombres (Ximénez *et al.*, 2011).

### **1.3 Ciclo biológico de *E. histolytica***

*E. histolytica* tiene dos estadios de vida: quiste y trofozoíto. El trofozoíto se mueve a través de pseudópodos en la luz del intestino grueso del humano, y mide alrededor de 15 a 60  $\mu\text{m}$ , mientras que el quiste es de forma esférica y puede encontrarse tanto en la luz intestinal donde se genera, como en el medio ambiente donde es excretado durante la defecación por el humano infectado, mide alrededor de 15  $\mu\text{m}$  y se le pueden observar de 1 a 4 núcleos.

La infección se adquiere por la ingestión del quiste maduro (tetranucleado), que es resistente a los jugos gástricos. El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado, del quiste sale una ameba tetranucleada que multiplica sus núcleos para formar una ameba de 8 núcleos, posteriormente ésta se fragmenta en 8 pequeñas amebas, llamadas amébulas metaquísticas, éstas se transforman en los trofozoítos que finalmente se establecen en el colon, donde se alimentan de bacterias y restos

celulares, seguidamente, los trofozoítos pueden enquistarse, que es un proceso aparentemente estimulado por condiciones luminales no ideales para los trofozoítos. Dentro del quiste, continúan el metabolismo y la división nuclear hasta formar los 4 núcleos, después de ser eliminados los quistes con las heces pueden permanecer viables por semanas o meses, dependiendo de las condiciones ambientales. La infección no se transmite por trofozoítos, los que pueden ser excretados durante los períodos de colitis aguda, se desintegran rápidamente fuera del cuerpo, la infección puede producirse con tan sólo un quiste en el agua o alimentos contaminados (figura 1) (Botero, 2012).

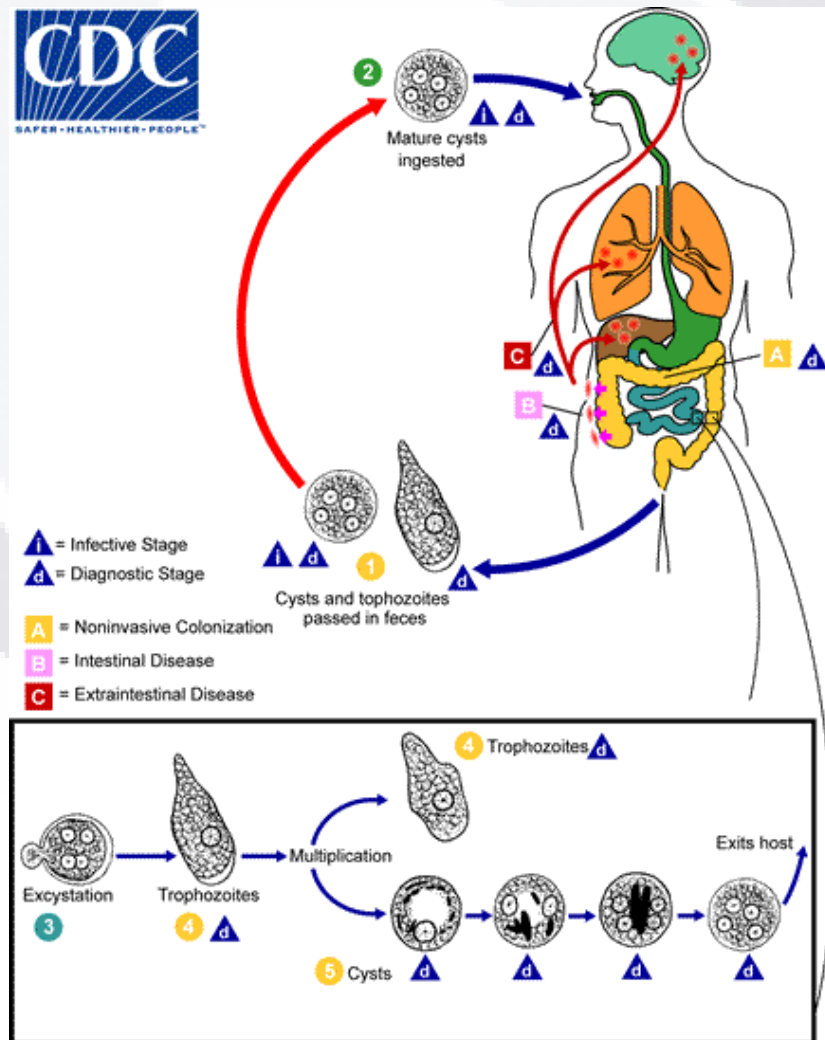


Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. ("CDC - DPDx - Amebiasis," n.d.)

### 1.4 Factores de patogenicidad de *E. histolytica*

El daño que provoca *E. histolytica* se debe principalmente a sus factores de patogenicidad, y de manera asociada, por la acumulación abundante y temprana de neutrófilos, monocitos y macrófagos en los tejidos del huésped (Helk *et al.*, 2013).

El conjunto de factores de patogenicidad que le permiten a *E. histolytica* llevar a cabo el proceso de invasión y destrucción en el tejido intestinal son la capacidad de adhesión, degradación y disrupción de los componentes presentes en el tejido del hospedero. Dentro de estos factores, se encuentran las adhesinas tipo lectinas (figura 2), los amebaporos, las cisteín proteasas, colagenasas, hialuronidasas, neuraminidasas, toxinas y lipofosfoglicanos (Laughlin & Temesvari, 2005).

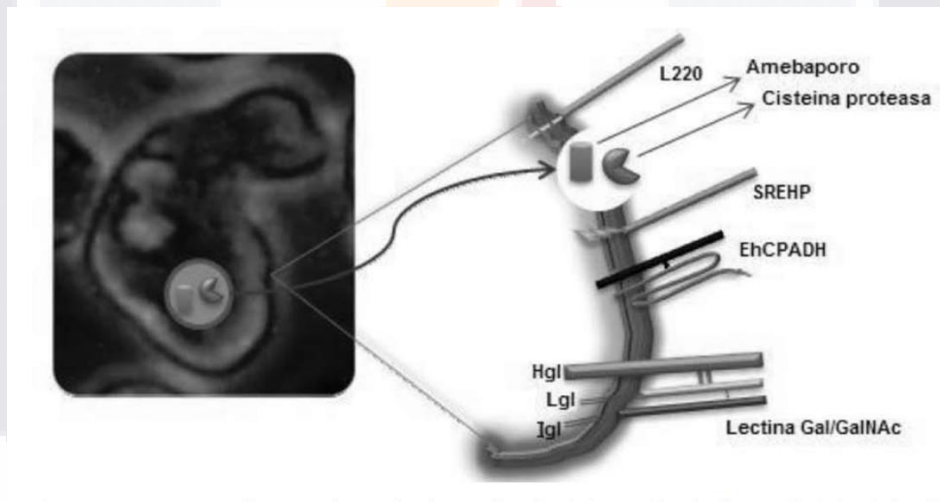


Figura 2

**Figura 2. Proteínas expresadas/secretadas por los trofozoítos de *E. histolytica* consideradas factores de virulencia (Trejos-Suárez & Castaño-Osorio, 2009).**

#### 1.4.1 Adhesinas tipo lectinas

Las moléculas de lectina son importantes en el proceso de adhesión y colonización, enquistamiento e invasión de *E. histolytica*. Las adhesinas tipo lectina tienen



diferentes pesos moleculares: 260kDa, 220kDa, 170kDa, 140kDa y 112kDa que le permiten adherirse a la mucosa intestinal, al tejido hepático, a células sanguíneas y a otros tejidos. Presentan afinidad por azúcares como N-acetil D-galactosamina y N-acetil D-glucosamina, los cuales son azúcares que se encuentran en la membrana de los eritrocitos, células inmunes y de matriz extracelular (Meza, I Torres, H. & Meraz, A, 1994). La lectina de 260KDa conocida como Gal/GalNAc (galactosa-N-acetil-D-galactosamina) actúa principalmente como adhesina y activa a la caspasa 3 humana que lleva a las células blanco a apoptosis (Houston *et al.*, 2003).

#### 1.4.2 Amebaporos

Los amebaporos de *E. histolytica* son proteínas que se encuentran dentro de vesículas citoplasmáticas, están conformadas por 4 hélices alfa, con 3 isoformas denominadas A, B y C, siendo la isoforma C las más activa, ya que produce estructuras tipo canal en las membranas de las células del huésped que ataca, y les permiten el paso de iones, agua y moléculas pequeñas provocando cambios osmóticos celulares que provocan su estallamiento (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 1991).

#### 1.4.3 Cisteín proteasas

Las **cisteín proteasas** son enzimas proteolíticas que son secretadas por *E. histolytica* dentro de su microambiente, y son factores muy importantes de virulencia en la patogénesis (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 1991; Vieira, 2004). Las **cisteín proteasas** son enzimas con capacidad para digerir constituyentes de la matriz extracelular, tales como la fibronectina, laminina, colágeno tipo I y IV, separando las células para que se lleve a cabo la invasión (Gómez *et al.*, 2007). Existen al menos 50 cisteín proteasas, sin embargo, solo EhCP2, EhCP1 y EhCP5 son responsables de aproximadamente el 90% de la actividad proteasa de este parásito, donde la de mayor importancia es la EhCP5 (Casados-Vásquez *et al.*,

2010). En general estas enzimas, 1) rompen la capa de mucina en su dominio carboxiterminal, 2) degradan directamente la IgA y realizan la disrupción de IgG, 3) confieren resistencia a la lisis mediada por el complemento, interrumpiendo la amplificación de la respuesta inmune a través de la degradación de las anafilotoxinas C3a, C5a (Que, X & Reed, S, 2000).

#### **1.4.4 Otras enzimas y complejos patogénicos de *E. histolytica***

Las colagenasas, hialuronidasas y neuraminidasas son enzimas encargadas de digerir matriz extracelular en procesos invasivos. Lipofosfogluanos y lipopeptidofosfogluanos, son complejos de macromoléculas encontradas en la superficie de los trofozoítos, tienen la capacidad de interactuar con células dendríticas y macrófagos permitiendo activar la respuesta inmune del huésped (Vivanco-cid *et al.*, 2007).

#### **1.4.5 Fagocitosis**

*E. histolytica* lleva a cabo la fagocitosis, este proceso activo es considerado como un indicador de virulencia (eritrofagocitosis). Durante este proceso se ve involucrado la polimerización de la actina amebiana, participando también un gran número de proteínas, contribuyendo así al daño amebiano que realiza en el tejido. La ingestión de células inmunes del huésped por medio de la fagocitosis, podría limitar la respuesta inflamatoria y permitir que este parásito establezca una infección persistente (Huston *et al.*, 2003).

A continuación, se describen las principales funciones que tiene las proteínas secretadas/excretadas por los trofozoítos de *E. histolytica* que son consideradas como factores de virulencia.

**Tabla 1. Principales funciones de las proteínas secretadas/excretadas por los trofozoítos de *E. histolytica* (Castaño-Osorio, 2009).**

MOLECULAS DE ADHESIÓN	PROTEÍNAS FORMADORAS DE POROS	ENZIMAS DE PROTEOLÍTICAS
<p><b>Lectinas Gal/GalNAc</b> Unión al epitelio intestinal. Efectos de citólisis y citotoxicidad. Inhibición del complejo ataque a membrana.</p> <p><b>EhADH112 (Complejo EhCPADH)</b> Unión a células diana. Fagosina.</p> <p><b>Proteínas de membrana L220</b> Lectina. Aglutinina → Eritrofagocitosis. Regulador de la proliferación de LT.</p> <p><b>Proteína rica en serina (SREHP)</b> Unión al epitelio intestinal. Potente inmunógeno.</p>	<p><b>Amebaporos A, B y C</b> Proteínas formadoras de poro. Asesina las bacterias fagocitadas por el trofozoíto. Induce la necrosis de células epiteliales y leucocitos.</p> <p><b>Hemolisina III</b> Lisis de células del hospedero.</p> <p><b>Fosfolipasa A</b> Lisis de leucocitos.</p>	<p><b>Cisteínas proteasas</b> Degradación de IgA e IgG. Degradación de la proteína precursora pro-IL-18. Degradación del C3a y C5a. Actividad ICE → Inducción de la apoptosis.</p>

## 1.5 Patología

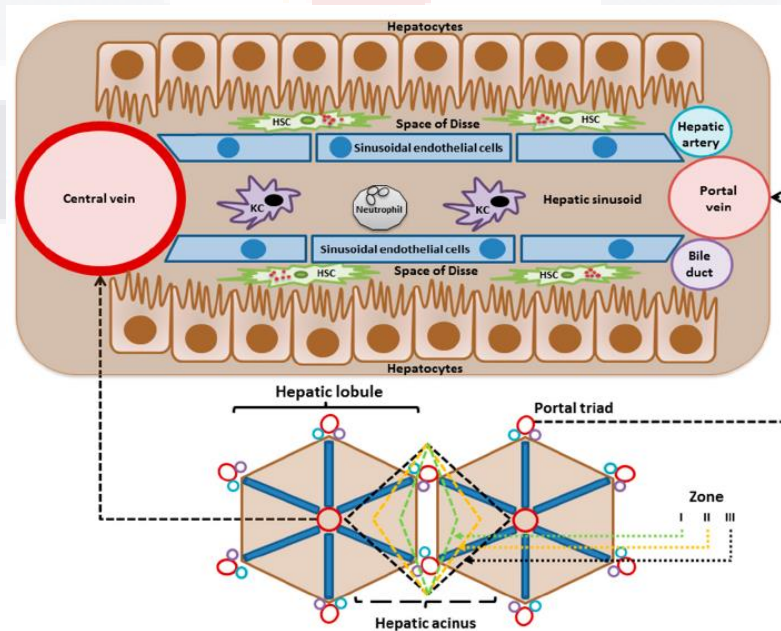
Se pueden clasificar a los pacientes con amebiasis en dos grupos, con base a sus manifestaciones clínicas como: asintomáticos o portadores (corresponde al 90% de los casos) o sintomáticos (10%). Tanto pacientes asintomáticos como sintomáticos tienen afecciones a nivel intestinal, donde existe destrucción de la mucosa intestinal provocando ruptura de vasos sanguíneos y células calciformes, dando como resultado diarrea sanguinolenta con moco, que puede ir desde una disentería amebiana, hasta llegar a una colitis fulminante, pasando por una recto colitis aguda o la formación de un ameboma y afecciones extraintestinales como es la formación del absceso hepático amebiano, absceso cerebral o enfermedad genitourinaria y cutánea. Alrededor del 1% de las personas infectadas pueden desarrollar patologías potencialmente fatales como colitis amebiana fulminante o absceso hepático amebiano (Haque *et al.*, 2003); (Pinilla, López, & Viasus, 2008).

## 1.6 Absceso hepático amebiano (AHA)

*E. histolytica* migra principalmente al hígado a través de la vena porta (Salles et al., 2003). El hígado es el principal sitio de biotransformación de xenobióticos, es un órgano grande sólido y altamente vascularizado con funciones de suma importancia, como mantener la homeostasis metabólica, la desintoxicación, etc. (Duarte et al., 2015). El hígado también tiene la capacidad de sintetizar y degradar moléculas, como son carbohidratos, lípidos, aminoácidos, ácidos biliares y xenobióticos. Así como, de secretar diferentes hormonas como las somatomedinas, el angiotensinógeno y la trombopoyetina, y como función exocrina la secreción de bilis (Si-Tayeb et al., 2010). El parénquima hepático se encuentra organizado en lóbulos, que se conforman de unidades funcionales (células epiteliales) llamadas hepatocitos y células no funcionales donde se incluyen a las células endoteliales sinusoidales, células de Kupffer, células estrelladas, colangiocitos y células inmunes. Anatómicamente, la arquitectura del hígado se conforma de la triada portal (conducto biliar, arteria hepática y vena porta), la vena central y los sinusoides

hepáticos, estos últimos se encuentran formados por células endoteliales que tienen fenestraciones y están separadas de los hepatocitos por el espacio de Disse, en este lugar se localizan las células estrelladas (figura 3) (González-Ponce *et al.*, 2018).

Cuando el parásito *E. histolytica* llega al hígado, se forma el absceso hepático amebiano (AHA), que macroscópicamente, es un área que se encuentra bien definida, ya que el parénquima hepático es reemplazado completamente por material necrótico de color amarillento y consistencia cremosa. El absceso puede llegar a reemplazar hasta un 90% del hígado, éste se encuentra preferentemente en el lóbulo derecho, y a nivel microscópico se observan pocos leucocitos polimorfonucleares. La lesión se compone de material necrótico que generalmente se encuentran en la periferia. La separación entre el absceso y el parénquima no afectado no es evidente en el microscopio, también, se presenta fibrosis entre las placas de células hepáticas adyacentes, que son delgadas y desorganizadas cerca de la lesión, aunque los abscesos pueden ser muy grandes, donde seguramente se involucran grandes vasos sanguíneos, no se observa hemorragia (Muriel Pablo, 2017).



**Figura 3. . Estructura y células del hígado (González-Ponce *et al.*, 2018).**

## 1.7 Sistema Nervioso Autónomo

El Sistema Nervioso Periférico (SNP) comprende los nervios craneales y espinales y se encuentra dividido en Sistema Nervioso Somático (SNS), Sistema Nervioso Autónomo (SNA) y Sistema Nervioso Entérico (SNE). El SNS comprende neuronas motoras y sensitivas. Las neuronas sensitivas transportan información aferente de receptores de los sentidos (visión, audición, gusto, olfato, equilibrio, etc.) y de receptores de los sentidos somáticos (dolor, temperatura, tacto y sensaciones propioceptivas). Todas estas sensaciones son percibidas normalmente de manera consciente. A su vez, los axones de las motoneuronas somáticas se extienden desde el SNC y establecen sinapsis de manera directa con el órgano efector (músculo esquelético), por lo tanto, es una inervación voluntaria (Tortora, 2006).

El SNA se divide en Simpático y Parasimpático. El SNA controla las funciones de diversos órganos y tejidos, como el músculo cardíaco, el músculo liso y las glándulas exócrinas. El SNA se conforma de neuronas conectoras y eferentes. Los estímulos aferentes inician en los receptores viscerales y viajan a través de vías aferentes hasta que llegan al Sistema Nervioso Central (SNC), donde se integran mediante neuronas conectoras a diferentes niveles, después salen a través de vías eferentes para viajar hasta los órganos efectores viscerales. Las vías eferentes del SNA se conforman por neuronas preganglionares y posganglionares (Snell, R. 2006).

El Sistema Nervioso Simpático (SN simpático) se relaciona con los estados de alerta y la acción del organismo y ejerce una acción reguladora en los procesos inflamatorios. Su principal neurotransmisor es la noradrenalina, se distribuye ampliamente en todo el cuerpo inervando el corazón, los pulmones, el músculo de las paredes de muchos vasos sanguíneos, los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas y muchas vísceras abdominopelvianas. El SN simpático mantiene al organismo en estado de alerta para una emergencia. El Sistema Nervioso Parasimpático (SN parasimpático) está dirigido a conservar y restablecer la energía

(Snell, R. 2006) y su principal neurotransmisor es la Acetilcolina. La Acetilcolina excita a las neuronas posganglionares en los ganglios simpáticos y parasimpáticos y la mayoría de las terminaciones posganglionares simpáticas liberan noradrenalina como neurotransmisor (Snell, R. 2006).

## **1.8 Neurotransmisores**

### **1.8.1 Acetilcolina**

La Acetilcolina se comporta como un neurotransmisor excitatorio en ciertas sinapsis, como en la placa neuromuscular, donde actúa directamente mediante apertura de canales iónicos regulados por ligandos. También, puede ser un neurotransmisor inhibitorio en otras sinapsis, donde su efecto sobre los canales iónicos es ejercido indirectamente a través de receptores unidos a proteínas G (Furness *et al.*, 2014).

La síntesis de Acetilcolina se produce en el interior de las neuronas, mediante la unión de ácido acético o acetil-CoA y colina gracias a la enzima colinacetiltransferasa. La Acetilcolina es enviada a lo largo del axón hasta el botón terminal, donde será almacenada hasta su utilización y liberación en el espacio sináptico (Furness *et al.*, 2014).

La Acetilcolina es un neurotransmisor cuya señalización no se encuentra solamente en las neuronas colinérgicas ya que se ha detectado fuera del sistema nervioso central y periférico como en células de la respuesta inmune, células pancreáticas, queratinocitos, epitelio intestinal (Furness *et al.*, 2014).

### **1.8.2 Noradrenalina**

La noradrenalina es una catecolamina, la cual es secretada principalmente en el SNC y en las neuronas posganglionares del SN Simpático. Es sintetizada a partir del aminoácido fenilalanina, el cual por acción de la fenilalanina hidroxilasa y el

cofactor pteridina es convertido en tirosina, que por acción de la tirosina hidroxilasa y la presencia del ion ferroso, oxígeno y del cofactor tetrahidropteridina, es transformada en dopa. La dopa sufre pérdida de un átomo de carbono, por acción de la dopa decarboxilasa y es transformada en dopamina, que por acción de la dopamina beta hidroxilasa en presencia de cobre, oxígeno y fosfato ascórbico es convertida en la noradrenalina (Vargas, 2000)

La noradrenalina es liberada partir de las terminaciones nerviosas simpáticas, estimula la contracción del corazón, músculos lisos y músculos dilatadores del iris (Ikeda, Jeon, Cowell, & Remage-Healey, 2015)

La noradrenalina está relacionada con la actividad del circuito neural, a través de acciones específicas en las subclases de receptores adrenérgicos (AR). En mamíferos mejora el procesamiento auditivo de tonos (Ikeda *et al.*, 2015)

## **1.9 Receptores**

### **1.9.1 Receptores alfa y beta adrenérgicos**

La noradrenalina (NA) es sintetizada y almacenada no solamente en la médula adrenal, además también lo es en los nervios simpáticos periféricos. La noradrenalina se une a los receptores de membrana de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) en las células diana, donde modulan las respuestas fisiológicas como el metabolismo, la vasoconstricción, la vasodilatación y la proliferación. Estos complejos de señalización están compuestos de quinasas, fosfatasa y proteínas que modulan el comportamiento fisiológico del receptor. La manipulación de cada interacción ligando-receptor del complejo de señalización adrenérgica surge como una estrategia terapéutica prometedora para el diseño de fármacos que modulan la acción adrenérgica y ayuda a definir su significado fisiopatológico (Glisbach, 2008).



Hay dos tipos de receptores adrenérgicos:  $\alpha$ -adrenérgicos,  $\beta$ -adrenérgicos; cada uno de ellos cuenta con subtipos de receptores ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ). Con ello, nos permite entender las respuestas fisiológicas a las catecolaminas endógenas como a la administración de catecolaminas exógenas (Quiroz, 2002).

Los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos tienen una mayor afinidad por adrenalina que por noradrenalina y estos se dividen en receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ . Los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  fueron inicialmente caracterizados como receptores presinápticos que servían como una retroalimentación negativa que regulaba la liberación de noradrenalina. Sin embargo, también están implicados en funciones postsinápticas y juegan un rol en la homeostasis de la presión sanguínea (Moreira, 2016)

El mecanismo de acción de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos está relacionado con el sistema de la adenilato ciclasa, cuya estimulación aumenta los niveles de AMPc. La estimulación del receptor  $\beta_1$ -adrenérgico produce efectos metabotrópicos e inotrópicos positivos en el sistema cardíaco, aumenta la secreción de renina en el riñón y la lipólisis en adipocitos. El receptor  $\beta_2$  produce la relajación de los bronquios y del músculo liso uterino, la estimulación causa broncodilatación, vasodilatación en el músculo esquelético, glucogenolisis, y aumenta la liberación de NA de las terminales nerviosas simpáticas. El receptor  $\beta_3$  regula el gasto de energía y es el principal receptor involucrado en la lipólisis (Glishbach, 2008).

### **1.9.2 Receptores muscarínicos y nicotínicos**

La sustancia química que reduce la frecuencia cardíaca fue descrita por primera vez por el farmacólogo Otto Loewi en 1921, e identificada más tarde como Acetilcolina (ACh) por Henry Dale. Mas adelante, se demostró que ACh desempeña muchas funciones esenciales: a) la transmisión química en la unión neuromuscular; b) la función autónoma en el sistema nervioso periférico, y c) los procesos cognitivos cerebrales como la atención, el aprendizaje y memoria. La ACh se sintetiza a partir de colina y acetil-CoA por medio de la enzima colina acetiltransferasa en neuronas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y en células no neuronales, se libera localmente. La ACh es metabolizada por la acetilcolinesterasa, es abundante en la hendidura sináptica y en la unión neuromuscular, después de su liberación de las neuronas presinápticas. La ACh ejerce sus efectos al unirse a dos clases diferentes de receptores: (1) muscarínicos acoplados a proteína G (mAChR), activando la fosfolipasa C y posteriormente movilizando el calcio intracelular, presentes tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, y (2) nicotínicos que son proteínas membranales que actúan como canales iónicos activados por ligandos receptores (nAChR), que funcionan en los sistemas nerviosos periférico y central, en las neuronas de los ganglios parasimpáticos, en la unión neuromuscular, así como en las células no neuronales (Bertrand and Wallace, 2020).

La Acetilcolina (ACh) tiene un papel crucial en los sistemas nerviosos central y periférico. La enzima colina acetiltransferasa (ChAT) es responsable de sintetizar ACh a partir de acetil-CoA y colina en el citoplasma y el transportador vesicular de Acetilcolina (VACHT) capta el neurotransmisor en vesículas sinápticas. Después de la despolarización, la ACh sufre exocitosis que llega a la hendidura sináptica, donde puede unirse a sus receptores, incluidos los muscarínicos y nicotínicos. La ACh presente en la hendidura sináptica es rápidamente hidrolizada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE), formando acetato y colina, que se reciclan en la terminal nerviosa presináptica por el transportador de colina de alta afinidad (CHT1) (Ferrerira, *et al.*, 2016).

Los receptores ionotrópicos o nicotínicos por si mismos constituyen un canal iónico donde su activación permite un flujo selectivo de iones al interior de la célula, modificando la potencia del reposo de la neurona. El grado de despolarización o hiperpolarización de la membrana celular determina la generación o no de la señal propagada y, por tanto, de la transmisión de la información. Los receptores ionotrópicos pertenecen a la superfamilia de canales iónicos que incluye: receptores de glutamato (NDMA, Kainato, AMPA), receptores purinérgicos de ATP (P2x) y miembros de la subfamilia de receptores de tipo *cys-loop* (CL) que comprende

receptores: nicotínicos de Acetilcolina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, glicina, serotonina y de zinc.

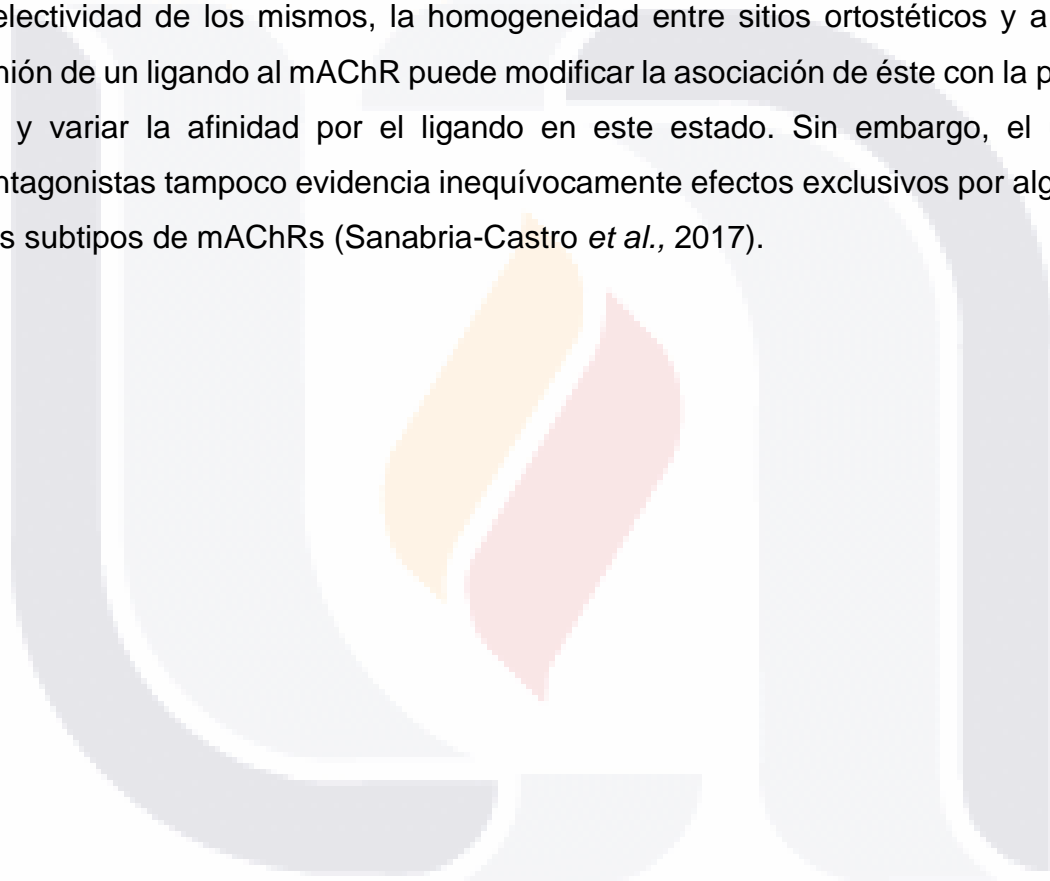
La distribución cerebral de los receptores nicotínicos es relativamente homogénea y no se restringe a determinadas vías. Sin embargo, es más densa en algunas regiones como el tálamo, la corteza y los ganglios basales. Su ubicación puede ser presináptica, postsináptica o perisináptica y, en comparación con los receptores muscarínicos de Acetilcolina, presenta una menor densidad cerebral. Los receptores nicotínicos presinápticos funcionan como autoreceptores: modulando la liberación de neurotransmisores, entre ellos, la ACh. Mientras que los receptores postsinápticos median procesos de transmisión sináptica excitatoria (Albuquerque, 2009).

Los receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs) se encuentran asociados a una proteína con acción enzimática (GTPasa) y se les conoce como receptores acoplados a nucleótidos de guanina o receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ ARs) y los mAChRs forman parte de este tipo de receptores y son los que se encuentran mejor caracterizados estructuralmente (Sanabria-Castro *et al.*, 2017).

Los receptores muscarínicos de Acetilcolina pertenecen a los GPCRs, se localizan principalmente en la membrana plasmática de células de músculo liso, músculo cardíaco, a nivel cerebral y de ciertas glándulas. Estos receptores se activan por muscarina y son antagonizados por atropina, y también es frecuente la existencia de zonas ajenas tanto a los sitios ortostéricos como alostéricos altamente conservadas como la presencia de residuos de prolina (P) en el segmento TM4 (Spalding *et al.*, 2006). Se han descrito cinco subtipos distintos de receptores muscarínicos (M1 – M5) que median la mayoría de las acciones de la Acetilcolina tanto a nivel central como periférico. Esta clasificación toma en cuenta: la respuesta a diferentes ligandos, tipo de proteína G con que se acopla el receptor y la naturaleza de los segundos mensajeros generados. Los subtipos M1, M3 y M5 de

los mAChRs se acoplan principalmente a proteínas G del tipo Gq, mientras que los subtipos M2 y M4 se acoplan principalmente al tipo Gi/o. La clasificación en subtipos de los mAChRs, se fundamenta en la utilización de antagonistas selectivos, debido a la existencia de una mayor correlación entre el antagonista y el subtipo de mAChR, que con respecto a los agonistas.

El uso de agonistas selectivos presenta dificultades, debido a la escasa selectividad de los mismos, la homogeneidad entre sitios ortostéticos y a que la unión de un ligando al mAChR puede modificar la asociación de éste con la proteína G y variar la afinidad por el ligando en este estado. Sin embargo, el uso de antagonistas tampoco evidencia inequívocamente efectos exclusivos por alguno de los subtipos de mAChRs (Sanabria-Castro *et al.*, 2017).



## Capítulo 2. Antecedentes

La amebiasis es un problema de salud pública a nivel mundial que es causada por el parásito *E. histolytica*, este parásito tiene un gran potencial para invadir y destruir tejidos especialmente el intestino y el hígado (Muñoz-Ortega *et al.*, 2011). Sin embargo, de los pacientes que adquieren este parásito solo el 10% desarrollan una amebiasis invasiva, un determinante que puede llegar a ser que la ameba tenga ese comportamiento es que puede llegar a tener la capacidad de adaptarse al microambiente a nivel intestinal que después le permita invadir otros órganos y formar abscesos como el absceso hepático.

Ya se ha observado que cuando existen niveles elevados de Acetilcolina, histamina, serotonina y cortisol, encontraron un aumento en las lesiones provocadas por la disentería amebiana en hámster, por lo tanto, puede existir una relación entre estos dos fenómenos (Denaro, 1984). Por ejemplo: en un experimento que se realizó en ratas albinas de la cepa Charles-foster, observaron un incremento en el grado de virulencia de *E. histolytica*, después de la administración de Acetilcolina e histamina (Kulkarni & Sen, 1986). Del mismo modo, en la administración de serotonina o su precursor de L-triptófano en un modelo de hámster con amebiasis, se observó un incremento en la patogénesis de varias cepas de *E. histolytica* (Acharya *et al.*, 1989). Por otro lado, en un estudio clínico que se realizó en pacientes que fueron diagnosticados con amebiasis intestinal, se presentó una disminución de Acetilcolina, histamina, serotonina, acetilcolinesterasa, histaminasas y cortisol (Banu *et al.*, 2005).

Es bien conocido que el organismo de un huésped, en este caso el humano, puede generar diversas respuestas para superar la infección y prevenir la propagación, un ejemplo de esto es que cada vez se reconoce más que para facilitar la eliminación de patógenos, el sistema inmunológico también se comunica con el sistema nervioso para mejorar la respuesta inmunológica local (Jonge W. J. 2013).

Existen dos estudios que relacionan al Sistema Nervioso Autónomo y la amebiasis. En uno de ellos se observó que una vagotomía puede ser responsable del aumento en la producción de citocinas pro inflamatorias, ya que se mostró un aumento de IL1, IL6 y TNF-alfa y esto puede ser el posible responsable que en el desarrollo del absceso hepático se viera acompañado de más granulomas, fibras de colágeno y mayor infiltrado inflamatorio, a lo que concluyeron que el nervio vago desempeña un papel importante en la regulación de la inflamación durante la formación del absceso hepático amebiano (Muñoz-Ortega *et al.*, 2011). Por otro lado, al realizar una simpatectomía química, observaron una disminución en el tamaño del absceso hepático, ya que se redujo el depósito de colágeno y se promovió un estado anti-inflamatorio durante el desarrollo del absceso hepático, por lo tanto, la amiba *E. histolytica* disminuye su viabilidad (Muñoz Ortega *et al.*, 2015; Ávila Blanco *et al.*, 2015).

Se puede suponer que el bloqueo de los receptores alfa y beta, así como la denervación química dan lugar a la predominancia o potenciación de la SN Simpático, lo que induce un efecto antioxidante y antiinflamatorio que protege del daño hepático por *E. histolytica* (Aldaba-Muruato *et al.*, 2017).

### Capítulo 3. Justificación

*Entamoeba histolytica* provoca amebiasis, considerada la cuarta causa de muerte por parasitosis a nivel mundial. En México, la amebiasis está catalogada como una de las veinte principales causas de enfermedad. Donde se han determinado que hay aproximadamente entre 1000 a 5000 casos por cada 100,000 habitantes de amebiasis intestinal, en el caso de absceso hepático amebiano se ha determinado que hay 39 casos por cada 100,000 habitantes.

En la actualidad se conocen algunos aspectos que suceden durante la relación Huésped-Parásito, que provoca una mayor o menor susceptibilidad de la amebiasis, sin embargo, algunos autores reportan que quizá esta predisposición o susceptibilidad pueda estar dada por factores humorales presentes en el hospedero, los cuales pueden implicar la presencia de moléculas del sistema inmunológico y también la presencia de neurotransmisores del Sistema Nervioso Autónomo como la Norepinefrina y Acetilcolina, las cuales juegan un papel importante en la regulación inmune celular mediante la neuroinmunomodulación, pero hasta el momento se desconoce los efectos que tienen éstos sobre la virulencia de *E. histolytica*, por lo que en este trabajo se pretende conocer si estos neurotransmisores modifican el grado de virulencia de *E. histolytica*.

## Capítulo 4. Hipótesis

La virulencia de la *E. histolytica* puede ser modulada por los neurotransmisores Norepinefrina y Acetilcolina.



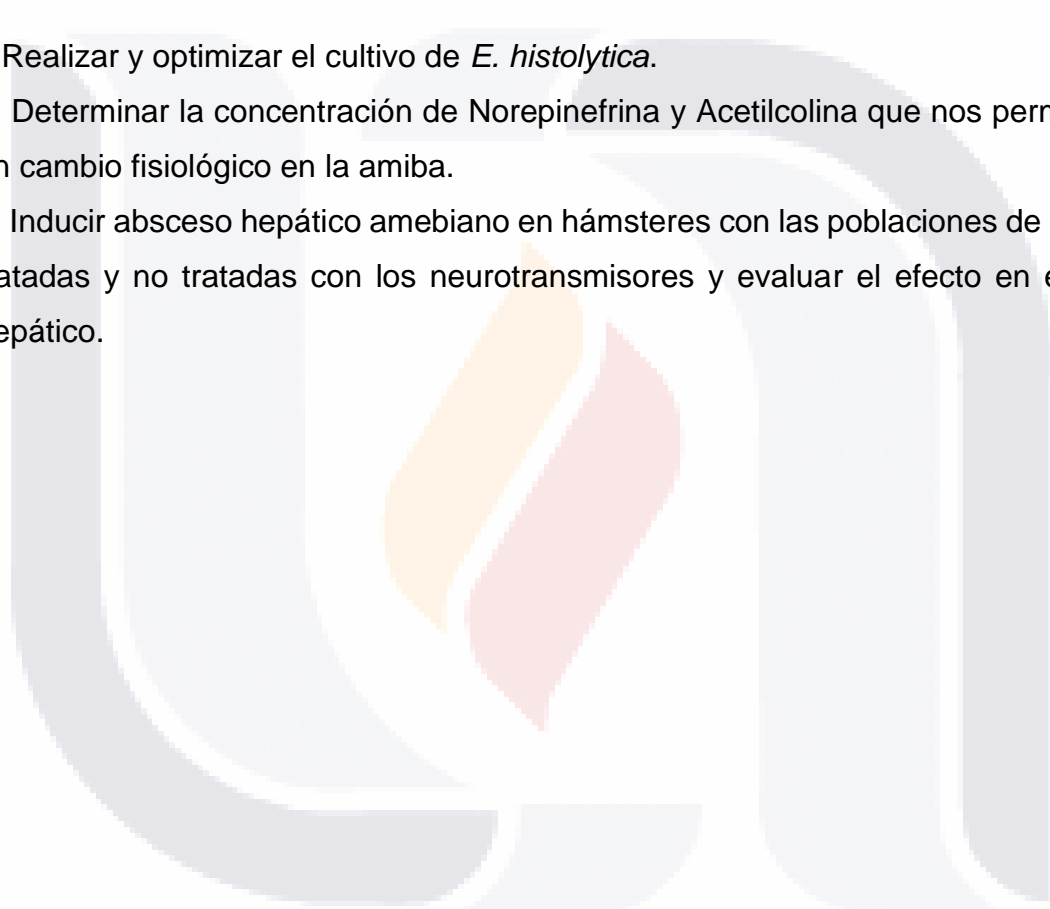


## Capítulo 5. Objetivo general

Estudiar los efectos tóxicos de los neurotransmisores Norepinefrina y Acetilcolina sobre la virulencia de *E. histolytica*.

### 5.1 Objetivos particulares

1. Realizar y optimizar el cultivo de *E. histolytica*.
2. Determinar la concentración de Norepinefrina y Acetilcolina que nos permita ver un cambio fisiológico en la amiba.
3. Inducir absceso hepático amebiano en hámsteres con las poblaciones de amibas tratadas y no tratadas con los neurotransmisores y evaluar el efecto en el daño hepático.



## Capítulo 6. Material y métodos

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

Trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM-1: IMSS se cultivaron en medio axénico TYI-S-33 según fórmula de Diamond LS (1961).

### 6.2 Tratamiento de trofozoítos de *E. histolytica* con neurotransmisores

$5 \times 10^5$  trofozoítos de *E. histolytica* fueron tratados a concentraciones de  $1 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-12}$  M, de Acetilcolina y Norepinefrina de forma individual durante 1 hora, una vez terminada esta incubación los trofozoítos fueron lavados 3 veces con PBS (1X) estéril.

**Tabla 2. Tratamiento de los trofozoítos de *E. histolytica* con los neurotransmisores**

Neurotransmisor	Acción	Concentración (M)	Tiempo
Norepinefrina	$\alpha$ y $\beta$ adrenérgicos	$[1 \times 10^{-4}]$ , $[1 \times 10^{-6}]$ , $[1 \times 10^{-8}]$ , $[1 \times 10^{-10}]$ y $[1 \times 10^{-12}]$	60 min
Acetilcolina	Muscarínicos	$[1 \times 10^{-4}]$ , $[1 \times 10^{-6}]$ , $[1 \times 10^{-8}]$ , $[1 \times 10^{-10}]$ y $[1 \times 10^{-12}]$	60 min

### 6.3 Ensayo de viabilidad

Los trofozoítos de *E. histolytica* fueron tratados con las diferentes concentraciones de neurotransmisores (ver apartado 8.2) y el grupo control utilizado para este ensayo, fueron trofozoítos tratados con una solución de peróxido de hidrógeno al 30%. En tubos eppendorf se colocaron los trofozoítos (500,000) que fueron estimulados y trofozoítos control a un volumen de 100  $\mu$ l, a cada uno se le agregó

100  $\mu$ l del colorante Sytox™ Green Nucleic Acid Stain, a una dilución 1:30,000, se mezcló y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad, después se realizaron 3 lavados con PBS-1X estéril, se centrifugaron para finalmente ser fijados con paraformaldehído al 2%.

Para cuantificar los trofozoítos se tomaron fotos con un microscopio Axioscop 40/40 hasta contar 100 trofozoítos de esos 100 se contaron los que estaban muertos con la ayuda del colorante Sytox™ Green Nucleic Acid Stain ya que estos presentaron una coloración verde fluorescente.

#### **6.4 Extracción de ARN**

Para el análisis de expresión de factores de virulencia de *E. histolytica*, se llevó a cabo la extracción total de ARN de trofozoítos estimulados con y sin Norepinefrina a concentraciones de  $1 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-12}$  M, utilizando el RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el ARN se cuantificó y se evaluó la pureza en el BioDrop  $\mu$ LITE (Isogen Life Science), en un rango de 260-280 nm. El índice de pureza de las muestras de ARN fue entre de 1.8 a 2.0. Luego fue almacenado a  $-80^{\circ}$  C hasta su uso. Finalmente, para evaluar la integridad de la muestra se corrieron en geles de agarosa al 1.5% en buffer de boratos. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 1 hora, para luego teñir en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 5  $\mu$ g/ml por 10 minutos, luego las bandas de ARN fueron visualizaron en un transiluminador de luz UV.

##### **6.4.1 Síntesis de ADN complementario (ADNc)**

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 1  $\mu$ g de ARN total en un volumen de reacción de 10  $\mu$ l, a lo que se le agregará 2  $\mu$ l de buffer 5x para la

RetroTranscriptasa, 0.5  $\mu$ l 10mM de la mezcla de dNTP 50 U MMLV transcriptasa reversa y 1  $\mu$ l de 10 mM OligodT. La mezcla de reacción se incubó durante 60 minutos a 42 °C en un termociclador con un ciclo final de 90 °C durante 5 minutos.

#### **6.4.2 PCR tiempo real (qPCR)**

El cDNA obtenido se utilizó para cuantificar la expresión relativa del RNAm para los siguientes genes: lectina 170kDa, ameboporos, CP-2 y CP-5. Los niveles de expresión relativa fueron normalizados con el de tubulina como control endógeno, así como para determinar la expresión relativa de los genes de interés.

Se realizaron mezclas en placas de 48 pocillos para qPCR (Applied Biosystems), qPCR GreenMaster con UNG (Jena Bioscience) y los oligos correspondientes para cada mensajero en dilución 1:20 (10ng) (StepOne Real-Time PCR System). Los niveles de expresión relativa se normalizaron contra tubulina como un gen interno y las diferencias se determinaron usando el método relativo de  $\Delta\Delta C_t$ .

#### **6.5 Tratamiento de trofozoítos de *E. histolytica* pre-inoculación por vía intrahepática.**

Para el estudio *in vivo* del efecto de Norepinefrina y Acetilcolina sobre la virulencia de *E. histolytica* se utilizó el modelo experimental de amebiasis hepática en hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*). Para ello, los trofozoítos de *E. histolytica* fueron expuestos previamente a las diferentes concentraciones de los neurotransmisores, así mismo se expusieron a Carvedilol y Atropina, los cuales, son antagonistas de los neurotransmisores antes mencionados con la finalidad de inhibir el efecto que llegará a tener el neurotransmisor sobre la amiba.

**Tabla 3. Tratamiento de los trofozoítos de *E. histolytica* con los neurotransmisores y antagonistas.**

<b>Neurotransmisor</b>	<b>Concentración (M)</b>	<b>Tiempo</b>
Norepinefrina	[1X10 <sup>-12</sup> ]	60 min
Acetilcolina	[1X10 <sup>-6</sup> ]	60 min
<b>Antagonista</b>		
Carvedilol	[1X10 <sup>-12</sup> ]	60 min
Atropina	[1X10 <sup>-6</sup> ]	60 min

## **6.6 Modelo de absceso hepático amebiano**

Para el estudio *in vivo* del efecto de Norepinefrina y Acetilcolina sobre la virulencia de *E. histolytica* se utilizó el modelo experimental de amebiasis hepática en hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*).

### **6.6.1 Animales de experimentación**

Se utilizaron hámsteres machos dorados (*Mesocricetus auratus*) de 130 – 170 gr. Los animales fueron mantenidos con ciclos de luz/oscuridad (12 h:12 h), la dieta consistió en nutricubos y agua *ad libitum*. Los animales fueron tratados de acuerdo con las reglas de la Comisión de bioética de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, acorde con la guía NHI para la investigación con animales (Guía para el cuidado y uso de animales del laboratorio).

Los hámsteres se asignaron de forma aleatoria en 6 grupos de 5 hámsteres cada uno, quedando de la siguiente manera:

**Tabla 4. Grupos para inducción del absceso hepático.**

Grupo	Descripción
SHAM	Inoculados de manera intrahepática, con medio Diamond.
AHA	Inoculados de manera intrahepática, con $5 \times 10^5$ trofozoítos.
Norepinefrina	Inoculados de manera intrahepática, con $5 \times 10^5$ trofozoítos previamente tratados con Norepinefrina $1 \times 10^{-12}$ M durante 1 hora a $37^\circ\text{C}$
Acetilcolina	Inoculados de manera intrahepática, con $5 \times 10^5$ trofozoítos previamente tratados con Acetilcolina $1 \times 10^{-6}$ M durante 1 hora a $37^\circ\text{C}$ .
Carvedilol + Norepinefrina	Inoculados de manera intrahepática, con $5 \times 10^5$ trofozoítos previamente tratados durante una hora con Carvedilol $1 \times 10^{-12}$ M y posteriormente con Norepinefrina $1 \times 10^{-12}$ M durante una hora.
Atropina + Acetilcolina	Inoculados de manera intrahepática, con $5 \times 10^5$ trofozoítos previamente tratados durante una hora con Atropina $1 \times 10^{-6}$ M y posteriormente con Acetilcolina $1 \times 10^{-8}$ M durante una hora.

Los hámsteres fueron anestesiados con pentobarbital sódico (0,63 g/ml/kg de peso corporal) de forma intraperitoneal. Posteriormente fueron sacrificados a las 96 h postoperatorias con una sobredosis de pentobarbital, posteriormente se llevó a cabo

la obtención de los hígados de los animales inoculados. Las muestras de hígado de todos los grupos fueron fijadas en PFA al 4% e incluidas en parafina para su posterior análisis morfológico, además una parte de las muestras fueron almacenadas a -20°C para análisis de proteínas.

## **6.7 Procesamiento de tejido hepático**

Las muestras de hígado fueron deshidratadas e incluidas en parafina utilizando el Histoquinet Thermo Scientific Microm modelo STP 120, posteriormente se realizaron los bloques de parafina y los cortes de 5 µm de espesor con un micrótopo de rotación (Leica RM 2125RT).

### **6.7.1 Tinción de Hematoxilina y Eosina**

Para observar el daño en la morfología del tejido hepático se realizó la tinción H-E de los tejidos mediante la metodología según Luna (1968), con algunas modificaciones. Los cortes de tejido fueron hidratados para su tinción con hematoxilina y eosina, una vez que los tejidos fueron teñidos se montaron con entellan y posteriormente se observaron con el microscopio Axioscop 40/40 con los objetivos 2.5X, 10X, 20X y 40X.

## **6.10 Inmunodetección de proteínas: Western-blot**

El Western blot es una técnica que ha estado en práctica durante más de tres décadas que comenzó como un medio para detectar una proteína diana en una muestra compleja ( Sean C Taylor, 2014). En nuestro caso la técnica Western blot se realizó para la detección de apoptosis celular a través de la identificación de la proteína Caspasa 3.

### **6.10.1 Extracción de proteínas**

Las muestras de tejido almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  fueron amaceradas con una solución de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, N-etilmaleimida 5 mM, yodoacetamida 3 mM, fluoruro de fenilmetanosulfonilo 1 mM y Tosil-L-lisina clorometilcetona 3 mM) manteniéndolas en hielo, después se centrifugaron 10,000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se recuperó y almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para ser analizado posteriormente.

### **6.10.2 Cuantificación de proteína.**

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976), que se basa en la unión de un colorante a una proteína desconocida y es comparada con diferentes cantidades de una proteína estándar. La proteína total de las muestras fue leída a una absorbancia de 595 nm en un espectrofotómetro.

### **6.10.3 Electroforesis en gel SDS-PAGE**

Para la electroforesis se tomó un volumen determinado de las proteínas problema, que en total contuviera una concentración de 30  $\mu\text{g}$ , a esta se le adicionó el mismo volumen de buffer de carga (sample buffer 1:1), las muestras se colocaron en un baño maría entre  $90^{\circ}\text{C}$  y  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos y se cargaron en un gel SDS-PAGE al 10%, las muestras fueron corridas a 110 volt durante 2 h. Una vez terminada la electroforesis se procedió a realizar la transferencia de las proteínas.

### **6.10.4 Electrotransferencia.**

Para la transferencia de las proteínas, se utilizó una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) La cual fue activada previamente con metanol durante 10 min, posteriormente se preparó el estuche que contenía la membrana y el gel de electroforesis, se colocó en la cámara de transferencia la cual contenía buffer de transferencia 1X. Las proteínas se



transfirieron a 12 mA durante toda la noche a 4°C. Terminado este tiempo las membranas se lavaron con una solución de TBS-T 3 veces durante 10 minutos.

Para el bloqueo de uniones inespecíficas las membranas se incubaron durante 1 h con leche al 5% diluida en TBS-T y en agitación.

**6.10.5 Inmunodetección**

Una vez concluido el bloqueo se aplicó el primer anticuerpo diluido en TBS- T + 5% de leche y fue incubado durante 24 horas a 4°C. Concluida esta incubación se retiró el anticuerpo y se recuperó y las membranas fueron lavadas con TBS-T 3 veces durante 10 minutos. Posteriormente se colocó el segundo anticuerpo diluido en TBS-T + 5% de leche durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo las membranas se lavaron con 3 veces con TBS-T durante 10 minutos. Las membranas se revelaron usando el sistema Clarity Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad) y se leyeron usando el equipo C-DiGit Blot Scanner. Las bandas obtenidas fueron analizadas por densitometría utilizando el analizador de imagen Fiji image J (Schindelin *et al.*, 2012) obteniendo la media de la intensidad de las bandas problema y el control. Los resultados fueron normalizados con respecto a la actina.

*Tabla 5. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas*

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Dilución</b>	<b>No. catalogo</b>	<b>Casa comercial</b>
Caspasa 3	1:1000	9664	Cell Signaling
β-actina	1:1000	8227	abcam
<b>Anticuerpo secundario</b>		<b>No. Catalogo</b>	<b>Casa comercial</b>
Goat-antirrabbit	1:120,000		

### 6.11 Análisis estadístico

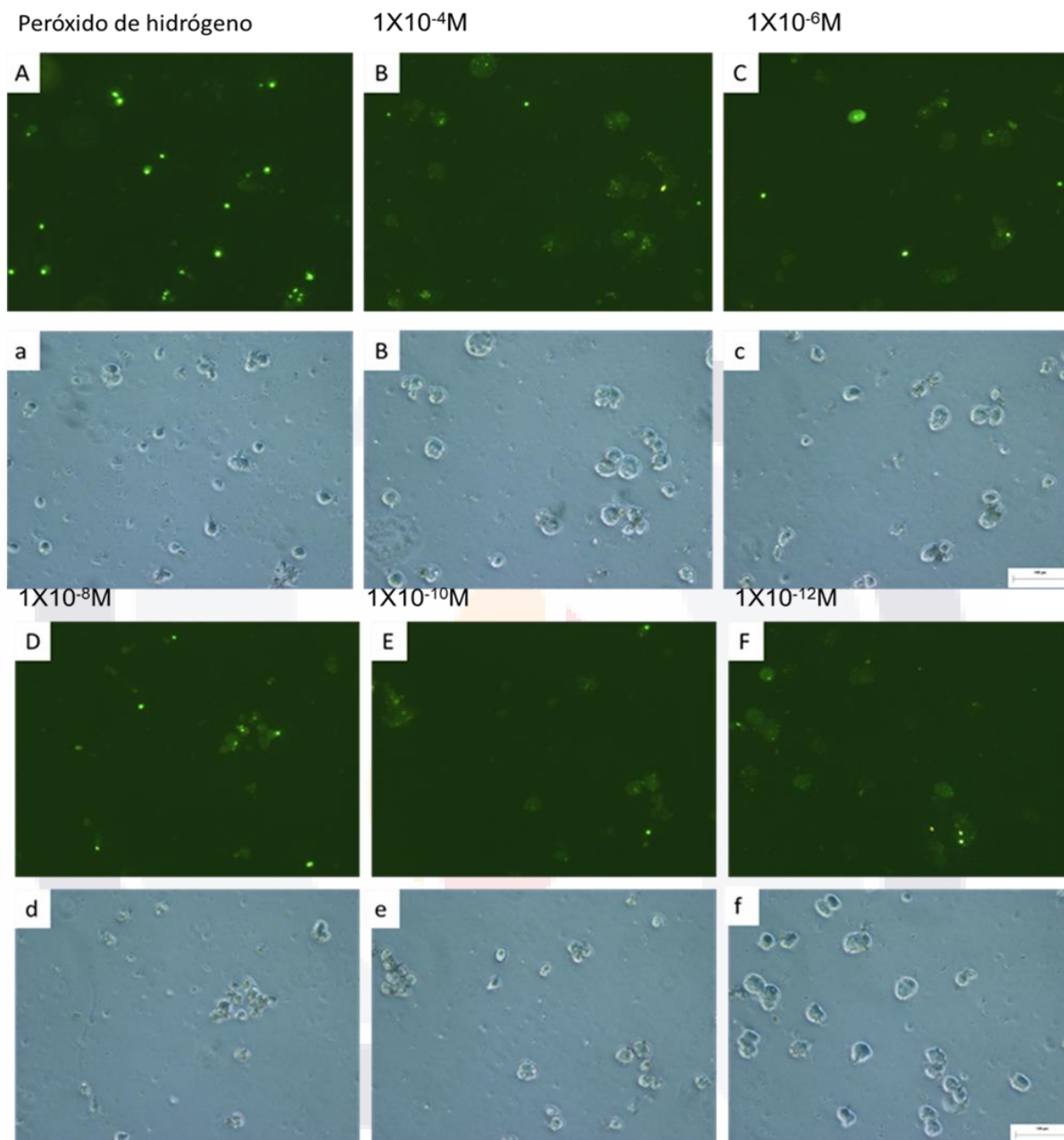
Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPrism el análisis de varianza ANOVA y pruebas de comparaciones múltiples como Dunnet, Mann Whitney así como Krustall Wallis. Los valores se representaron con su media y desviación estándar o su mediana y rango intercuartílico según corresponda. Considerando diferencia significativa de  $p < 0.05$ .



## Capítulo 7. Resultados

### 7.1 Acetilcolina influye sobre la viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica*

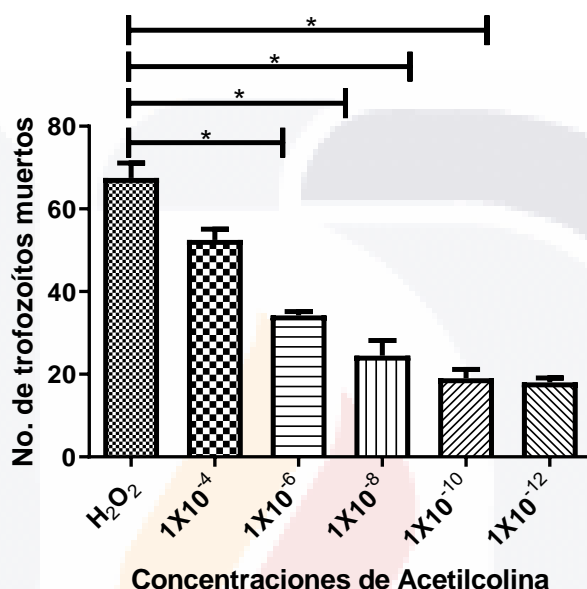
Como anteriormente se mencionó los trofozoítos fueron expuestos a diferentes concentraciones de los neurotransmisores Acetilcolina y norepinefrina, para observar si estos tenían algún efecto toxico sobre *E. histolytica*, para ello se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular donde encontramos que los trofozoítos de *E. histolytica* que fueron tratados con Acetilcolina a concentraciones como es  $1 \times 10^{-4}$  M mostraron menor viabilidad, a diferencia de las concentraciones  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M y  $1 \times 10^{-12}$  M en las cuales se encontró un mayor cantidad de células viables. En lo que respecta al control (trofozoítos+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se observó una disminución de la viabilidad celular como se puede observar en la figura 4. En general, podemos decir que conforme disminuye la concentración de Acetilcolina con la cual son tratados los trofozoítos de *E. histolytica* disminuye la muerte de estos (Figura 4, gráfica 1).



**Figura 4. Concentraciones altas de Acetilcolina modifica la viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica*.**

Trofozoítos de *E. histolytica* fueron tratados a concentraciones de  $1 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M y  $1 \times 10^{-12}$  M de Acetilcolina durante una hora, posteriormente se le añadió el colorante Sytox™ Green Nucleic Acid Stain. Las imágenes (A, B, C, D, E, F) muestran los trofozoítos que fueron teñidos con el colorante fluorescente

de color verde que representan a los trofozoítos muertos y las imágenes (a,b,c,d,e,f) muestran el mismo campo pero en contraste de fases lo cual nos permite observar el total del trofozoítos. Conforme disminuye la concentración de Acetilcolina disminuye la muerte de los trofozoítos.



**Grafica 1. Acetilcolina modifica la viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica*.**

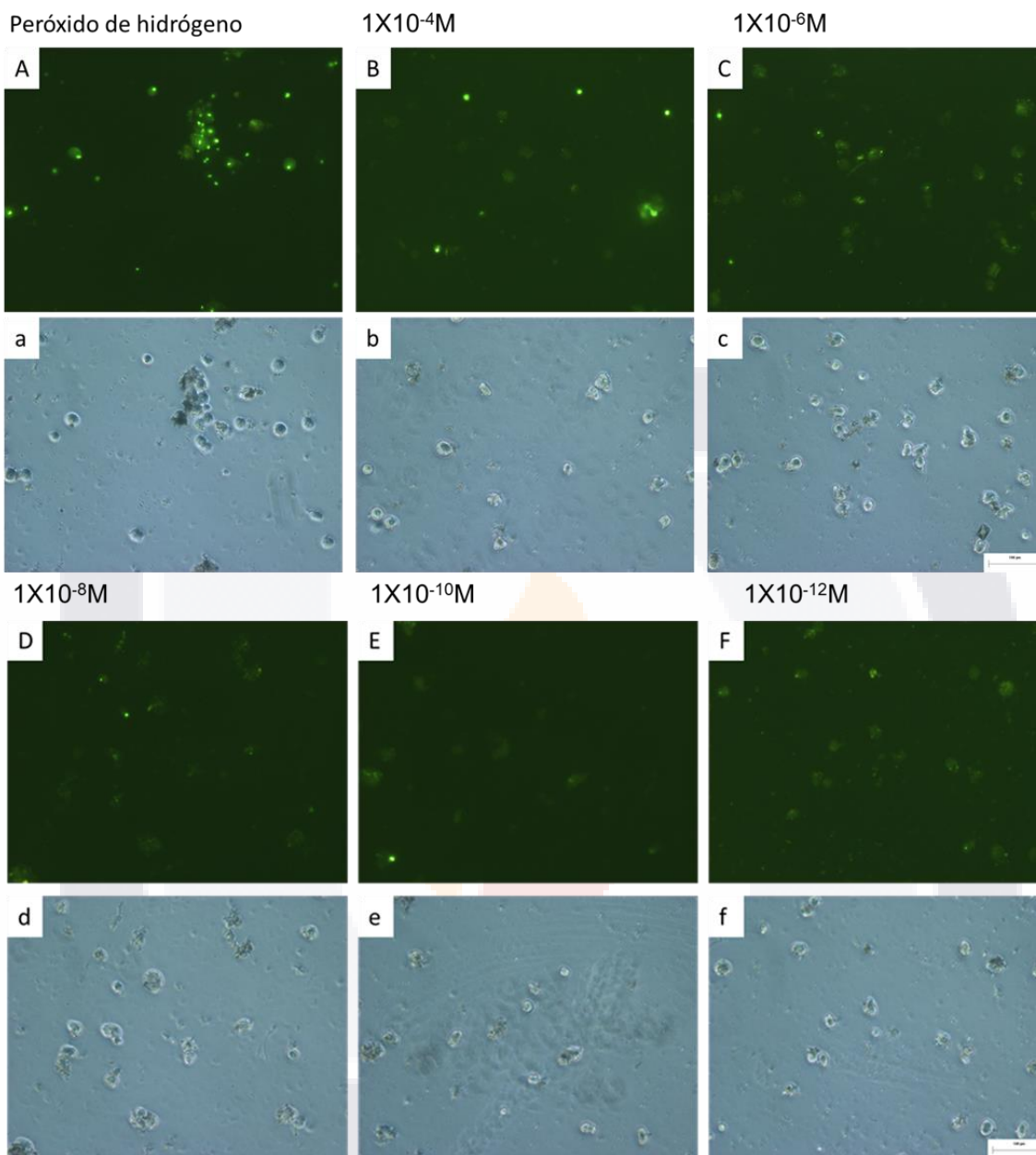
Trofozoítos de *E. histolytica* fueron tratados a concentraciones de 1X10<sup>-4</sup> M, 1X10<sup>-6</sup> M, 1X10<sup>-8</sup> M, 1X10<sup>-10</sup> M y 1X10<sup>-12</sup> M de Acetilcolina durante una hora posteriormente se le añadió el colorante Sytox™ Green Nucleic Acid Stain, el cual tiñe los núcleos de los trofozoítos que se encuentran muertos. En la gráfica se muestra que conforme disminuye la concentración de Acetilcolina disminuye la muerte de los trofozoítos. Cada valor representa la media ± S.E.M de 3 experimentos. Análisis de varianza Anova con respecto al control (\*p<0.05).

### 7.2 Norepinefrina influye sobre la viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica*

Así como se determinó la viabilidad de los trofozoítos tratados con Acetilcolina, también se llevó a cabo la determinación de la viabilidad de los trofozoítos, pero

ahora tratados con Norepinefrina, donde encontramos que a concentraciones como  $1 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M y  $1 \times 10^{-8}$  M muestran menor viabilidad, a diferencia de las concentraciones  $1 \times 10^{-10}$  M y  $1 \times 10^{-12}$  M en las cuales se encontró un mayor número de células viables. En lo que respecta al control era de esperar (trofozoítos +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), un menor número de células viables, como se puede observar en la figura 5. Sin embargo, aunque en el análisis estadístico no vemos diferencias significativas en ninguno de las concentraciones utilizadas, podemos decir que conforme disminuye la concentración de Norepinefrina en los trofozoítos de *E. histolytica* aumenta la viabilidad celular (Figura 5, grafica 2).

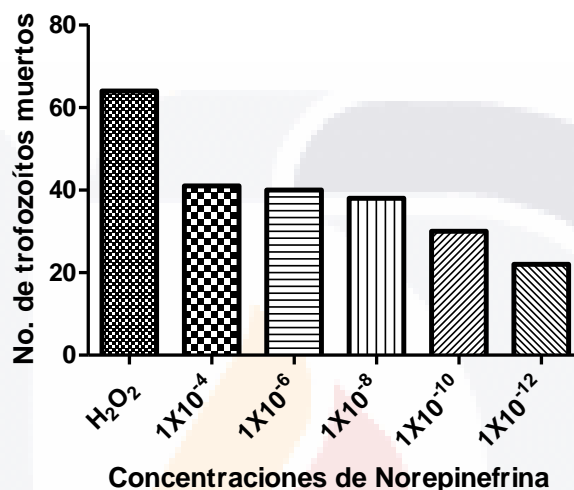




**Figura 5. Concentraciones altas de Norepinefrina provoca muerte de los trofozoítos.**

Trofozoítos de *E. histolytica* fueron tratados a concentraciones de  $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ,  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ,  $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,  $1 \times 10^{-10} \text{M}$  y  $1 \times 10^{-12} \text{M}$  de Norepinefrina durante una hora posteriormente se le añadió el colorante Sytox™ Green Nucleic Acid Stain. Las imágenes (A, B, C, D, E, F) muestran los trofozoítos que fueron teñidos con el colorante fluorescente de color verde que representan a los trofozoítos muertos y la imágenes (a,b,c,d,e,f) muestran el mismo campo pero en contraste de fases lo cual

nos permite observar el total del trofozoítos. Conforme disminuye la concentración de Norepinefrina disminuye la muerte de los trofozoítos. Cada valor representa la media  $\pm$  S.E.M de 3 experimentos. Análisis de varianza Anova con respecto al control (\* $p < 0.05$ ).



**Grafica 2. Norepinefrina modifica la viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica*.**

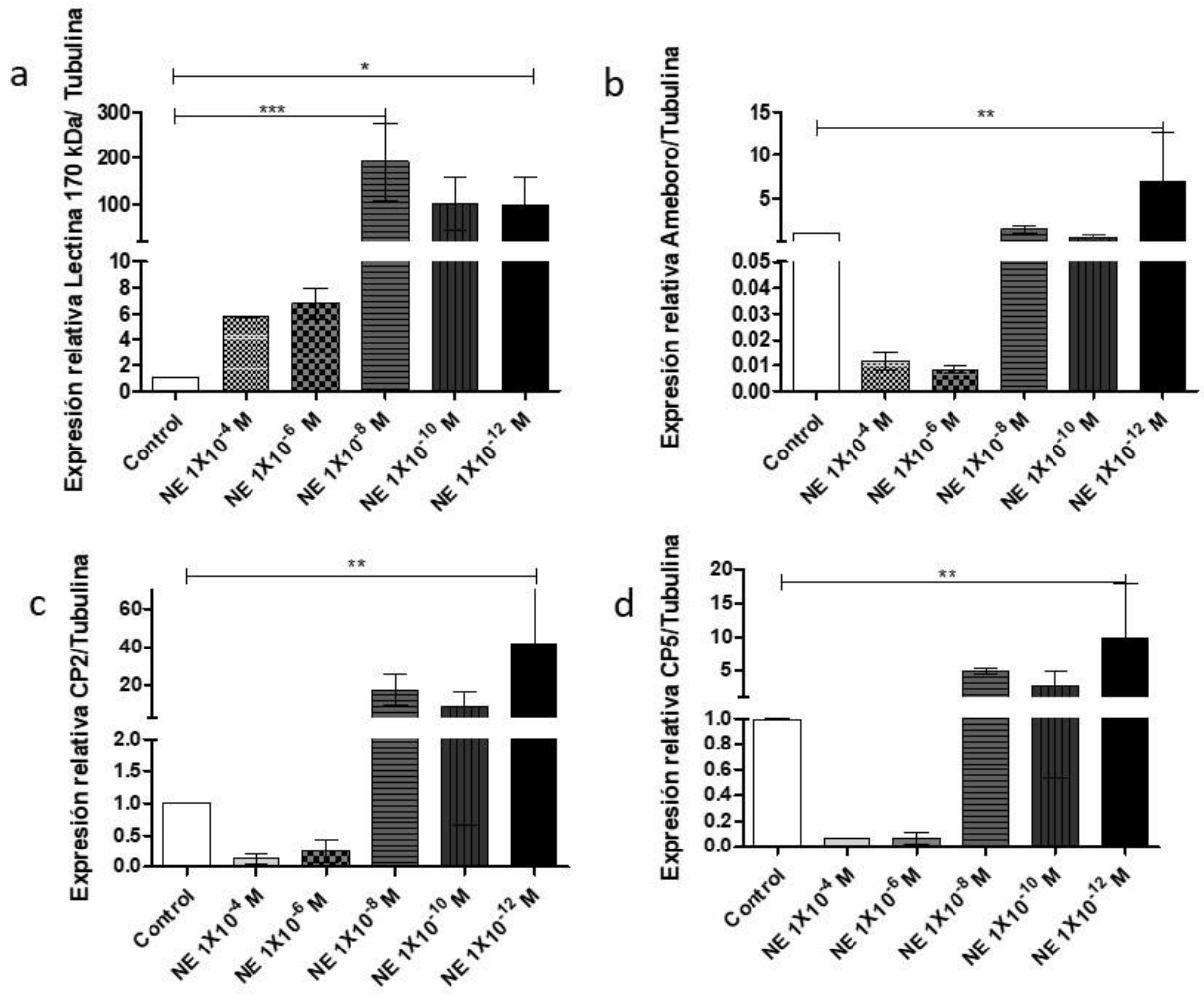
Trofozoítos de *E. histolytica* fueron tratados a concentraciones de 1X10<sup>-4</sup> M, 1X10<sup>-6</sup> M, 1X10<sup>-8</sup> M, 1X10<sup>-10</sup> M y 1X10<sup>-12</sup> M de Norepinefrina durante una hora posteriormente se le añadió el colorante Sytox<sup>TM</sup> Green Nucleic Acid Stain, el cual tiñe los núcleos de los trofozoítos que se encuentran muertos. En la gráfica muestra que existe una tendencia en el aumento de la viabilidad conforme disminuye la concentración de Norepinefrina. No se mostraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones usadas y el control.

**7.3 Expresión de los factores de virulencia de *E. histolytica***

La expresión de genes de patogenicidad de trofozoítos tratados con Norepinefrina, también fue evaluado con la finalidad de conocer si los neurotransmisores, generaban un cambio en la expresión de proteínas involucradas en la patogenia del parásito. Con respecto a esto, pudimos observar que para lectina de 170 kDa, la



concentración de  $1 \times 10^{-8}$  M indujo una mayor expresión de este factor, en lo que respecta para amebaporo, CP-2 y CP-5 la concentración más significativa fue la de  $1 \times 10^{-12}$  M.



**Figura 6. Análisis de la expresión génica de Factores de virulencia de *E. histolytica* por qPCR.**

Se evaluaron la expresión de los factores de patogenicidad de trofozoítos de *E. histolytica* estimulados con diferentes concentraciones de Norepinefrina durante una hora, estos fueron contrastados con un gen constitutivo control de tubulina. a) Muestra diferencia significativa entre el control ( $0.9947 \pm 0.003724$ ) y la

concentración de  $[1 \times 10^{-8} \text{ M}]$  ( $191.6 \pm 84.70$ ) así como también entre el control ( $0.9947 \pm 0.003724$ ) y la concentración  $[1 \times 10^{-12} \text{ M}]$  ( $97.91 \pm 59.70$ ). b) Muestra diferencia significativa entre el control ( $1.000 \pm 0.006450$ ) y la concentración de  $[1 \times 10^{-12} \text{ M}]$  ( $6.909 \pm 5.727$ ). c) Muestra diferencia significativa entre el control ( $1.000 \pm 0.006450$ ) y la concentración de  $[1 \times 10^{-12} \text{ M}]$  ( $42.12 \pm 37.07$ ). d) Muestra diferencia significativa entre el control ( $0.9922 \pm 0.006369$ ) y la concentración de  $[1 \times 10^{-12} \text{ M}]$  ( $9.817 \pm 8.033$ ). Se considero un valor de significancia de  $p < 0.05$ , utilizando una prueba de ANOVA de una vía, y prueba de comparación múltiple de Dunnetts.

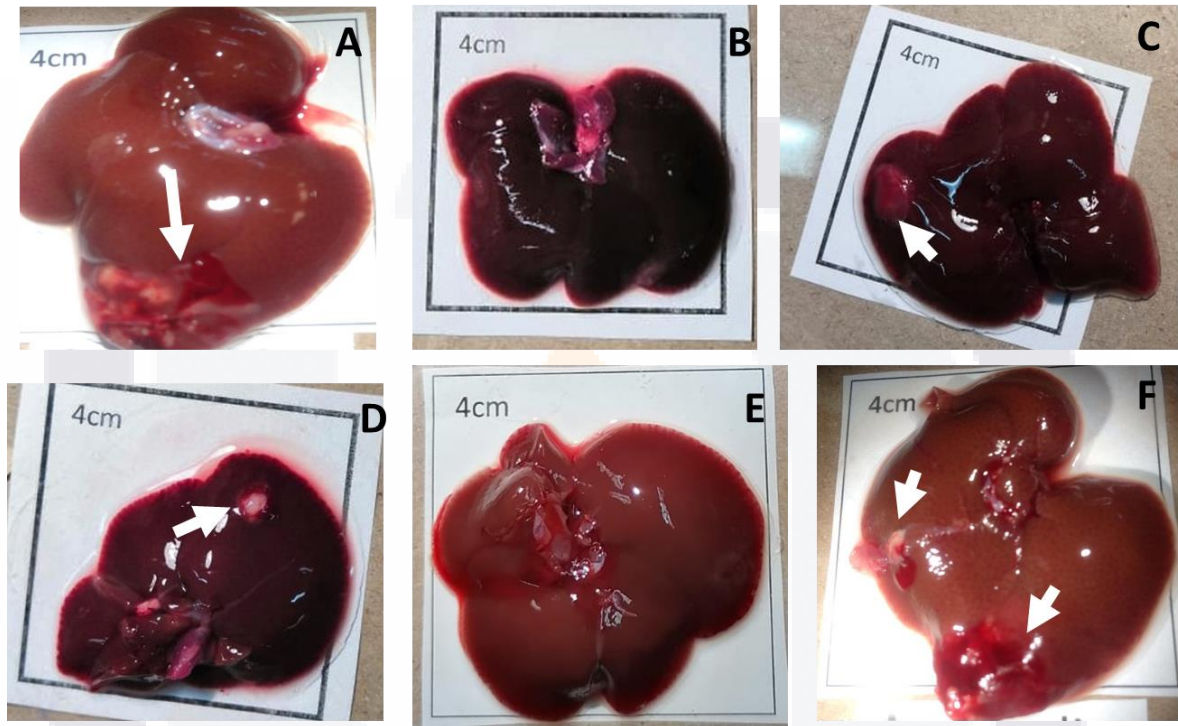
Aunque estos resultados fueron tomados en cuenta para la determinación de la concentración de norepinefrina que se utilizó para realizar la inoculación de los trofozoítos, no se completó el número de replicas necesarias para demostrar si el neurotransmisor inducía un cambio en la expresión de los factores de virulencia de la amiba.

#### **7.4 Inducción del absceso hepático amebiano**

Para conocer el efecto que tienen los neurotransmisores sobre la virulencia de *E. histolytica* se realizó el modelo de absceso hepático amebiano, donde además de las concentraciones a evaluar, se usaron grupos control, los cuales consistieron en trofozoítos estimulados más antagonistas, como el Carvedilol y Atropina.

Los resultados obtenidos mostraron que el grupo AHA control, existió la formación de abscesos grandes, en el grupo Sham (inoculación de medio de cultivo de *E. histolytica*) los hígados no mostraron lesión, en el grupo Norepinefrina se observó la formación de abscesos de tamaño pequeño, en el caso del grupo Norepinefrina + Carvedilol, también hubo la formación de pequeños abscesos, a nivel macroscópico no se encontró diferencia entre este grupo con respecto al grupo

que solo se usó Norepinefrina. En el grupo Acetilcolina los hígados mostraron la formación de abscesos grandes, mientras que en el grupo Acetilcolina+ Atropina, los hígados se mostraron sin daño aparente a comparación con el grupo que solo fue tratado con Acetilcolina.



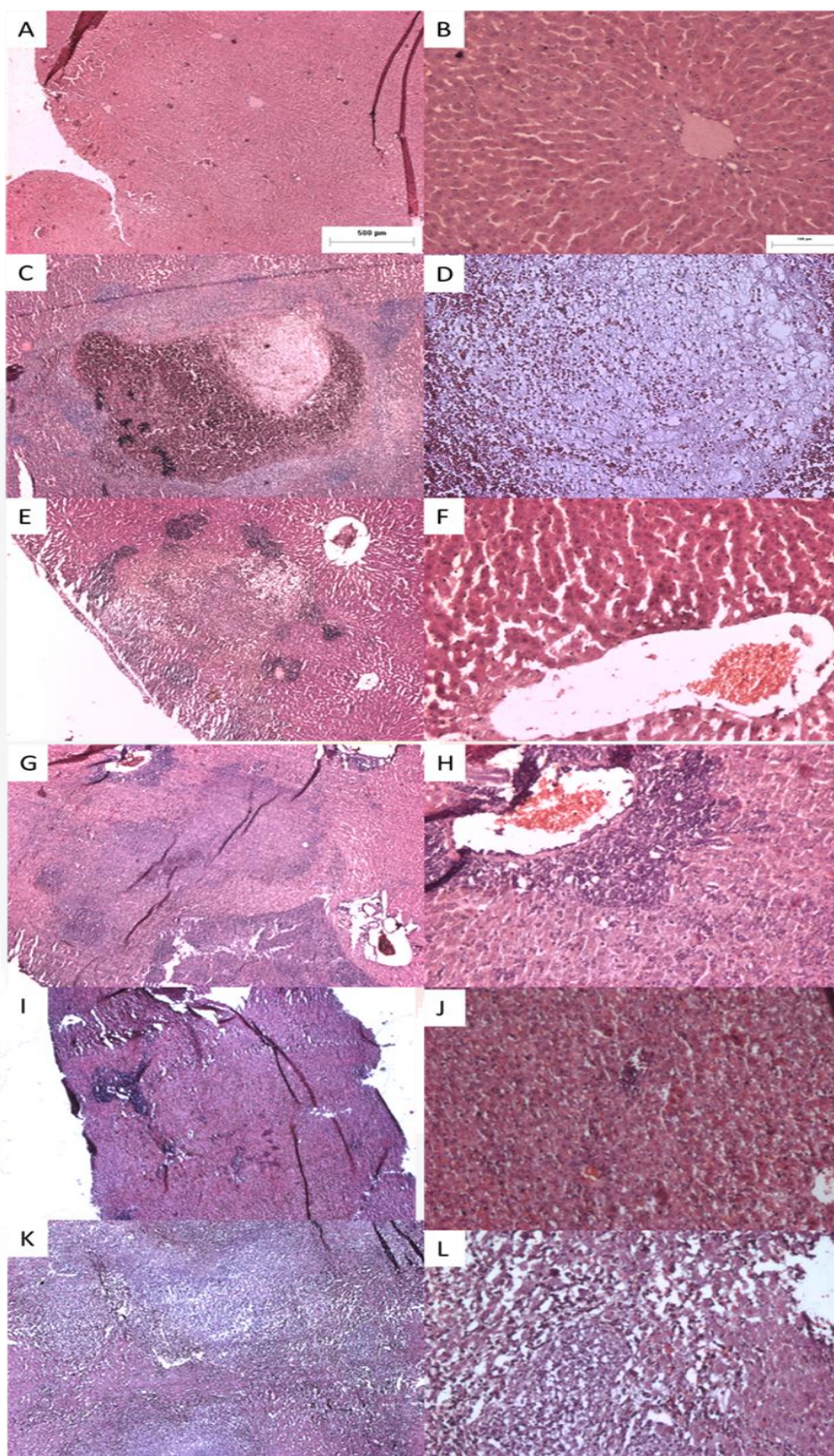
**Figura 7. Inducción del absceso hepático amebiano, análisis microscópico.**

Se muestran los hígados después de ser inoculados por vía intrahepática con trofozoítos previamente tratados. A) AHA (trofozoítos no tratados), B) Sham (solo medio Diamond), C) Norepinefrina + Carvedilol (trofozoítos tratados una hora con Carvedilol  $1 \times 10^{-12}$  M y posteriormente una hora con Norepinefrina  $1 \times 10^{-12}$ ), D) Norepinefrina (trofozoítos tratados una hora con Norepinefrina  $1 \times 10^{-12}$  M), E) Atropina + Acetilcolina (trofozoítos tratados una hora con Atropina  $1 \times 10^{-8}$  M y posteriormente una hora con Acetilcolina  $1 \times 10^{-6}$  M) y F) Acetilcolina (trofozoítos tratados una hora con Acetilcolina  $1 \times 10^{-6}$  M).

#### **7.4.1 Trofozoítos de *E. histolytica* tratados con los neurotransmisores, generan daño a nivel hepático después de ser inoculados.**

Para determinar el daño provocado por los trofozoítos de *E. histolytica* tratados con Carvedilol + Norepinefrina, Norepinefrina, Atropina + Acetilcolina y Acetilcolina se realizó un estudio histológico que nos ayuda a observar el daño. Para ello se utilizó el grupo Sham como control negativo y el grupo AHA como control positivo.

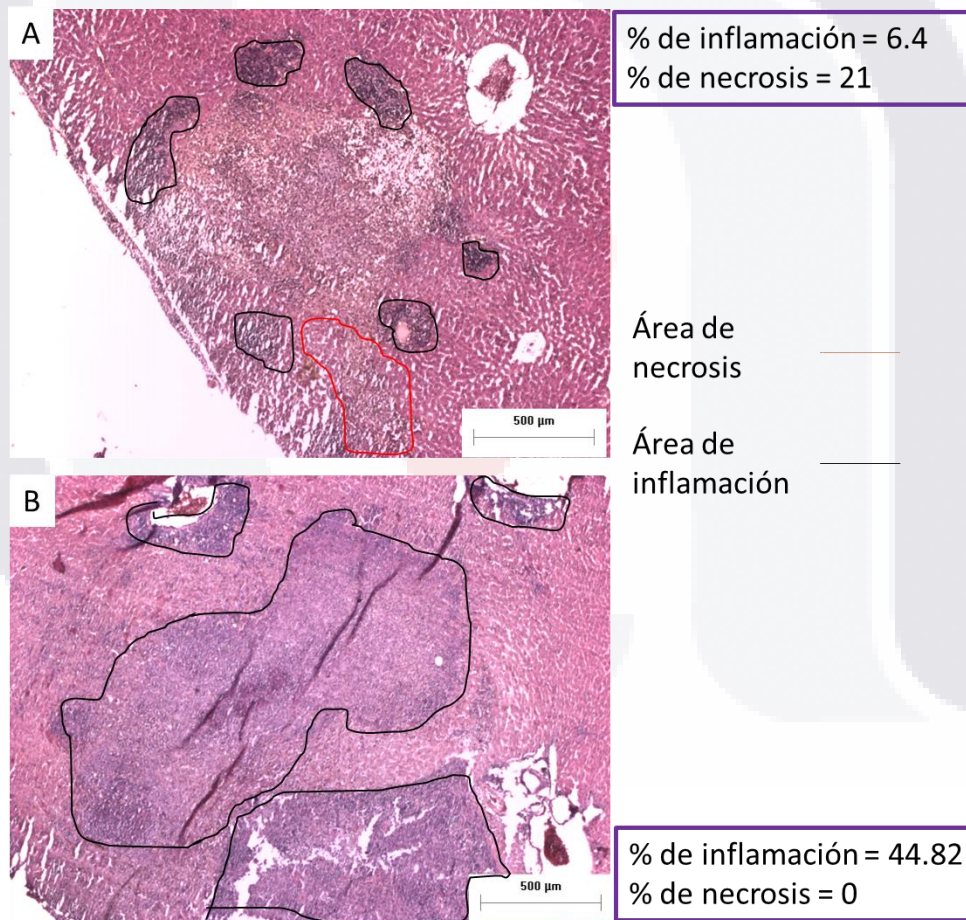
En el grupo Sham (Figs. 8A,B) se observó tejido hepático con estructura normal; en el grupo AHA (Figs. 8C, D) se observaron lesiones amebianas caracterizadas por grandes áreas de absceso con infiltrado inflamatorio y zonas de necrosis centrales; en el grupo Carvedilol +Norepinefrina (Figs. 8E, F) se observó daño en el tejido hepático con la diferencia de que las lesiones de infiltrado inflamatorio fueron varias y pequeñas, al igual que el área de necrosis; en el grupo de Norepinefrina (Figs. 8G, H), observamos zonas de inflamación pero con una pequeña área de necrosis, por otra parte, en el grupo de Atropina + Acetilcolina (Figs. 8I, J) se observaron pequeñas zonas hemorrágicas e inflamatorias, pero en general se observó un hígado homogéneo y poco dañado; En el grupo Acetilcolina (Figs. 8K, L) se observó gran daño al tejido hepático, representado por amplias zonas de necrosis con infiltrado inflamatorio periférico, dando la apariencia de varios abscesos amebianos desarrollados al mismo tiempo en la mayoría del tejido. Como se puede observar en la figura 8. Estos resultados nos demuestran que, el grupo que mayor presento daño histológico fue el grupo Acetilcolina y que al utilizar un antagonista a este neurotransmisor el daño histológico se ve disminuido.



**Figura 8.** *Figura 8. Comparación histológica del hígado después de la inoculación de los trofozoítos por vía intrahepática.*

Grupo Sham incisos A y B, Grupo AHA incisos C y D, Grupo Carvedilol + Norepinefrina incisos E y F grupo Norepinefrina incisos G y H, grupo Atropina + Acetilcolina incisos I y J y grupo Acetilcolina incisos K y L.

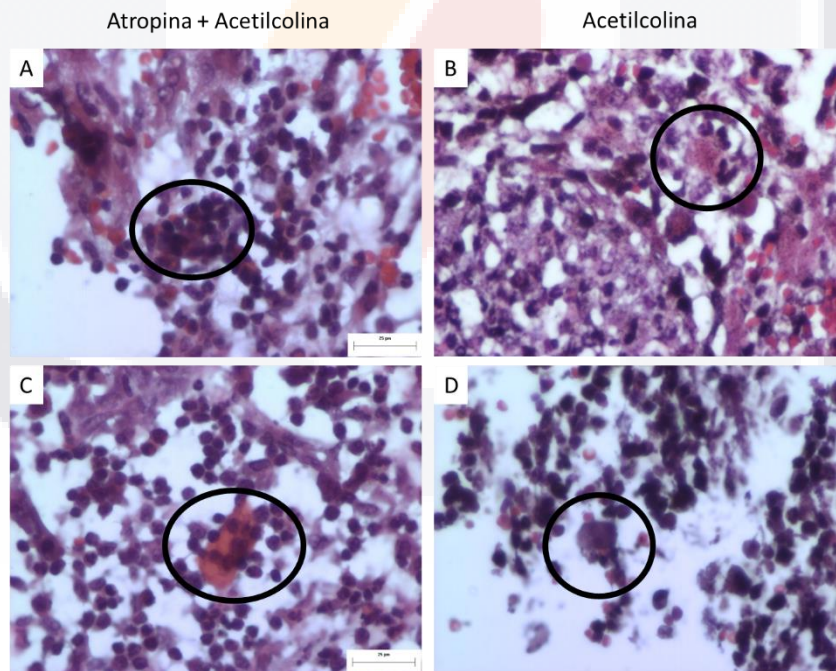
En la figura 9 realizamos una comparación de los grupos Carvedilol + Norepinefrina y Norepinefrina en relación al porcentaje de zonas de inflamación que presentaban en el tejido y observamos que en el grupo Norepinefrina se observó mayor porcentaje de zonas de infiltrado inflamatorio (Fig. 9B), en comparación de lo observado con el grupo Carvedilol + Norepinefrina.



**Figura 9. Los trofozoítos tratados con Norepinefrina ocasionan mayor zona de inflamación que los trofozoítos tratados Carvedilol + Norepinefrina.**

El inciso A muestra al grupo de trofozoítos tratados con Carvedilol + Norepinefrina, lo que se encuentra marcado en color negro muestra zona de inflamación y lo marcado de color rojo representa la zona de necrosis y el inciso B muestra al grupo de trofozoítos tratados con Norepinefrina.

Por otro lado las amibas que fueron tratadas con el antagonista de Acetilcolina e inoculadas en el hígado de hámster, mostraron un comportamiento de baja virulencia ya que se encontraban totalmente rodeadas e infiltradas por neutrófilos, los cuales estaban delimitando su capacidad de causar daño (Fig. 10A, C); por otro lado, las amibas que solo fueron tratadas con Acetilcolina e inoculadas al hígado de hámster, tuvieron un comportamiento distinto, ya que se encontraban rodeadas por pocos neutrófilos y también se observaron fagocitando eritrocitos (Fig. 10B, D)

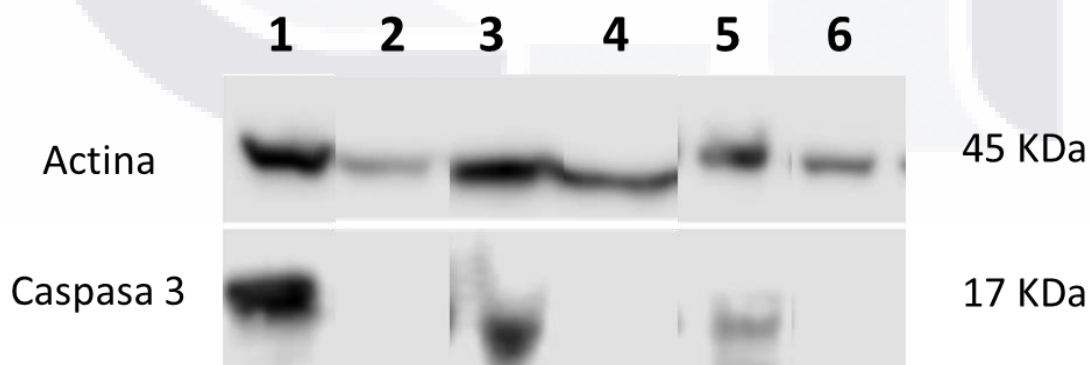


**Figura 10. Comparación del comportamiento entre trofozoítos de *E. histolytica* tratados con Atropina + Acetilcolina y los que solo fueron tratados con Acetilcolina.**

En el inciso A y C marcado en color negro se muestra *E. histolytica* que fue tratada con Atropina + Acetilcolina y en los incisos B y D marcado en color negro se muestra *E. histolytica* que fue tratada con Acetilcolina.

**7.5 Detección de apoptosis mediante la identificación de Caspa 3, en el absceso hepático amebiano.**

*E. histolytica* presenta diversos factores de patogenicidad, uno de ellos es la lectina de 260 kDa la cual, además de permitir que la amiba se adhiera a las células, activa la Caspasa 3 provocando que las células entren en un estado apoptótico (Houston, C. Boettner, D. Miller, V. & Petri, W. 2003). Para poder conocer si los trofozoítos tratados con neurotransmisores y aquellos tratados con neurotransmisores más sus antagonistas en el desarrollo del absceso hepático amebiano generaban un mayor estado apoptótico en las células, realizando la identificación de Caspasa 3 (17 kDa) mediante la técnica de Western blot. Pudimos observar que los grupos donde logramos identificar la Caspasa 3 fueron: grupo de AHA (control positivo), el grupo Acetilcolina y el grupo de Norepinefrina (Fig.11). Estos resultados nos sugieren que los neurotransmisores pueden estimular a los trofozoítos del parásito a la inducción de una actividad apoptótica sobre las células del tejido.

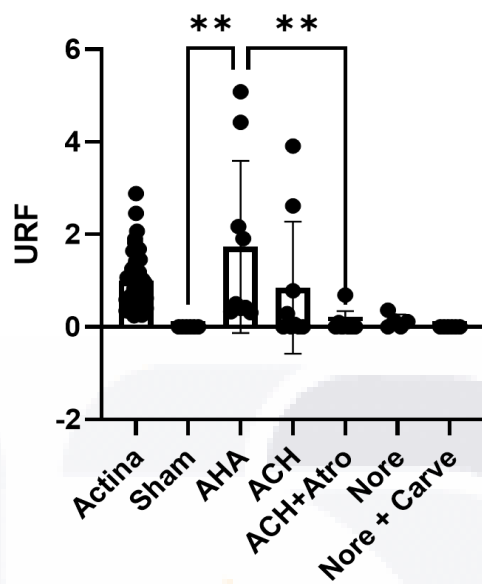


**Figura 11. Presencia de Caspasa 3 en hígados de hámsteres inoculados con trofozoítos de *E. histolytica* expuestos a diferentes tratamientos.**



Las bandas muestran la presencia del  $\beta$ -actina (control, 45 kDa), Caspasa 3 con un peso de 17 kDa en distintos grupos experimentales: 1) AHA, 2) SHAM, 3) Acetilcolina, 4) Atropina + Acetilcolina, 5) Norepinefrina, 6) Carvedilol + Norepinefrina.

En cuanto al análisis estadístico realizado mediante un análisis densitométrico de las bandas obtenidas, observamos que en el grupo Atropina + Acetilcolina se ve disminuida la presencia de la Caspasa 3 en relación al grupo control AHA siendo de este último el que mostro diferencias significativas, dichos resultados son congruentes con lo observado a nivel de la histopatología de las amibas pretratadas con Atropina + Acetilcolina que no indujeron mayor área de daño en el hígado (Figs. 8I, J), por otro lado, el tratamiento de trofozoítos con Norepinefrina, mostro un nivel muy bajo de Caspasa 3 en comparación con el grupo de Acetilcolina y el grupo AHA (no se observaron diferencias significativas) pero no más bajo que el grupo Carvedilol + Norepinefrina. Por otra parte, es de sobresaltar el hecho de que los trofozoítos pretratados con Acetilcolina indujeron una mayor muerte celular ya que los niveles Caspasa 3 se ven incrementados, en comparación con los trofozoítos pretratados con Atropina + Acetilcolina.



**Grafica 3. Análisis cuantitativo de Caspasa 3 en hígados de hámsteres inoculados con trofozoítos de *E. histolytica* tratados con neurotransmisores.**

Se muestra la media de la intensidad de las bandas problema y controles. Los resultados fueron normalizados con respecto a la actina y se obtuvo la media y el error estándar de 3 experimentos. Análisis de Krustal Wallis test, pos hoc de Dunn´s, considerando diferencia significativa de  $p < 0.05$ .

## Discusión

*E. histolytica* es un protozooario, agente causal de la amebiasis en humanos. Se distribuye ampliamente en todo el mundo, pero principalmente en países en vías de desarrollo, como en América Central y del sur, África e India. La OMS indica que *E. histolytica* causa 50 millones de infecciones al año y alrededor de 100 mil muertes al año en todo el mundo (Shahi *et al.*, 2019). La infección por protozooario se da por la ingesta de quistes en alimentos, agua o material contaminado con materia fecal. *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. Como se mencionó anteriormente, en la actualidad se desconoce en su totalidad qué es lo que sucede durante la relación Huésped-Parásito que provoca una mayor o menor susceptibilidad de la amebiasis, sin embargo, algunos autores reportan que quizá esta predisposición o susceptibilidad pueda estar dada por factores humorales presentes en el hospedero, los cuales pueden implicar la presencia de moléculas del sistema inmunológico y también a la presencia de neurotransmisores del Sistema Nervioso Autónomo como la Norepinefrina y Acetilcolina (Sanchez-Aleman *et al.*, 2014). Para poder observar si estos neurotransmisores tuvieran participación en aumentar el grado de virulencia de la amiba fue necesario determinar primero la concentración a la cual los trofozoítos eran estimulados y que a su vez no generara un efecto tóxico para ellos. En la gráfica 1 podemos observar como la concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M tiene diferencia significativa  $*P < 0.05$  comparando con el control que es  $H_2O_2$  con relación a que presenta menor muerte celular y al ir disminuyendo la concentración de los neurotransmisores no afecta la viabilidad de los trofozoítos. Medina-Rosales y colaboradores (2021) refieren que, a concentraciones de **1**,  $1 \times 10^{-2}$  M,  $1 \times 10^{-4}$  M y  $1 \times 10^{-6}$  M de Acetilcolina, no encontraron efectos sobre la viabilidad con respecto a

su control, además, en este mismo artículo también, evaluaron el efecto de Acetilcolina en la proliferación de los trofozoítos de *E. histolytica* y encontraron que las mismas concentraciones antes mencionadas hubo una ligera tendencia a aumentar la proliferación de los trofozoítos. En el caso de la gráfica 2, esta representa el experimento para determinar la concentración de Norepinefrina, se observó que no existe diferencia significativa entre el control positivo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con relación a la muerte celular y las concentraciones con las que fueron tratados los trofozoítos de *E. histolytica*, sin embargo, se puede observar una disminución de en la muerte de los trofozoítos conforme va bajando la concentración del neurotransmisor (Norepinefrina) por lo cual se utilizó la concentración de 1X10<sup>-12</sup> para realizar el tratamiento a los trofozoítos de *E. histolytica* para posteriormente fueran inoculados por vía intrahepática en los hámsteres.

El parásito *E. histolytica* se define y conoce por tener una fuerte capacidad de invadir y destruir tejidos, especialmente el intestino y el hígado (Muñoz-Ortega et al., 2011). Por lo cual para determinar la capacidad que el parásito *E. histolytica* tiene para destruir el tejido, después de definir las concentraciones con las cuales fueron tratados los trofozoítos se realizó la inoculación por vía intrahepática y se analizaron los tejidos con la tinción de Hematoxilina y Eosina. La figura 7 muestra un análisis macroscópico de los hígados, donde en el inciso C) (hígado inoculado con trofozoítos tratados con Norepinefrina y su antagonista) se observó la formación de un pequeño absceso, en el inciso D) (hígado que fue inoculado con trofozoítos tratados con Norepinefrina y su antagonista) se puede observar la formación de un absceso de mayor tamaño. En la figura 8 (análisis microscópico) se observó que el daño en hígado ocasionado por la amiba tratada con Norepinefrina y su antagonista es poco, de igual manera, estas mismas observaciones se obtuvieron en el grupo que fue tratado con Norepinefrina (Fig. 8), al ser comparados estos dos grupos con aquellos que no tuvieron ningún estímulo, sin embargo, si causaron daño por lo que su virulencia no fue totalmente atenuada, por lo tanto en base a este análisis histológico, se puede pensar que el neurotransmisor Norepinefrina no afecta la virulencia del parásito. En un estudio donde se realizó una simpactectomía química,

es decir, que bloquearon al Sistema Nervioso Simpático, observaron una disminución en el tamaño del absceso hepático, también observaron una reducción en las fibras de colágeno, estas se producen por la activación de las células estelares que sintetizan y liberan Norepinefrina y Epinefrina por vías de señalización como p38, estos neurotransmisores aumentan la expresión de colágeno de tipo I y II a través de TGF- $\beta$  sin involucrar citocinas proinflamatorias, pero también, observaron que durante el desarrollo del absceso hepático se promovió un estado anti-inflamatorio (Muñoz Ortega et al., 2015; Ávila Blanco *et al.*, 2015). Estos datos nos pueden decir que puede llegar a existir una relación entre el Sistema Nervioso Simpático y la virulencia de *E. histolytica* ya que, por una parte al ser estimulada la ameba con Norepinefrina, sigue causando daño en el hígado y por otro lado al ser eliminado el Sistema Nervioso Simpático también provoca daño cuando el hígado es inoculado con amebas.

Por otro lado, regresando a la figura 7 donde se muestran los hígados macroscópicamente se puede observar el hígado que fue inoculado con trofozoítos tratados con Acetilcolina y su antagonista donde, no se logra observar la presencia del absceso y así como también se observa el hígado que fue inoculado con trofozoítos tratados con Acetilcolina se puede observar la formación de un absceso grande. Ya a nivel microscópico, en la figura 8 en el grupo de Atropina + Acetilcolina se muestran pequeñas zonas hemorrágicas y pequeñas zonas de infiltrado inflamatorio, sin embargo, en la misma figura, pero en el grupo Acetilcolina se observa mayor daño en el tejido hepático ya que se muestran grandes zonas de necrosis. En un estudio donde se realizó una vagotomía y después se inocularon trofozoítos de *E. histolytica* provocó un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF-alfa y esto puede ser el posible responsable que en el desarrollo del absceso hepático se viera acompañado de más granulomas, fibras de colágeno y mayor infiltrado inflamatorio, a lo que concluyeron que el nervio vago desempeña un papel importante en la regulación de la inflamación durante la formación del absceso hepático amebiano (Muñoz-Ortega *et al.*, 2011); En este artículo se ve la influencia que tiene el sistema nervioso parasimpático desde el

huésped, pero al contrario a lo que se trabajó en este proyecto de tesis, se ve desde la perspectiva del parásito como el parásito puede ser beneficiado con el microambiente que se encuentra en su huésped.

Cuando las células se encuentran dañadas, un mecanismo común para que sean eliminadas es por la muerte celular por apoptosis, para determinar si los trofozoítos de *E. histolytica* provocaron apoptosis en las células del tejido hepático se llevó a cabo la inmunodetección de la proteína apoptótica Caspasa 3, la cual fue posteriormente cuantificada en los diferentes grupos y se encontró que no existe diferencia significativa entre el grupo AHA y el grupo de Acetilcolina y el de Norepinefrina pero sí existió diferencia significativa entre AHA y el grupo Atropina + Acetilcolina. Por lo tanto, el dato más interesante es que puede ser que la atropina juega un papel en ser antagonista para el efecto de la Acetilcolina y por ende, la ameba no pudo expresar todos sus factores de virulencia, y por lo tanto, no pudo generar daño al tejido hepático. Es conocido que la atropina es antagonista del neurotransmisor Acetilcolina en humanos y aquí se ve el mismo efecto en los trofozoítos de *E. histolytica*. Se conoce que la ameba responde a diversos factores humorales (Pulido-Ortega et al., 2019). Recientemente hay un artículo donde demuestra la unión de Acetilcolina a la membrana de los trofozoítos de *E. histolytica* (Medina-Rosales et al., 2021).

## Conclusión

La concentración  $1 \times 10^{-6} \text{M}$  de Acetilcolina no es tóxica para los trofozoítos de *E. histolytica* ya que aumenta su viabilidad con respecto al control  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Con respecto a las concentraciones utilizadas de norepinefrina, ninguna de ellas muestra diferencia con respecto al control, pero si un aumento de la viabilidad de los trofozoítos con forme disminuye la concentración de este neurotransmisor.

El análisis cuantitativo de la expresión relativa de los factores de virulencia de los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, muestra un incremento significativo a la concentración de  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  para lectina de 170 KDa, sin embargo, esta concentración no estimuló de la misma forma la expresión de los genes de los amebaporos y los de las proteasas de cisteína. Pudimos observar que el incremento de la expresión de estos factores se presenta a menores concentraciones siendo para estos su concentración óptima a  $1 \times 10^{-12} \text{M}$ .

En el análisis morfológico con la tinción de Hematoxilina y Eosina se observó que existe mayor daño al tejido en el grupo donde los trofozoítos de *E. histolytica* se trataron con Acetilcolina y en el grupo donde se trataron con Acetilcolina y su antagonista presentó un daño leve al tejido ya que no se observó zonas necróticas como en el que solo fueron tratados con Acetilcolina y en el grupo de Norepinefrina así como en el grupo de Carvedilol + Norepinefrina también se mostró daño histológico, pero sin presentar zona de necrosis solo zonas hemorrágicas y de infiltrado inflamatorio.

En el resultado de la determinación de apoptosis muestra que existe diferencia significativa entre el grupo control AHA y el grupo donde los trofozoítos de *E. histolytica* fueron tratados con Atropina + Acetilcolina por lo tanto, la atropina realizó su función como antagonista de Acetilcolina por la amiba.

## Referencias

-Acharya, D. P., Sen, M. R., & Sen, P. C. (1989). Effect of exogenous 5 hydroxytryptamine on pathogenicity of *Entamoeba histolytica* in experimental animals. *Indian Journal of Experimental Biology*, 27(8), 718–720. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2561282>

-Aldaba-Muruato, L. R., Muñoz-Ortega, M. H., Macías-Pérez, J. R., Pulido Ortega, J., Martínez-Hernández, S. L., & Ventura-Juárez, J. (2017). Adrenergic regulation during acute hepatic infection with *Entamoeba histolytica* in the hamster: involvement of oxidative stress, Nrf2 and NF-KappaB. *Parasite*, 24, 46. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017048>

Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW. 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. 89(1):73–120.

Anesi, J. A., & Gluckman, S. (2015). Amebic liver abscess. *Clinical Liver Disease*, 6(2), 41–43. <https://doi.org/10.1002/cld.488>

Anisman, H., Baines, M. G., Berczi, I., Bernstein, C. N., Blennerhassett, M. G., Gorczynski, R. M., Warrington, R. J. (1996). Neuroimmune mechanisms in health and disease: 1. Health. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Medicale Canadienne*, 155(7), 867–874. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8837533>

Asociación Colombiana de Infectología., J. C., CORTÉS, J. A., CUERVO, S. I., & LÓPEZ, M. C. (2007). *Infectio : revista de la Asociación Colombiana de Infectología*. *Infectio* (Vol. 11). La Asociación Colombiana de Infectología. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-93922007000100006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922007000100006)



-Avila Blanco ME, M.H. Muñoz Ortega, M. Garcia Lorenzana, A. Quintanar Stephano, M.R. Campos Esparza, R. Campos Rodriguez y J. Ventura Juarez. 2015. The sympathetic nervous system regulates inflammations in amoebic liver abscess in hámster. *Advances in Neuroimmune Biology*, 6:43-57.

-Castaño-Osorio, J. C. (2009). *Infectio: revista de la Asociación Colombiana de Infectología*. *Infectio* (Vol. 13). La Asociación Colombiana de Infectología. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-93922009000200005](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922009000200005)

-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>

-Botero, David, 2012. *Parasitosis humana*. 5° edición. Ed. CIB. Medellín, Colombia. Pág. 37-71.

-Caballero R. 2007. *Microbiología y parasitología humana*. 3°edicion. Ed. Panamericana. México D.F. Pág. 1307-1309.

-Casados-Vásquez, L.E. Lara-González, S. Briebe, L.G. 2010. Crystal structure of the cysteine ptotease inhibitor 2 from *Entamoeba histolytica*: functional convergence of a common protein fold. *Gene*. 471 (1-2) pp 45-52.

CDC - DPDx - Amebiasis. (n.d.). Retrieved February 28, 2019, from <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>

Bertrand D and Wallace TL. (2020). A Review of the Cholinergic System and Therapeutic Approaches to Treat Brain Disorders. *Curr Topics Behav Neurosci* (2020) 45: 1-28. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2020\\_141](https://doi.org/10.1007/7854_2020_141)

Davis, A. N., Haque, R., & Petri, W. A. (2002). Update on protozoan parasites of the intestine. *Current Opinion in Gastroenterology*, 18(1), 10–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17031224>

Denaro FJ. The detection of serotonin: an additional approach in diagnosing amebiasis. *Med Hypotheses*. 1984 Jul;14(3):281-3. doi: 10.1016/0306-9877(87)90129-0. PMID: 6088956.

Diamond L.S. (1961). Axenic Cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science* 134: 336-337

-Duarte, S., Baber, J., Fujii, T., & Coito, A. J. (2015). Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biology*, 44–46, 147–156. <https://doi.org/10.1016/J.MATBIO.2015.01.004>

Sánchez-Alemán E, Quintanar-Stephano A, Escobedo G, Campos-Esparza Mdel R, Campos-Rodríguez R, Ventura-Juárez J. Vagotomy induces deregulation of the inflammatory response during the development of amoebic liver abscess in hamsters. *Neuroimmunomodulation*. 2015;22(3):166-80. doi: 10.1159/000362240. Epub 2014 May 6. PMID: 24819982.

-Espinosa-Cantellano, M., & Martínez-Palomo, A. (1991). The plasma membrane of *Entamoeba histolytica*: structure and dynamics. *Biology of the Cell*, 72(3), 189–200. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1794060>

-Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A., 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 318e331

-Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho HJ. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv Exp Med Biol* (2014); 817:39-71. doi:10.1007/978-1-4939-0897-4\_3

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Ferreira T, Guimaraes I, Silva F, Ribeiro F. 2016. Alzheimer's Disease: Targeting the cholinergic system. *Curr Neuropharmacol*. 14(1):101-15.

-Gómez, J.C. Cortés, J.A. Cuervo, S.I. López, M.C. 2007. Amibiasis intestinal. *Infection*. 11 (1) pp 36-45.

-González-Ponce, H., Rincón-Sánchez, A., Jaramillo-Juárez, F., Moshage, H., González-Ponce, H. A., Rincón-Sánchez, A. R., Moshage, H. (2018). Natural Dietary Pigments: Potential Mediators against Hepatic Damage Induced by Over-The-Counter Non-Steroidal Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs. *Nutrients*, 10(2), 117. <https://doi.org/10.3390/nu10020117>

Glishbach R, Hein L. 2008. Presynaptic metabotropic receptors for acetylcholine and adrenaline/noradrenaline. *Hand Exp Pharmacol*. (184): 261-88.

Haddad, J. J., Saadé, N. E., & Safieh-Garabedian, B. (2002). Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *Journal of Neuroimmunology*, 133(1–2), 1–19. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446003>

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

Helk, E., Bernin, H., Ernst, T., Ittrich, H., Jacobs, T., Heeren, J., Lotter, H. (2013). TNF $\alpha$ -Mediated Liver Destruction by Kupffer Cells and Ly6Chi Monocytes during *Entamoeba histolytica* Infection. *PLoS Pathogens*, 9(1), e1003096. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003096>

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Houston, C. Boettner, D. Miller, V. Petri, W. 2003. Apoptotic Killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*. 71 (2) pp 964-972.

-Houston, C. D., Boettner, D. R., Miller-Sims, V., & Petri, W. A. (2003). Apoptotic Killing and Phagocytosis of Host Cells by the Parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*, 71(2), 964–972. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.964-972.2003>

Ikeda MZ, Jeon SD, Cowell RA, Remage-Healey L. Norepinephrine Modulates Coding of Complex Vocalizations in the Songbird Auditory Cortex Independent of Local Neuroestrogen Synthesis. *J Neurosci*. 2015 Jun 24;35(25):9356-68. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4445-14.2015. PMID: 26109659; PMCID: PMC4478252.

-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. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2880802>

-Laughlin, R. C., & Temesvari, L. A. (2005). Cellular and molecular mechanisms that underlie *Entamoeba histolytica* pathogenesis: prospects for intervention. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 7(13), 1–19. <https://doi.org/10.1017/S1462399405009622>

-Luna LG, 1968. *Manual of histologic staining methods.*, 3<sup>o</sup> ed. ed. McGraw-Hill., NY.

Martínez-Palomo, A., Espinosa-Cantellano, M., 2005. Amoebiasis. In: Cox, F.E.G., Wakelin, D., Despommier, D.D. (Eds.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, tenth ed., *Entamoeba histolytica* Infections. Arnold, London, pp. 200e217.

Meza, I Torres, H. Meraz, A. 1994. Organización Molecular de Entamoeba Histolytica. En. Amibiasis, infección y enfermedad por Entamoeba histolytica. Editorial Trillas, Mexico. Pp 39-55.

-Muñoz-Ortega, M. H, Cervantes García, D, Quintanar Stephano, A, Campos Esparza, M. R, García Lorenzana, M, Campos Rodríguez, R, Rodríguez, M. R y Ventura Juárez J, 2015. Amebic Liver Abscess in Rat: Morphological Evidence of Innate Immune Modulation by the Sympathetic Nervous System. 33(1):213-221.

-Muñoz-Ortega, M., Quintanar-Stephano, A., García Lorenzana, M., Campos-Esparza, M. R., Silva-Briano, M., Adabache-Ortíz, A., ... Ventura-Juárez, J. (2011). Modulation of amoebic hepatic abscess by the parasympathetic system. Parasite Immunology, 33(1), 65–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21189654>

-Muriel Pablo (2017). Liver Pathophysiology (Elsevier). México. Retrieved from [https://www.dropbox.com/scl/fi/oyv54npfa4c16hcq37g26/MURIEL\\_9780128043219.pdf?dl=0&oref=e&r=AAy82h6ODfOfaTiLyVQRyM8EaKCusvJQKyleyWBCwNdp52PeXCNDW6QqwVcBZiW-vNbaC2wfXkqXatpjJHarCQ7zcto23rfd\\_grvbIDFClab32AIJvmymJn\\_6OIVsrFxG8oW0MT\\_zTgW7DSq\\_wnNh8JstjwfTzlqUn](https://www.dropbox.com/scl/fi/oyv54npfa4c16hcq37g26/MURIEL_9780128043219.pdf?dl=0&oref=e&r=AAy82h6ODfOfaTiLyVQRyM8EaKCusvJQKyleyWBCwNdp52PeXCNDW6QqwVcBZiW-vNbaC2wfXkqXatpjJHarCQ7zcto23rfd_grvbIDFClab32AIJvmymJn_6OIVsrFxG8oW0MT_zTgW7DSq_wnNh8JstjwfTzlqUn)

Moreira C, Sperandio. 2016. The epinephrine/Norepinephrine/autoinducer-3 interkingdm signaling system in Escherichia coli O157.H7. Adv Exp Med Biol. 874:247-61.

Medina-Rosales MN, Muñoz-Ortega MH, García-Hernández MH, Talamás-Rohana P, Medina-Ramírez IE, Salas-Morón LG, Martínez-Hernández SL, Ávila-Blanco ME, Medina-Rosales B, Ventura-Juárez J. Acetylcholine Upregulates *Entamoeba histolytica* Virulence Factors, Enhancing Parasite Pathogenicity in Experimental

Liver Amebiasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Jan 28;10:586354. doi: 10.3389/fcimb.2020.586354. PMID: 33585267; PMCID: PMC7876292.

Nordberg A. 1994. Human nicotinic receptors - Their role in aging and dementia. *Neurochem Int.* 25(1):93–7

Jonge WJ. The Gut's Little Brain in Control of Intestinal Immunity. *ISRN Gastroenterol.* 2013 Apr 4;2013:630159. doi: 10.1155/2013/630159. PMID: 23691339; PMCID: PMC3649343.

Pulido-Ortega J, Talamás-Rohana P, Muñoz-Ortega MH, Aldaba-Muruato LR, Martínez-Hernández SL, Campos-Esparza MDR, Cervantes-García D, Leon-Coria A, Moreau F, Chadee K, Ventura-Juárez J. Functional Characterization of an Interferon Gamma Receptor-Like Protein on *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun.* 2019 Oct 18;87(11):e00540-19. doi: 10.1128/IAI.00540-19. PMID: 31427448; PMCID: PMC6803330.

-Pinilla, A. E., López, M. C., & Viasus, D. F. (2008). [History of the *Entamoeba histolytica* protozoan]. *Revista Medica de Chile*, 136(1), 118–124. <https://doi.org/S0034-98872008000100015>

-Que, X. Reed, S, 2000. Cysteine proteinase and the pathogenesis of amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews.* 13 (2) pp 196-206.

Quiroz, F. *Tratado de Anatomía Humana: Tomo 1. Trigésimo octava edición. PORRUA.* México. 2002:51-51

Sanabria-Castro A, Alvarado-Echeverria I, Monge-Bonilla C. 2017. Neurotransmisión coinérgica central: aspectos moleculares. *Revista mexicana de neurociencia.* 18(2):76-87.

Spalding TA, Burstein ES. 2006. Constitutive activity of muscarinic acetylcholine receptors. *J Recept Signal Transduct Res.* (26) 61–85.

-Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. (2012), "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", *Nature methods* 9(7): 676-682, PMID 22743772, doi:10.1038/nmeth.2019 (on Google Scholar).

-Salles, J. M., Moraes, L. A., & Salles, M. C. (2003). Hepatic amebiasis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 7(2), 96–110. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12959680>

-Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P., & Duncan, S. A. (2010). Organogenesis and development of the liver. *Developmental Cell*, 18(2), 175–189. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.01.011>

-Snell, R. 2006. *Neuroanatomía clínica*. 6° edición. Ed. Panamericana. Madrid, España Pág. 429-440.

Stanley, S. L. (2003). Amoebiasis. *The Lancet*, 361(9362), 1025–1034. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12830-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12830-9)

Steinman, L. (2004). Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nature Immunology*, 5(6), 575–581. <https://doi.org/10.1038/ni1078>

-Trejos-Suárez, J., & Castaño-Osorio, J. C. (2009). Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. *Infectio*, 13(2), 100–110. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(09\)70731-3](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(09)70731-3)

-Tortora G. Derrickson B. *Principios de Anatomía y Fisiología*. Décimo primera edición. Panamericana. México. 2006:412-420

-Vieira RMR. Amebíase e outras parasitoses intestinais no município de São João do Piauí, PI-Brasil. [Tese – Mestrado]. Universidade Federal Fluminense. Niterói, UFF; 2004

-Vivanco-Cid, H., Alpuche-Aranda, C., Wong-Baeza, I., Rocha-Ramírez, L. M., Rios-Sarabia, N., Estrada-Garcia, I., Isibasi, A. (2007). Lipopeptidephosphoglycan from *Entamoeba histolytica* activates human macrophages and dendritic cells and reaches their late endosomes. *Parasite Immunology*, 29(9), 467–474. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00963.x>

WRONA, D. (2006). Neural–immune interactions: An integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *Journal of Neuroimmunology*, 172(1–2), 38–58. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.10.017>

-Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A, Ramiro M, Cerritos R, González E, Hernández E, Oswaldo P. Novelities on amoebiasis: A neglected tropical disease. *J Global Infect Dis* 2011;3:166-74; DOI: 10.4103/0974-777X.8169



**Anexos**



**ANEXO A**

Preparación de cultivo Diamond.

**MEDIO DE CULTIVO DIAMOND**

Compuesto	Peso o volumen
Biosate o peptona	36.58g
Dextrosa	12.19g
Cloruro de sodio	2.43g
Fosfato de potasio mono básico	0.73g
Fosfato de potasio dibásico	1.21g
Cisteína	1.21g
Ácido ascórbico	0.243g
Citrato férrico de amonio	0.0287g
Agua tridestilada	1L

Procedimiento:

Se colocan todos y cada uno de los reactivos anteriores en un vaso de precipitado de 1 L y se disuelven en 750 mL de agua bidestilada.

Medir el pH y ajustarlo a 6.8 con NaOH 0.1 N.

Pasar esta solución a una probeta de 1 L y aforar hasta obtener un volumen de 1L.

Se colocan 7 mL de medio Diamond en tubos de vidrio de 11 mL y se tapan bien (aproximadamente se utilizan 144 tubos).

Se esterilizan a 15 lb de vapor durante 20 minutos.

Una vez enfriados los tubos se almacenan en refrigeración.

Lavado de amibas.

Procedimiento.

Esterilizar la campana de flujo laminar: Encendiendo la lámpara de luz UV durante 1 hora y posteriormente el flujo durante 10 minutos.

Aún prendido el flujo de la campana limpiamos nuestras manos con alcohol al 70% introducimos el material y reactivos para trabajar, y encendemos el mechero.

Con la ayuda de micropipetas y puntas estériles (evitando tocar superficies) preparamos el medio Diamond suplementado adicionando los siguientes reactivos:

Medio Diamond suplementado.

7ml	Medio Diamond
1000µl	Suero Bovino
200µl	Vitaminas
83µl	Antibiótico

Tomamos el tubo que contienen el cultivo axénico de amibas y lo agitamos suavemente para remover los detritus, posteriormente decantamos el medio desechándolo en el frasco con cloro para residuos biológicos.

Tomamos el tubo que contiene el medio Diamond suplementado y lo vaciamos al tubo que contiene las amibas. Se incuba nuevamente en la estufa a 36 °C.

Apagamos el mechero y el flujo de la campana, recogemos el material/reactivos, limpiamos con alcohol al 70% la superficie de la campana, bajamos la ventana de la campana, el frasco con cloro que contiene residuos biológicos lo dejamos reposar durante 24 horas para su inactivación y posterior limpieza.

Inoculación intrahepática de amibas

Procedimiento:

Esterilizar la campana de flujo laminar: Encendiendo la lámpara de luz UV durante 1 hora y posteriormente el flujo durante 10 minutos.

Aún prendido el flujo de la campana limpiamos nuestras manos con alcohol al 70 % introducimos el material y reactivos para trabajar, y encendemos el mechero.

Mientras tanto ponemos a enfriar en el refrigerador 4 tubos con medio Diamond sin suplementar.

Prender la centrifuga a 4 °C.

Preparar el set de cirugía: tabla de cirugía con papel extendido sobre ella, hilos para atar al hámster, gasas estériles, material quirúrgico en recipiente con Lugol como tijeras chicas y grandes, navaja, pinzas, la aguja no se esteriliza, hilo para cerrar la herida, balanza y bote para pesar al animal, rasuradora y guantes.

Amibas previamente crecidas en el medio Diamond se observan que sean abundantes al microscopio en los 4 tubos.

Ya en la campana: se prende el mechero y se pone alcohol en las manos para manipular, los tubos que contienen amibas se esteriliza la boca del tubo en el mechero y se inclina hacia arriba y abajo para decantar el medio conteniendo detritus en un recipiente de vidrio para desechos previamente esterilizado con alcohol, enseguida el tubo frío conteniendo el medio Diamond sin suplementar se esteriliza con el mechero y se le añade al tubo que contiene las amibas y se tapa y así sucesivamente con los otros tres tubos con amibas.

En la centrifuga poner durante 20 minutos los tubos conteniendo las amibas y el medio Diamond no suplementado.

Al término de este tiempo centrifugar durante otros 20 minutos a 4°C.

Pasar nuevamente a la campana, encender el mechero, decantar los tubos y con el medio que quede se re suspende utilizando una micropipeta y se colocan las amibas en un tubo de plástico con rosca y se recolectan ahí las amibas de todos los tubos, pasando por el mechero siempre la boca de los tubos.

Nota:

Antes de juntar las amibas se pueden resembrar las amibas (50  $\mu$ L) en otros tubos conteniendo el medio Diamond previamente suplementado para ser encubados a 36 °C.

Se hace una dilución con 10  $\mu$ L de azul y 10  $\mu$ L de la suspensión de amibas en un tubo eppendorf, y después se ponen 10  $\mu$ L en la cámara de neubauer. El

concentrado de amibas se pone a centrifugar nuevamente.

Se cuantifican las amibas en cuatro cuadrantes. (Suma total de amibas /4cuadrantes)(2)(10)(1000  $\mu$ L)= aprox 1 millón

Nota: Medio millón es suficiente para inocular al hamster

Después de centrifugar se decanta el medio y se añade 200  $\mu$ L de medio

Diamond sin suplementar y se re suspende con una jeringa de insulina usando una aguja azul y al final se le coloca a la jeringa su aguja y se pone este concentrado a refrigerar.

Pesar al hámster y anestesiarlo con pentobaribital, peso (g) x 0.063 + 5 = unidades.

Rasurar al animal.

Colocar al hámster sobre la tabla de cirugía y sujetarlo con los hilos.

Cortar con navaja poco a poco las capas de la piel ayudándose con las pinzas, levantar la capa interna y cortar.

Exponer el hígado y en el lóbulo que se vea inocular las amibas con la jeringa de insulina que se mantuvo en refrigeración, girar la jeringa antes de sacar para evitar sangrados. Nota: Se observa en el sitio de inoculación una burbuja blanca.

Se cose capa por capa de piel del hámster.

Se pone a recuperar al animal bajo una luz amarilla.

Llevar al hámster al bioterio.

En cuatro días es posible extraer las amibas del absceso hepático amibiano (AHA).

### Preparación de cortes histológicos

Fijación de tejidos

Cortes de tejido hay que fijarlos en p-formaldehído 4% o Formalina al 10 %.

Preparación de p-formaldehído 4%

Procedimiento para preparar p-formaldehido 4%, pH 7.2:

Poner a calentar a 70 °C PBS 1X.

Adicionar 4 g de p-formaldehido.

Agregar una pizca de NaOH, hasta que se aclare la solución.

Ajustar pH y el volumen final a 100 mL con PBS 1X.

Preparación del PBS-10 X

PBS-10X pH 7.4

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02M 2.72 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.08 M 11.3 g

NaCl 1.54 M 90 g

H<sub>2</sub>O destilada 1 L

Nota: PBS 1X: 100 mL PBS 10X + 900 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

#### Silanización de portaobjetos.

Procedimiento:

Sumergir los portaobjetos en extran: agua destilada por 1 hora, o dejarlos toda la noche.

Enjuagar con agua corriente y después con agua destilada.

Secar los portaobjetos muy bien con papel.

Ponerlos en canastillas listas para sumergir.

Colocar los portaobjetos en acetona grado reactivo por 5 minutos.

Sumergir durante 5 minutos la canastilla en una solución de Silano al 2 % (98mL de acetona + 2mL de (3-Aminopropyl)triethoxysilane, SIGMA A364, Refrigeración).

Hacer dos enjuagues rápidos en agua destilada (en dos recipientes).

Poner a secar los portaobjetos silanizados a una temperatura de 56 °C por 24 horas.

Sacarlos de la estufa y colocarlos en sus respectivas cajas y guardarlos y señalar que son silanizados.

(3-Aminopropyl)triethoxysilane: permite que el tejido se fije al portaobjeto y que durante la técnica no se despegue.

#### Instrucciones de manejo de histoquinet

Procedimiento:

Oprimir la tecla ↑↓ para subir y bajar el porta-cestas.

Verificar la posición del porta-cestas, se está en el último vaso de parafina oprimir la tecla ← para cambiar de lugar el portacestar al paso 1 que contiene agua destilada.

Colocar la canastilla con las cápsulas que contienen los tejidos a procesar.

Volver a oprimir la tecla ↑↓ para bajar el portacestar.

Oprimir la tecla START para comenzar el proceso, elegir primero el programa que se quiere llevar a cabo.

Luego oprimir la tecla TIMER para programar el tiempo del FIN DEL PROGRAMA, con las teclas UP y DOWN incrementar o decrementar el valor visualizado y con la tecla ENTER valida la opción o ajustes establecidos.

Al finalizar la programación del tiempo de FIN DE PROGRAMA oprimir la tecla START.

El objetivo del uso del HISTOQUINET es deshidratación, aclaración e infiltración de los tejidos.

Vaso no.1	Reactivo	Tiempo de inmersión (h)
1	Agua destilada	1
2	Alcohol 70%	1
3	Alcohol 80%	1
4	Alcohol 96%	1
5	Alcohol 96%	1
6	Alcohol 100%	1
7	Alcohol 100%	1
8	Alcohol 100%-Xilol (proporción 50:50)	1
9	Xilol	1
10	Xilol	1
11	parafina	1
12	Parafina	1

Cuando termina el programa suena la alarma para sacar los tejidos ya procesados. Oprimir la tecla STOP y luego  $\uparrow\downarrow$  para subir el protacestar y sacar la canastilla con los tejidos para proceder a incluirlos en bloques de parafina en la estación de inclusión.

### Inclusión de tejidos en bloques de parafina.

Procedimiento:

Encender la estación de inclusión en la parte posterior, luego oprimir el botón de Manual Mode (ON/OFF) verificar que la placa fría (COOL) y caliente (HEAT) este encendido el foco en verde.

Verificar que el contenedor de parafina no esté vacío si es así agregar hojuelas de parafina.

Esperar a que la temperatura de la parafina alcance una temperatura de 63°C para poder usarla.

Tomar el tejido de la placa caliente con una pinza y colocarlo en una base metálica dándole el sentido y ángulo que desee cortar, luego colocar 2 escuadras metálicas acomodando el tamaño del bloque de acuerdo al tejido.

Colocar una base de cassette plástico sobre las escuadras y se rellena con parafina caliente.

Pasar a la placa fría para que se solidifique y esperar a que se enfríe.

### Microtomia

Procedimiento:

El bloque se coloca en el micrótopo, aparto con el que se puede controlar el ángulo y grosor del corte.

Primero se tiene que rebanar el exceso de parafina y los primeros cortes, hasta que se descubra el tejido en el bloque.

Una vez que el tejido es visible, se procede a a hacer cortes, comúnmente a 5  $\mu\text{m}$ .



Los cortes salen como pequeñas rebanadas, pegadas en sus bordes lo que constituye una película de parafina. Hasta 5 a 8 cortes consecutivos son adecuados, es importante que los cortes no se doblen sobre sí o se arruguen. La película es transferida a un baño maría a 42° en donde se deja en la superficie para que se expanda.

Luego con ayuda con un portaobjetos recubierto con 3-aminopropyl triethoxysilane al 2%, se pesca una rebanada o más, se elimina el exceso de agua de la laminilla y se coloca en una superficie caliente para que se evapore el agua y el tejido se pique al portaobjetos por acción de calor.

Posteriormente los portaobjetos se transfieren a una estufa a 60 °C para desparafinarse por lo menos 1 hora. El objetivo de la desparafinación es para que el tejido quede bien fijado al portaobjetos y se quite el exceso de parafina para su deshidratación y tinción.

### Tinción hematoxilina y eosina

Procedimiento:

Los tejidos deben estar fijados con p-formaldehído al 4%.

Los cortes de parafina deben ser de 5 micras.

Se comienza por el desparafinado con xilol 2 lavados de 10 min cada uno.

Se continúa con el proceso de deshidratación en alcohol absoluto 2 lavados de 10 minutos, después en alcohol 96 ° durante 10 minutos, luego en alcohol 80° 10 minutos y se termina en agua destilada 10 minutos.

Se procede con la tinción en el primer colorante que la hematoxilina de harriss se sumergen en las laminillas durante 3 a 10 minutos (depende del tiempo de uso).

Luego se hace un lavado con agua corriente durante 15 minutos aproximadamente seguido de 2 lavados en agua destilada durante 10 minutos cada uno.

Se sumergen las laminillas en el segundo colorante que es la Eosina durante 30 segundos a 1 minuto y luego deshidratación.

Sumergir en alcohol 80° durante 10 minutos, después alcohol 96° 1 minutos, luego 2 veces alcohol absoluto 10 minutos y se finaliza con xilol 2 veces 10 minutos.

Poner el medio de montaje y el cubreobjetos.

Dejar secar.

Listo para observar.

RESULTADOS. Núcleos: azules. Citoplasma; rosa.

### Inmunofluorescencia

Preparación de cortes histológicos: Realizar cortes histológicos de 5 µm de grosor sobre laminillas recubiertas con 3-aminopropyl triethoxysilane al 2%.

Desparafinización: Las laminillas con los cortes histológicos se incuban a 56°C durante 7 horas y posteriormente proceder de la manera siguiente:

Procedimiento:

Desparafinizar e hidratar los cortes:

Xilol (2 veces/7 minutos).

Alcohol 100% (2 veces/7 minutos).

Alcohol 96% (2 veces/7 minutos).

Alcohol 70%(1 vez/5 minutos).

Aguas destilada (1 vez/10 minutos).

NOTA: Para cortes criopreservados, sacar las laminillas del congelador a -80°C y atemperarlas a temperatura ambiente durante 5 minutos. Pre enfriar acetona durante 30 minutos a -20°C y enseguida cubrir el tejido durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente lavar los tejidos con PBS 1x (4 veces/5 minutos).

Desenmascarar epítomos:

Manejo de la olla express: colocar dentro de la olla 1.5 L de buffer de citrato de sodio 1X y conectar la olla y presionar set (marcando los minutos poner unos 8 minutos, esto es para darle un precalentamiento sin que llegue a hervir con tapadera abierta) e introducir las laminillas a la olla (en un porta laminillas de metal), procurando que queden completamente

cubiertas por el buffer.

Encender la olla y dejar que la presión de la olla suba hasta que salga el vapor por la válvula y se deja 2 minutos.

Después se apaga y se dejan las laminillas reposar dentro de buffer 15 minutos.

A continuación, se pasan las laminillas a una caja Coplin que contiene PBS 1X.

Permeabilizar membranas:

Colocar laminillas en una solución de PBS + Tritón X-100 0.2% durante 30 minutos a temperatura ambiente

Lavar las laminillas con PBS 1X (1 vez/5min)

Delimitar el tejido de interés con el PAP pen (Z377821-1EA: Sigma)

Bloquear uniones inespecíficas:

Incubar las laminillas con Suero Bovino al 5%+ glicina 0.3M en PBS + Tritón X-100 0.2% durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Incubar con el primer anticuerpo primario:

Diluir el anticuerpo primario en PBS + Tritón X-100 0.2% + suero bovino, colocar 50  $\mu$ l del anticuerpo primario diluido al tejido e incubar durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C.

Lavar las laminillas con PBS + Tritón X-100 0.2% (3 veces/75 min).

Incubar con el primer anticuerpo secundario:

Diluir el anticuerpo en PBS+ suero bovino.

Colocar 50  $\mu$ l del anticuerpo primario diluido al tejido e incubar durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente, en oscuridad.

Lavar con PBS 1X (3 veces/ 5min).

Incubar con el segundo anticuerpo primario.

Diluir los anticuerpos primarios en PBS + suero bovino.

Colocar 50  $\mu$ l del anticuerpo primario diluido al tejido e incubar durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C.

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

Incubación con el segundo anticuerpo secundario:

Diluir el anticuerpo en PBS + suero bovino.

Colocar 50  $\mu$ l del anticuerpo secundario diluido al tejido e incubar durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente en oscuridad.

Lavar con PBS 1X (3veces/5min)

Teñir núcleos:

Colocar al tejido 50  $\mu$ l de Hoechst 1X e incubar en oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Lavar con PBS 1X (3 veces/5 min). Añadir sudan negro 0.5% (en alcohol al 70%) 10 min.

Lavar con PBS 1X (3 veces/5min).

Montar la preparación histológica:

Cubrir el tejido con 50  $\mu$ l de Glicergel (CO563;Dako) procurando no dejar burbujas.

Las laminillas se dejan secar durante 24 horas a 4°C.

Almacenar las laminillas en oscuridad a 4°C.

Revisar los cortes con microscopía de fluorescencia.

