



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES  
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA**

**Maestría en Ciencias Área: Toxicología**

*“Estrés oxidativo y procesos inflamatorios como  
mecanismos de daño en la amibiasis intestinal en  
hámster”*

**Tesis que presenta**

***Biol. Sandra Luz Martínez Hernández***

**Directores de Tesis:**

*PhD. María del Rosario Campos Esparza*

*Dr. Javier Ventura Juárez*

**Asesor**

*Dra. Eva María Salinas Miralles*

**Departamento de Microbiología**

**Aguascalientes, Ags., Octubre de 2012.**

---



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
Centro de Ciencias Básicas

BIOL. SANDRA LUZ MARTÍNEZ HERNÁNDEZ  
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN  
CIENCIAS EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA  
P R E S E N T E .

Estimado (a) alumno (a) Martínez:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"Estrés oxidativo y procesos inflamatorios como mecanismos de daño en la amibiasis intestinal en hámster"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE  
Aguascalientes, Ags., 5 de octubre de 2012  
"SE LUMEN PROFERRE"  
EL DECANO INTERINO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ CALLEGOS



c.c.p.- Archivo  
JJRG,mjda



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

Aguascalientes, Ciudad Universitaria a 5 de octubre de 2012.

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos

Decano interino del Centro de Ciencias Básicas

Universidad Autónoma de Aguascalientes,

Presente:

Por este conducto, hacemos de su conocimiento que la estudiante de la Maestría en Ciencias en el área de Toxicología, Bióloga Sandra Luz Martínez Hernández, ha cumplido con los objetivos y metas del proyecto de Maestría titulado: "Estrés Oxidativo y procesos inflamatorios como mecanismos de daño en la amibiasis intestinal en hámster", con lo que cumple con los requisitos para obtener el grado de Maestra en Ciencias, de igual manera, los abajo firmantes hemos revisado el contenido de la tesis y estamos de acuerdo con el contenido de la misma.

Sin más por el momento, nos despedimos de usted con un afectuoso saludo.

Atentamente,

Handwritten signature of Dr. En C. Javier Ventura Juárez.

Dr. En C. Javier Ventura Juárez

Co-director

Handwritten signature of PhD. María del Rosario Campos Esparza.

PhD. María del Rosario Campos Esparza

Co-directora

Handwritten signature of Dra. En C. Eva María Salina Miralles.

Dra. En C. Eva María Salina Miralles

Miembro del Comité Tutorial

### AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a Dios por darme la fuerza que necesito para poder cumplir todas las metas que me he propuesto en mi vida, por recordarme que la lucha sigue día con día, y que el máximo reconocimiento que puede tener una persona, es el reconocimiento que se hizo así mismo.

Quiero agradecerle a la Ph.D Maria del Rosario Campos Esparza, por la gran dedicación que tuvo conmigo durante esta valiosa etapa de mi vida, gracias por decirme que las cosas que uno hace en la vida se hacen bien o mejor no se hacen, gracias por los regaños y las llamadas de atención, gracias por los buenos consejos y gracias por ser un ejemplo de esfuerzo y de dedicación.

Al Dr. Javier Ventura Juárez por ayudarme, enseñarme y apoyarme en todas mis decisiones, por hacerme razonar y hacerme entender el porqué de las cosas, por permitir que formara parte de este gran grupo de amigos y de investigadores y por ser una gran persona.

Quiero agradecer a la Dra. Eva Maria Salinas Miralles, por ser el mejor ejemplo que he tenido como Maestra y como Investigadora, gracias por sus enseñanzas, gracias por hacer que me gustara la inmunología. Muchas gracias.

A mis padres por quererme, apoyarme y dejar que cumpla todos mis sueños y gracias por ser mis papas.

A mi esposo Victor porque esta Maestría la realizamos juntos, por apoyarme en cada fase de mi preparación y gracias por todos los momentos que me has dado, muchas gracias. Te amo

A mis grandes amigos del laboratorio: M. en C. Fabiola, Biol. Manuel, M en C. Esperanza, Biol. Leticia, Biol Norma, MedicoWilly, al Dr. Marcelo y Araceli.

---

*DEDICATORIAS*

Esta tesis de Maestría se la dedico a:

Mi esposo Victor, a mis hermanos Abraham y Denisse

y

A mi gran amigo Martin

Basta un poco de espíritu aventurero para estar siempre satisfechos, pues en esta vida,  
nada sucede como deseábamos, como suponíamos, ni como teníamos previsto.

**Índice General.**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Resumen en Español .....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>Resumen en Ingles .....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>1.- Introducción .....</b>  | <b>10</b> |
| 1.1. Amibiasis Intestinal .....  | 10        |
| 1.2. Factores de patogenicidad .....   | 12        |
| 1.3. Estrés oxidativo.....   | 13        |
| 1.4. Proceso inflamatorio durante el desarrollo de la amibiasis intestinal ..... | 15        |
| 1.5. Factor nuclear NF- $\kappa$ B.....  | 19        |
| 1.6. Muerte celular por apoptosis .....  | 21        |
| <b>2.- Antecedentes .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>3.- Justificación.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>4.- Hipótesis .....</b>   | <b>27</b> |
| <b>5.- Objetivo general .....</b>  | <b>28</b> |
| 5.1. Objetivos específicos. ....   | 28        |
| <b>6.- Material y métodos .....</b>  | <b>29</b> |
| 6.1. Modelo de amibiasis intestinal .....  | 29        |
| 6.1.1. Cultivo axénico de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....             | 29        |
| 6.1.2. Virulencia de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....                  | 29        |
| 6.1.3. Animales de experimentación .....   | 29        |

|  |           |
|--|-----------|
| 6.1.4. Técnica de asa cecal cerrada y lavada .....   | 30        |
| 6.1.5. Inducción de la amibiasis intestinal .....  | 30        |
| 6.2. Procesamiento de muestras histológicas .....  | 31        |
| 6.2.1. Preparación de tejido .....   | 31        |
| 6.2.2. Procesamiento de tejidos en parafina .....  | 31        |
| 6.2.3. Procesamiento de tejidos para Western-blot.....   | 31        |
| 6.2.4. Procesamiento de tejidos en congelación .....   | 31        |
| 6.3. Determinación del anión superóxido <i>in vivo</i> .....   | 31        |
| 6.4. Localización de antígenos.....  | 32        |
| 6.4.1. Técnica de inmunohistoquímica .....   | 32        |
| 6.4.2. Técnica de inmunofluorescencia indirecta.....   | 33        |
| 6.5. Obtención y cuantificación de proteínas.....  | 35        |
| 6.5.1. Extracción de proteínas.....  | 35        |
| 6.5.2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford .....   | 35        |
| 6.5.3. Separación y caracterización inmunológica de proteínas .....  | 35        |
| 6.5.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil Sulfato<br>Sódico (SDS-PAGE) .....  | 36        |
| 6.5.5. Electrotransferencia .....  | 36        |
| 6.5.6. Inmunodetección de proteínas .....  | 37        |
| 6.5.7. Análisis y cuantificación de proteínas.....   | 38        |
| <b>7.- Análisis estadístico .....</b>  | <b>39</b> |
| <b>8.- Resultados .....</b>  | <b>41</b> |
| 8.1. Localización de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en intestino de<br>hámster.....  | 41        |
| 8.2. <i>E. histolytica</i> provoca un aumento de especies reactivas de<br>oxígeno durante el proceso de infección.....                           | 42        |
| 8.3. <i>E. histolytica</i> induce la producción de IL8 en células epiteliales<br>y de la respuesta inflamatoria en el intestino de hámster ..... | 47        |
| 8.4. <i>E. histolytica</i> no participa en la activación del factor nuclear $\kappa$ B en células<br>epiteliales.....                            | 53        |

8.5. Localización de caspasa 3 activa en ciego de hámster  
con amibiasis ..... 56

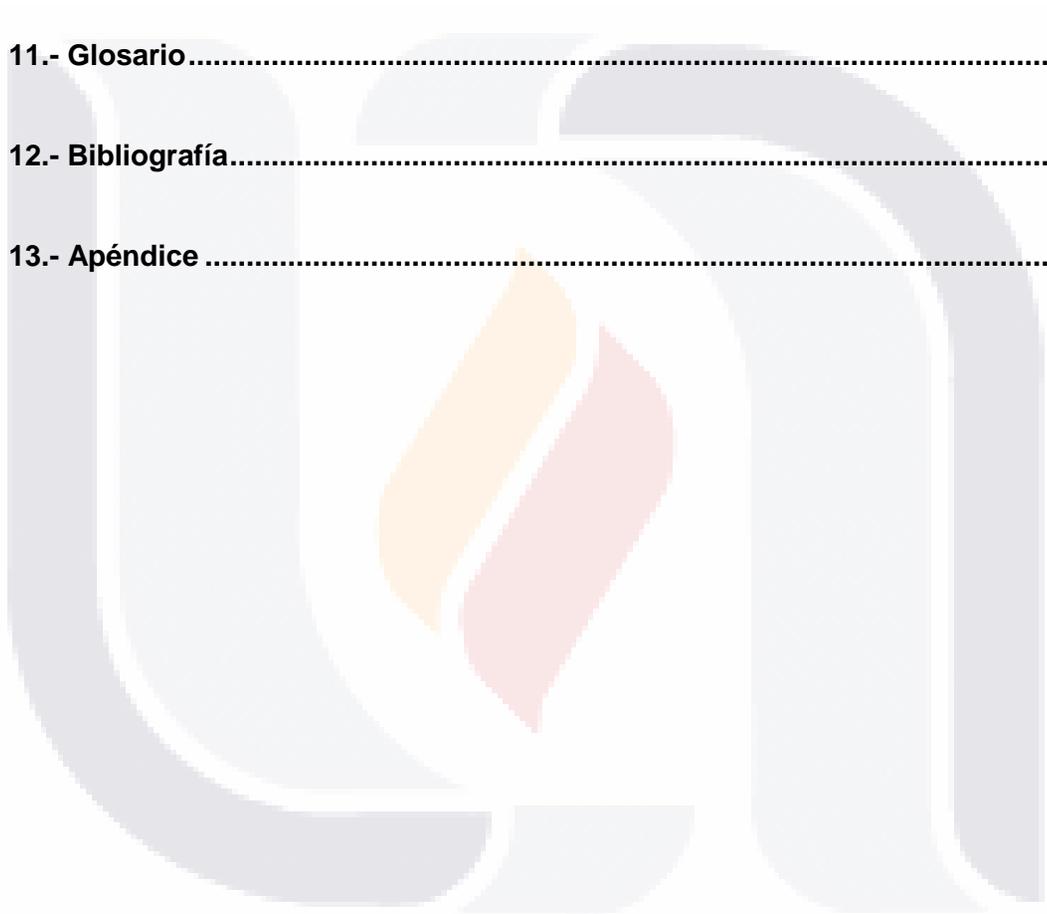
**9.- Discusión ..... 60**

**10.- Conclusion ..... 68**

**11.- Glosario ..... 69**

**12.- Bibliografía ..... 71**

**13.- Apéndice ..... 87**

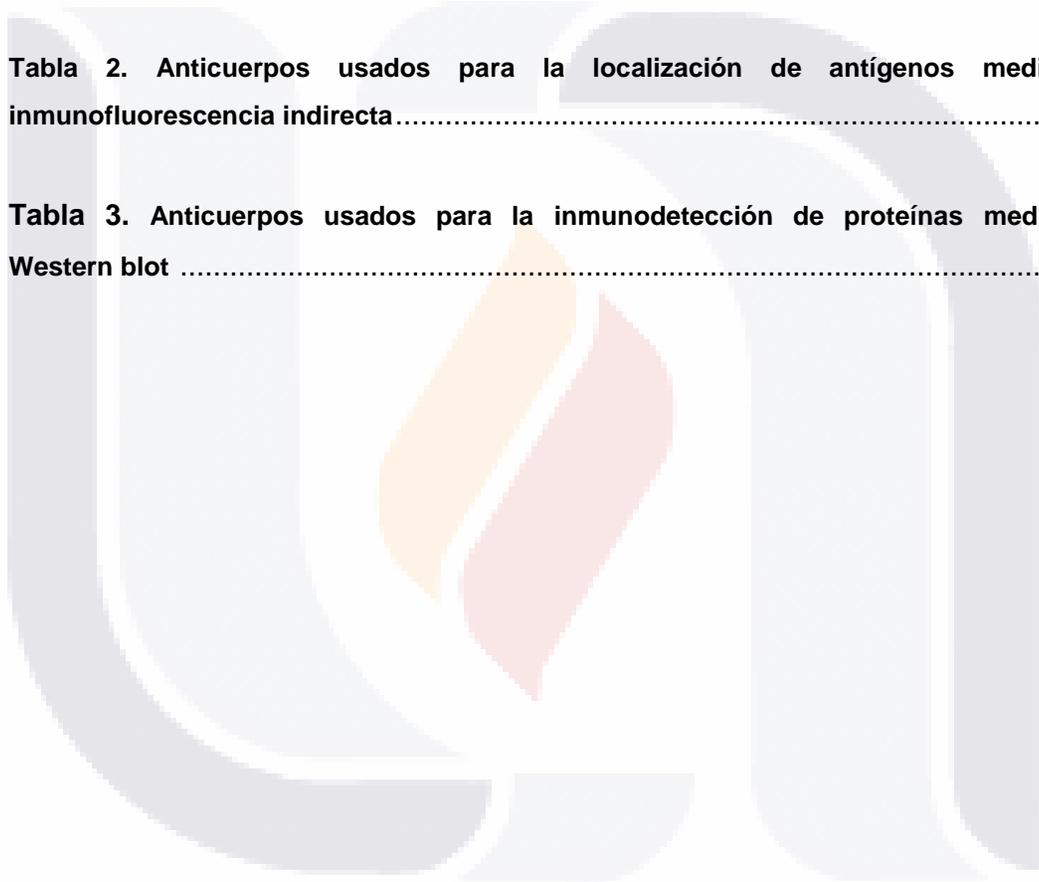


***Índice de Tablas***

**Tabla 1. Anticuerpos usados para la localización de antígenos mediante inmunohistoquímica..... 37**

**Tabla 2. Anticuerpos usados para la localización de antígenos mediante inmunofluorescencia indirecta..... 39**

**Tabla 3. Anticuerpos usados para la inmunodetección de proteínas mediante Western blot ..... 38**



**Índice de Gráficas**

**Localización de trofozoitos de *E. histolytica* en intestino de hámster**

Figura 3. Localización de trofozoítos de *E. histolytica* en el asa cecal de hámster.  
..... 41

***E. histolytica* provoca aumento de especies reactivas de oxígeno durante el proceso de infección.**

Figura 4. *E. histolytica* en etapas tempranas estimula la producción de ROS en células epiteliales. .... 43

Figura 5. *E. histolytica* induce ROS en células epiteliales y de la lámina propia.  
..... 45

Figura 6. Durante la infección por *E. histolytica*, las ROS se mantienen constantes.  
..... 46

***E. histolytica* induce la producción de IL-8 en células epiteliales y de la respuesta inflamatoria en el intestino de hámster.**

Figura 7. *E. histolytica* estimula la producción de IL-8 en células de la mucosa Intestinal. .... 48

Figura 8. *La infección por E. histolytica induce la expresión de IL-8 en células de la respuesta inflamatoria*..... 50

Figura 9. *La infección por E. histolytica induce la expresión de IL8 en células de la respuesta inflamatoria en la serosa del intestino*..... 52

***E. histolytica no induce la activación del factor nuclear  $\kappa$ B en células epiteliales.***

Figura 10. *NF- $\kappa$ B fosforilado en lesiones amibianas* ..... 54

Figura 11. *E. histolytica no estimula la activación de p65* ..... 55

***Localización de caspasa 3 activa en ciego de hámster con amibiasis***

Figura 12. *E. histolytica activa la caspasa 3 en células inflamatorias*. ..... 56

Figura 13. *E. histolytica induce la activación de caspasa 3 en el ciego de hámster*.  
..... 57

## **Resumen**

La amibiasis es una infección entérica causada por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*). Esta enfermedad afecta a 50 millones de personas en el mundo, causando 100,000 muertes por año. La principal característica de este parásito es el gran poder citotóxico que le permite invadir y destruir los tejidos humanos. Con el fin de estudiar y profundizar en el conocimiento sobre los mecanismos a través de los cuales *E. histolytica* produce daño durante su proceso de invasión, en este trabajo analizamos el papel que juegan las especies reactivas de oxígeno (ROS), los factores de transcripción y las citocinas de la respuesta inmune innata en el proceso de invasión en interacciones de 5, 10 y 20 h en un modelo de amibiasis intestinal en hámster. Nuestros resultados muestran que durante la infección, los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de estimular en las células del huésped, un aumento en los niveles intracelulares de ROS durante el desarrollo de la infección; pudimos observar que gran parte de las células de la mucosa intestinal fueron las que respondieron constantemente al estrés celular. Por otro lado se observó que *E. histolytica* induce una respuesta en el huésped, que incluye la expresión de citocinas proinflamatorias como la interleucina 8 (IL-8) y dependiendo de la localización del parásito en el tejido, fueron distintas las líneas celulares en liberar esta citocina, encontramos que en interacciones tempranas, las células epiteliales de la mucosa intestinal son las responsables de la liberación de IL-8, en lapsos tardíos, las células epiteliales dejan de expresar esta citocina y su producción la llevan a cabo las células del infiltrado inflamatorio. Así mismo pudimos observar que durante la invasión el parásito no es capaz de estimular la activación del NF- $\kappa$ B. Por otro lado se analizó el tipo de muerte celular inducida en la amibiasis intestinal mediante Western blot, y se observó la presencia de caspasa 3 positiva (10 y 20 h post-infección) en células intestinales, estos datos nos sugieren que *E. histolytica* induce muerte celular por apoptosis dependiente de caspasa.

En conclusión estos resultados demuestran que *E. histolytica* induce formación de especies reactivas de oxígeno y citocinas pro-inflamatorias en células intestinales de hámster, provocando muerte por apoptosis dependiente de caspasa.

## Summary

Amebiasis is an infection caused by enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*). This disease affects 50 million people worldwide, causing 100,000 deaths per year. The main characteristic of this parasite is its great cytotoxic power by which it invades and destroys human tissues. The aim of this research was to study and deepen knowledge about the mechanisms by means of which *E. histolytica* causes damage during the invasion process. In this paper we analyze the role of reactive oxygen species, transcription factors and innate immune response cytokines during the invasion process, at interactions of 5, 10 and 20 hours in a hamster model of intestinal amoebiasis. Our results show that during infection, the trophozoites of *E. histolytica* are able to stimulate the host cells inducing an increase in intracellular levels of ROS during the course of infection. We observed that much of the intestinal mucosal cells were constantly responding to cellular stress. On the other hand, it was observed that *E. histolytica* induces a response in the host, including the expression of proinflammatory cytokines such as interleukin 8 (IL-8) although the cell types that release this cytokine depend on the location of the parasite in the tissue. We found that at early interactions, epithelial cells of the intestinal mucosa are responsible for the release of IL-8. In late periods, the epithelial cells fail to express this cytokine, and its production was carried by inflammatory cells. Also, the parasite is not able to activate NF- $\kappa$ B to establish the inflammatory process. On the other hand we analyze the type of cell death induced during intestinal amoebiasis by Western blot, and observed the presence of intestinal cells caspase 3 positive (10 and 20 h post-infection). These data suggest that *E. histolytica* induces cell death by caspase-dependent apoptosis.

In conclusion these results show that *E. histolytica* induces formation of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines in hamster intestinal cells, causing death by caspase-dependent apoptosis.

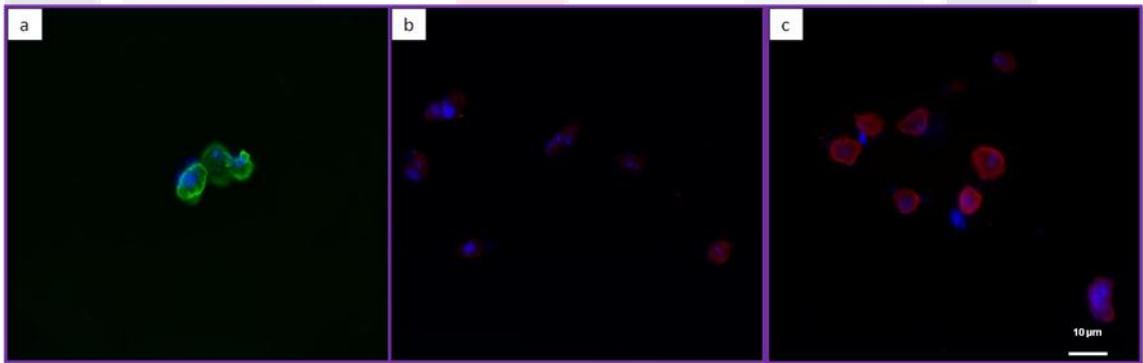
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Amibiasis intestinal.

La amibiasis es una infección entérica causada por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*). Esta enfermedad afecta a 50 millones de personas en el mundo, causando 100,000 muertes por año. La magnitud del problema en México es tal que la amibiasis es la principal causa de muerte por parasitosis, se estima que un 20 a 25% de la población podría estar infectada (Caballero y cols., 1994). *E. histolytica* se presenta en el humano bajo dos estadios: uno que le permite llevar a cabo su diseminación (quiste), así como el que causa la enfermedad en el hospedero (trofozoíto). El quiste es de forma redondeada o ligeramente ovalada, mide de 10 - 16  $\mu\text{m}$  de diámetro, está cubierto por un polímero de n-acetilglucosamina conocido como quitina. Su citoplasma es incoloro y presenta de 1 - 4 núcleos. El trofozoíto es anaerobio facultativo de 10 - 40  $\mu\text{m}$  de diámetro, muy activo y pleomórfico, su citoplasma carece de algunos organelos que se encuentran en la mayoría de los eucariontes como son: mitocondrias, sistema de lisosomas primarios y secundarios, retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Martínez-Palomo, 1987).

El ciclo de vida de *E. histolytica* comienza con la ingesta de un quiste infeccioso, el cual es reblandecido por los jugos gástricos y pancreáticos, permitiendo su exquistación en el intestino grueso en donde puede desarrollar una infección invasora o no. Al romperse el quiste, el trofozoíto termina su proceso de división y da lugar a 4 trofozoítos metaquísticos, los cuales pueden introducirse en el tejido intestinal y provocar una serie de alteraciones anatómicas de acuerdo con su localización, que pueden ir desde una colitis ulcerativa a una apendicitis amebiana, pasando por el megacolon tóxico y el ameboma (Gómez y cols., 2007). Durante este proceso el moco, la primera capa que protege al epitelio del colon contra virus, bacterias y parásitos (Belley y cols., 1999), se ve severamente alterado ya que este parásito puede degradar, unirse o internalizarse en la mucina (Connaris y Greenwell, 1997) dando

como resultado una depresión mucopénica; Incluso tienen la capacidad de inducir la secreción de un moco de composición diferente a la ya existente en la mucosa por las células caliciformes del epitelio intestinal (Chadee y cols., 1991). Conforme se lleva a cabo esto se puede apreciar la formación de úlceras localizadas en el colon predominantemente en el ciego, el sigmoide y el recto. Estas úlceras presentan dos patrones definidos, nodular e irregular. **Las úlceras nodulares** son redondeadas, de un diámetro entre 1 y 5 mm, con áreas de mucosa ligeramente elevadas y áreas necróticas, deprimidas o hemorrágicas rodeadas por un borde de tejido edematoso. A menudo estas áreas están llenas de un material mucoso y amarillento denominadas como úlceras en botón de camisa. **Las úlceras irregulares** tienen de 1 a 5 cm de longitud, se encuentran habitualmente en el ciego y en el colon ascendente, sus márgenes suelen ser elevados, edematosos y la ulcera se llena de fibrina (Gómez y cols., 2007). *E. histolytica* aparte de causar daño en la mucosa intestinal, tiene la capacidad de invadir otros órganos, dependiendo de la susceptibilidad del paciente y de los factores de patogenicidad del parásito (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 1991). Por otro lado si no se introduce en el tejido, el trofozoíto inicia su proceso de enquistación con la formación de un prequiste mononuclear el cual será eliminado a través de las heces fecales.



**Figura 1. Trofozoítos de *E. histolytica in vitro*:** cultivos de trofozoítos axénicos identificados mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (microscopio axio visión release 4.6.3 sp1). Localización de (a) antígenos de *E. histolytica* (verde) (b) adhesina tipo lectina de 140 kDa (rojo) (c) adhesina tipo lectina de 220 kDa (rojo). En azul se detectan los núcleos marcados con Hoechst.

## **1.2 Factores de patogenicidad.**

*E. histolytica* presenta un conjunto de factores que le permiten llevar a cabo el proceso de invasión y destrucción en el tejido intestinal. Estos le confieren al parásito 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 lectina, el amebaporo, cisteín-proteasas, colagenasas, hialuronidasas, neuraminidasas, toxinas, lipofosfogluanos y lipo-proteofosfogluanos.

**A. Lectinas:** las adhesinas tipo lectina tienen diferentes pesos moleculares: 260 kDa, 220 kDa, 170 kDa, 140 kDa y 112 kDa que le permiten adherirse a la mucosa del epitelio 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 de membrana de los eritrocitos, células inmunes y de matriz extracelular (Meza y cols., 1994). La lectina de 260 kDa 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 la apoptosis (Huston y cols., 2003). La lectina de 220 kDa, (Fig. 1) tiene afinidad principalmente por células inmunes, se caracteriza por su actividad inmunomoduladora disminuyendo citocinas Th1 y aumentando citocinas Th2 (Bekker-Méndez y cols., 2006).

Las lectinas de 112 kDa y de 140 kDa se han descrito como lectinas tipo integrinas que participan en la migración e invasión ya que tiene afinidad por azúcares de matriz extracelular (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 1991).

**B. Amebaporos:** son proteínas ubicadas dentro de vesículas citoplasmáticas, formadas por 4 hélices alfa, con 3 isoformas denominadas A, B y C. La isoforma C es la más activa, produciendo estructuras tipo canal que permiten el paso de iones, agua y moléculas pequeñas provocando cambios osmóticos a nivel de membrana celular de las células del huésped. (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000; Petri, 2002).

**C. Cisteín-proteasas:** enzimas con capacidad para digerir constituyentes de la matriz extracelular, tales como la fibronectina, laminina, colágeno tipo I y IV (Gómez y cols., 2007). Existen al menos 50 cisteín-proteasas, sin embargo, sólo EhCP2, EhCP1 y EhCP5 son responsables de aproximadamente el 90% de la actividad proteasa de este parásito, donde la de mayor importancia es la EhCP5 (Casados-Vázquez y cols., 2010). En general estas enzimas, 1) rompen la capa de mucina en su dominio carboxiterminal, 2) degradan directamente la IgA y realizan disrupción de IgG, 3) confieren resistencia a la lisis mediada por el complemento, interrumpiendo la amplificación de la respuesta inmune a través de la degradación de las anafilotoxinas C3a, C5a (Que y Reed, 2000).

**D. Colagenasas, hialorunidasas y neuraminidasas:** enzimas encargadas de digerir matriz extracelular en procesos invasivos.

**E. Lipofosfogluanos y lipopeptidofosfogluanos:** son un complejo de macromoléculas encontradas en la superficie de los trofozoítos, tienen la capacidad de interactuar con células dendríticas y macrófagos permitiendo activar la respuesta inmune del huésped (Vivanco-Cid y cols., 2007).

### **1.3 Estrés oxidativo.**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas juegan un papel central en el equilibrio homeostático celular (Finkel y Holbrook, 2000). Sin embargo, cuando el aumento del contenido intracelular de ROS sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos (Gamaley y Kluybin, 1999).

Las ROS también están implicadas en una amplia gama de enfermedades del tracto gastrointestinal, ya que desempeñan una función fisiológica importante y puede también ser causantes de grandes daños a nivel celular o tisular. En la mitocondria se estima que del 2 - 4% del oxígeno consumido durante el transporte de electrones no se reduce a agua por la citocromo c oxidasa, sino que se forma el anión semiquinona el cual puede transferir uno o dos electrones al oxígeno molecular con la subsecuente formación del anión superóxido ( $O_2^-$ ), que a su vez, puede generar otras ROS. Las ROS en exceso reaccionan con toda clase de macromoléculas que causan anomalías, citotoxicidad y daño mutagénico (Finkel y Holbrook, 2000). El  $O_2^-$  es convertido a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) espontáneamente o por vía enzimática, el peróxido de hidrogeno formado, a su vez puede formar el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) el cual es sumamente reactivo. Otras fuentes de  $O_2^-$  y de  $H_2O_2$  son las enzimas oxidativas, como la xantín oxidasa, las NADPH oxidasa, la acil-CoA oxidasa y el citocromo P-450, además de pequeñas moléculas auto-oxidables como las catecolaminas y las quinonas. El  $O_2^-$  puede atravesar las membranas sólo a través de canales aniónicos (Lynch y Fridovich, 1978), actúa como un electrófilo y nucleófilo, y potencialmente forma más especies reactivas a través de reacciones secundarias (Halliwell y Gutteridge, 1984). En el sistema inmunológico de los organismos, en especial las células fagocíticas, se generan una importante cantidad de  $H_2O_2$ , mediante la NADPH oxidasa. Aunque las células no fagocíticas también generan  $H_2O_2$  mediante NADPH oxidasa, ésta es estructural y genéticamente diferente, y su tasa de generación es apenas el 1% del generado por las células fagocíticas. En general las ROS produce daños al ADN, a las membranas celulares y causan modificaciones en los aminoácidos (Avello y Suwalsky, 2006). Probablemente, de las ROS generadas en los procesos fisiológicos, la más importante en cuanto a su grado de reactividad con los sistemas biológicos es el  $OH^\cdot$ . El  $OH^\cdot$  participa en la abstracción de hidrógenos de moléculas orgánicas (fosfolípidos, nucleótidos y deoxirribosa), adición, y transferencia de electrones, es sumamente tóxico como resultado de su alta reactividad y baja selectividad en lo que se refiere al sustrato. Su eliminación debe de llevarse de forma rápida y eficaz para evitar el daño directo a moléculas como el ADN, proteínas y lípidos (Vargas y cols., 2007).

*E. histolytica* presenta una clara defensa contra las ROS provenientes de las células inmunes (Revisado en Mortimer y Chadee, 2010) ya que recluta un antioxidante tiol-específico por la lectina Gal-Gal-NAc para su propia defensa (Hughes y Petri, 2003). Además el trofozoíto resiste la acción tóxica del neutrófilo gracias a una ferro-superóxido dismutasa. El peróxido producido se elimina a través de una proteína rica en cisteína, de 29 kDa, que suple a la catalasa que no contienen los neutrófilos (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000; Petri, 2002).

Asimismo, las ROS recientemente se han considerado como importantes mensajeros intracelulares en las vías de señalización para la inducción de la apoptosis (Banki y cols., 1999; Forman y Torres, 2002), activando directamente a las proteínas-quinasas activadas por mitógenos (MAPK) en el sistema de muerte celular (Zhang y cols., 2003). Este efecto se observó con la interacción *in vitro* de trofozoítos y neutrófilos en donde se indujo apoptosis en neutrófilos a través de la interacción con la  $\beta 2$  integrina activando la vía fosfatidilinositol-3-quinasa (Sim y cols., 2007). También se ha visto que dicha apoptosis es mediada por la NADPH oxidasa inductora de ROS con la consecuente activación de la vía de cinasas del receptor extracelular (ERK)1/2 (Sim y cols., 2005).

#### **1.4 Proceso inflamatorio durante el desarrollo de la amibiasis intestinal.**

La infección por *E. histolytica* en el colon se produce de forma gradual. Se inicia con la colonización de la capa de mucina, que es seguida por la estimulación de una respuesta inflamatoria importante para la eliminación en algunos casos del parásito. La inmunidad innata juega un papel muy importante en la defensa del huésped contra el parásito, ya que representa el primer sistema defensivo del organismo y es de especial importancia para la protección contra los agentes infecciosos. Los mecanismos que conforman la inmunidad innata están constituidos por las llamadas barreras naturales como la piel y mucosas, además de por múltiples moléculas y células con actividad defensiva.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Las barreras naturales, además de actuar aislando al individuo del exterior, también cuentan con función bactericida y promotora de la inflamación. Dentro de las moléculas que integran los componentes solubles de la inmunidad innata se encuentran ciertas citocinas, quimiocinas y factores del complemento.

Las citocinas son moléculas solubles inmunomoduladoras clasificadas en dos tipos: 1) pro-inflamatorias como interleucina (IL) IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferón gamma (INF- $\gamma$ ), poseen una acción relevante como elementos de la inflamación, contribuyendo al inicio de la respuesta inmune adaptativa y 2) anti-inflamatorias como IL-10 y el factor transformador del crecimiento beta (TGF- $\beta$ ), que modulan la respuesta inflamatoria (Abbas, 2002). En el caso particular de la infección por *E. histolytica*, citocinas como la IL-6 y la IL-4 (Th1/2) y citocinas reguladoras, como las IL-10 y el TGF- $\beta$ , están asociados en el desarrollo de la amibiasis (García-Zepeda y cols., 2007).

Las quimiocinas son polipéptidos de 8 a 12 kDa, consideradas como potentes quimioatrayentes de leucocitos. Son producidas por varios tipos celulares y están involucradas en el proceso inflamatorio actuando sobre neutrófilos, monocitos, linfocitos y eosinófilos. Existen aproximadamente 50 quimiocinas diferentes, divididas en cuatro subfamilias: (CC, CXC, C y CX3C), de las cuales la CC, CXC son de las subfamilias principales. Las quimiocinas CXC (poseen dos residuos de cisteína separadas por un aminoácido cualquiera) y quimiocinas CC (poseen dos residuos de cisteína adyacentes) (Regueiro y cols., 2002). Entre las principales quimiocinas de la inmunidad innata se encuentra la IL-8 (CXCL8), que intervienen atrayendo nuevas células al foco inflamatorio en caso de una agresión por patógenos. Se ha descrito que *E. histolytica* a través de la secreción de componentes proteicos, puede aumentar notablemente los niveles de la IL-8 con la finalidad de atraer y activar neutrófilos (PMN) en los sitios de lesión, células importantes para el desarrollo de este proceso (Yu y Chadee, 1998).

El complemento es uno de los principales mecanismos efectores de la inmunidad humoral, está constituido por proteínas séricas y de la superficie celular que

---

interaccionan entre sí y con otras moléculas del sistema inmunitario. Los factores del complemento potencian la inflamación, la fagocitosis y actúan produciendo la lisis de células y microorganismos. Su activación puede ser a través de tres vías: 1) clásica, 2) alternativa y 3) de las lectinas (Abbas y cols., 2002). Durante el desarrollo de la infección por *E. histolytica* se ha observado que a través de las cisteín-proteasas puede haber una degradación de C3a y C5 permitiendo con esto la evasión de la respuesta inmune (Reed y cols., 1995). Por otra parte, se ha descrito la presencia de una molécula semejante al CD59 (Ventura-Juárez y cols., 2009) la cual inhibe el ensamblaje del complejo de ataque a la membrana, impidiendo la lisis del parásito.

Los principales componentes de la inmunidad innata son los neutrófilos, monocitos/macrófagos y células epiteliales, células que contribuyen a los procesos inflamatorios durante la amibiasis intestinal. El papel principal de los neutrófilos en la respuesta inflamatoria aguda es encontrar y destruir patógenos invasores por medio de la fagocitosis o la liberación de ROS, como el  $O_2^-$  y el  $OH^-$  y/o enzimas proteolíticas (Sim y cols., 2007). Cuando se desarrolla el proceso de invasión y daño en el tejido, los neutrófilos son las primeras células en responder ante la invasión amibiana, los cuales se adhieren a los trofozoítos y pueden, algunas veces, estar polarizados en un extremo del parásito, sugiriéndose que se unen a receptores de superficie de la amiba. Sin embargo, aunque estas células responden rápidamente a las primeras etapas de la invasión (Jarillo-Luna y cols., 2002), se ha observado que no son importantes para la eliminación de *E. histolytica* (Revisado en Guo y cols., 2007). Se conoce que el daño tisular que se puede estar llevando a cabo en el proceso de invasión en gran parte es ocasionado por la liberación de componentes citotóxicos de estas y otras células inmunes alejadas al sitio de infección en gran medida por la liberación de ROS, así como de óxido nítrico (ON). Se ha propuesto que altas concentraciones de ON puedan dañar más a las células del huésped que a los trofozoítos.

Otro tipo de células que desempeñan papeles cruciales en la inmunidad innata y adaptativa, debido a su carácter para la eliminación de los microorganismos son los macrófagos que responden a los microorganismos con casi la misma rapidez que los neutrófilos, pero persisten mucho más tiempo en los sitios de inflamación. Por

consiguiente, los macrófagos son las células efectoras dominantes de las fases tardías de la respuesta inmunitaria innata, uno o dos días después de la infección, tienen una vida media más prolongada que los neutrófilos y, a diferencia de éstos, no están terminalmente diferenciados y pueden dividirse en el sitio de inflamación. Dentro de los receptores principales de estas células se encuentran las proteínas del complemento, receptores de reconocimiento de patrones (RRP), receptores de la región constante de diferentes anticuerpos como son las clases IgG e IgA y receptores de citocinas y quimiocinas (Abbas y cols., 2002). Los macrófagos, tienen gran actividad amebicida cuando son activados *in vitro* por INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , lipopolisacáridos y factor estimulante de colonias 1 (FEC-1). La infección por *E. histolytica* se asocia con alteración en la función de los macrófagos (Campbell y Chadee, 1997) ya que la ameba causa lisis directa de los macrófagos y otras células. Se ha observado que macrófagos activados con linfocinas destruyen un 55 % de amebas (3 h), pero al mismo tiempo un 40 % de los macrófagos son destruidos. La muerte de los macrófagos parece más bien deberse al efecto deletéreo de los lisados amebianos que al efecto dependiente de contacto de las amebas. El mecanismo efector de los macrófagos depende del contacto directo célula-patógeno, de la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de mecanismos no oxidativos (Salata y Radvin, 1985).

Las células epiteliales juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria durante la invasión por *E. histolytica*, estas células son capaces de reconocer patrones moleculares encontrados en la superficie del parásito, gracias a la presencia de receptores tipo Toll (TLR). Estos receptores en el humano constan de una familia de 13 receptores (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12) (McGuinness y cols., 2003; Takeuchi y Akira, 2010), en el genoma murino podemos encontrar 12 receptores (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12, TLR13) dentro de los cuales los más importantes para el reconocimiento de *E. histolytica*, son los TLR 2 y 4 (Maldonado-Bernal y cols., 2005), los cuales una vez activados conducen a la translocación de diversos factores de transcripción que codifican para diferentes quimiocinas y citocinas, tales como: IL-1 ( $\beta/\alpha$ ), IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos

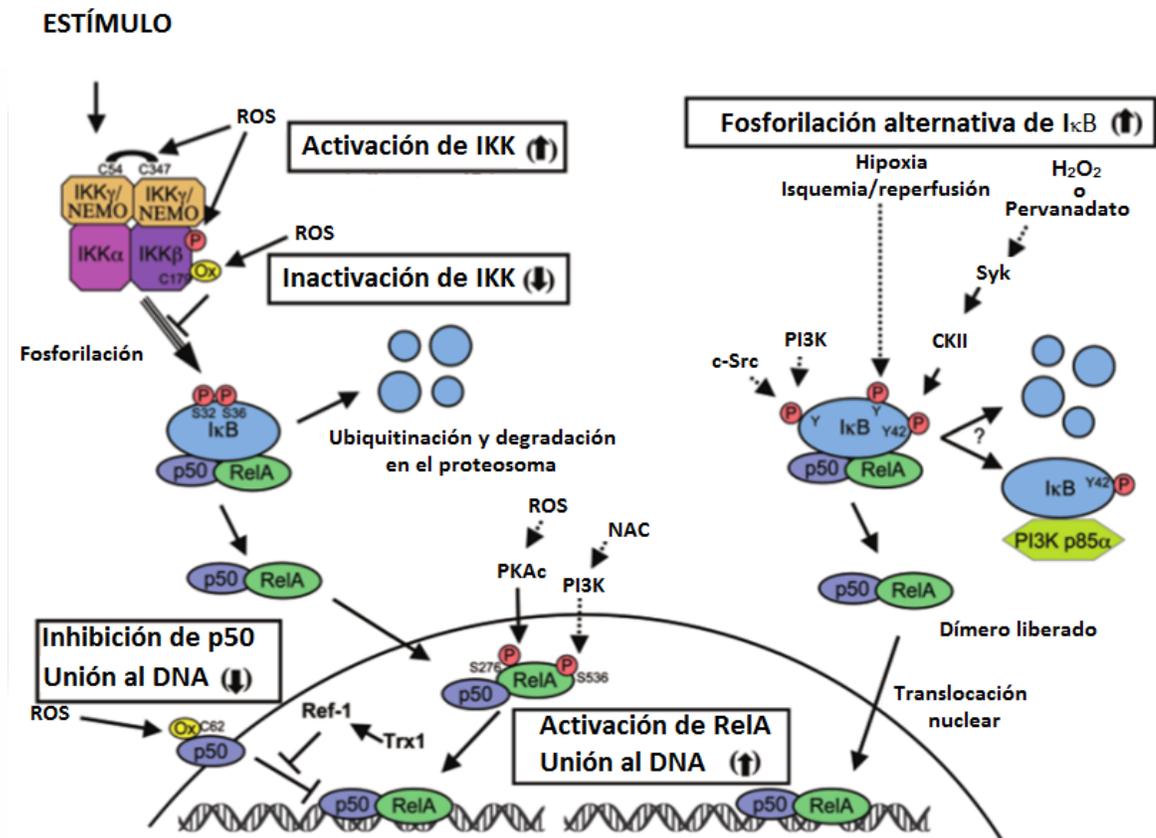
(CSF-GM), proteína quimio-atrayente de monocitos 1 (Revisado en Mortimer, y Chadee, 2010) CXCL8, CCL2, CCL3 y CCL5 (Dey y Chadee, 2008).

### **1.5 Factor nuclear $\kappa$ B.**

El factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) es un factor de transcripción pleiotrópico que regula diversas funciones celulares que van desde la respuesta inflamatoria a la proliferación y muerte celular. Las proteínas NF- $\kappa$ B de mamíferos constan de cinco miembros diferentes de una familia (RelA (p65), RelB, cREL p50 y p52) relacionadas entre sí, las cuales se unen como homodímeros o heterodímeros a segmentos  $\kappa$ B del ADN de 10 pares de bases. En el citoplasma el NF- $\kappa$ B (p50/p65) se encuentra como un dímero inactivo unido a las proteínas inhibidoras  $\kappa$ B. Al recibir determinados estímulos como factores de crecimiento, citocinas inflamatorias, TNF, ROS y productos virales, se produce la activación de cinasas del I $\kappa$ B (IKK) que fosforilan la región consenso del extremo N-terminal de I $\kappa$ B. Esto da como resultado la liberación del NF- $\kappa$ B, de su inhibidor, su translocación al núcleo y su unión a los elementos de respuesta a NF- $\kappa$ B, seguido de una activación transcripcional de genes asociados (Morgan y Liu, 2011). La vía NF- $\kappa$ B se activa en su mayoría por la estimulación de los receptores proinflamatorios, como la superfamilia TNF, la familia de los TLRs, receptores para citocinas, y también se ha observado su activación por agentes genotóxicos. La actividad de los I $\kappa$ Bs se controla a través de la fosforilación de I $\kappa$ B cinasas (IKKS) (Bonizzi y Karin, 2004; Beinke y Ley, 2004; Hayden y Ghosh, 2008; Vallabhapurapu y Karin, 2009). Se ha observado que en ausencia de NF- $\kappa$ B, el TNF es capaz de activar la cascada de proteasas específicas de la apoptosis (caspasas) y de activar la proteína Bid, que es un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2, y cuya función es la de trasladarse a la mitocondria y liberar el citocromo c y otros factores proapoptóticos de la mitocondria.

No es sorprendente que las ROS puedan modular la respuesta del NF- $\kappa$ B y que los genes regulados por el NF- $\kappa$ B pueden atenuar la cantidad de ROS para promover la supervivencia. Una de las principales vías de señalización que se intersecta con el NF-

κB en lo que respecta a ROS y la muerte celular, es la interferencia que se produce entre NF-κB y la cinasa N-terminal de Jun (JNK). Esta interferencia de NF-κB a JNK se sabe que puede prevenir la activación continua de JNK y prevenir así a la célula de la muerte por apoptosis y necrosis (Reuther-Madrid, 2002; Morgan y cols., 2008).



**Figura 2. Participación de la ROS en las vías de señalización del NF-κB.** La participación de las ROS en la vía del NF-κB puede llevarse a cabo mediante procesos de activación o de inhibición. Las ROS cuando llevan a cabo la activación lo hacen a través de la fosforilación del complejo IκBα (el cual es rápidamente degradado en el proteosoma dejando libre la porción p50/RelA). Cuando se lleva a cabo la inhibición las ROS pueden influir en la unión de las proteínas del NF-κB al núcleo, mediante la oxidación del dominio de unión de la subunidad p50 (Modificado de Morgan y Liu., 2011).

Una de las maneras más importantes en que la actividad del NF- $\kappa$ B influye en los niveles de ROS es a través de una mayor expresión de proteínas antioxidantes como la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD, o SOD2) (Das y cols, 1995; Jones y Ping, 1997), la superóxido dismutasa cobre-zinc (Cu, Zn-SOD, o SOD1) (Rojo y cols., 2004), entre otras. Dado que el NF- $\kappa$ B es importante en la inflamación, algunas enzimas que promueven la producción de ROS también están reguladas por este factor especialmente en las células del sistema inmune. Durante el proceso inflamatorio, la expresión de la NADPH oxidasa (subunidad NOX2) fagocítica es inducida por el NF- $\kappa$ B (Chen y cols., 2008). Las ROS a menudo estimulan la vía del NF- $\kappa$ B en el citoplasma, pero inhiben la actividad de NF- $\kappa$ B en el núcleo (Fig. 2) (Kabe y cols., 2005). Las ROS, se ha reportado tanto que activan como que reprimen la señalización del NF- $\kappa$ B, donde los objetivos de las ROS en las vía del NF- $\kappa$ B es que reaccionan con cisteínas (Paulsen y Carroll., 2010).

La mayoría de las investigaciones sobre el NF- $\kappa$ B en las enfermedades infecciosas tales como la enfermedad causada por *Entamoeba histolytica* se ha centrado en los heterodímeros p50 y p65 los cuales una vez translocados al núcleo inducen la expresión de citocinas inflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p40 y quimiocinas como IL-8 (Noguchi y cols., 2005; Ushio-Fukai, 2009).

### **1.6 Muerte celular por apoptosis**

Como ya se ha comentado las ROS pueden conllevar a un proceso apoptótico dependiendo de las concentraciones intracelulares presentes en la célula. La apoptosis es un mecanismo común de reemplazo celular, remodelación de tejidos, y de eliminación de células dañadas (Chandra y cols., 2000; Haddad, 2004). Es fisiológicamente ventajosa debido a que las células apoptóticas se eliminan por fagocitosis y la consiguiente degradación intracelular, lo que impide la inducción de una respuesta inflamatoria y el daño al tejido circundante (Shacter y cols., 2000). Se trata de un proceso complejo, caracterizado por la contracción celular, fragmentación del ADN, y la consecuente formación de cuerpos apoptóticos (Shacter y cols., 2000; Mates y Sánchez-Jiménez, 2000; Chandra y cols., 2000), los cuales presentan una asimetría

---

de los fosfolípidos de membrana dando lugar a una externalización de la fosfatidilserina (Mates y Sánchez-Jiménez, 2000), misma que induce la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos. La apoptosis puede ser iniciada por una variedad de estímulos que incluye agentes oxidantes, radiaciones ionizantes, factores de crecimiento, glucocorticoides, y citocinas (Mates y Sánchez-Jiménez 2000; Haddad, 2004), los cuales pueden activar enzimas citosólicas denominadas caspasas. La activación de estas puede inducirse por dos vías distintas, una es mediante señales originadas en los receptores de muerte celular, localizados en la membrana plasmática (vía extrínseca) y la otra asociada a cambios en la permeabilidad mitocondrial (vía intrínseca).

La vía extrínseca recibe una señal a través de un ligando y la consecuente unión a su receptor de muerte en la superficie de la célula. Una vez unido el ligando con el receptor de muerte se produce una serie de acontecimientos llevando a cabo una trimerización del receptor seguido por la unión de la molécula adaptadora con el dominio citoplasmático del receptor, conduciendo a la activación de las caspasas de iniciación (Kaufmann y Earnshaw, 2000).

Las caspasas son un grupo de proteínas pertenecientes al grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. Existen como zimógenos solubles en el citoplasma, en el espacio intermembranal mitocondrial y la matriz nuclear de prácticamente todas las células (Chandra y Samali, 2000). Constan de 12 miembros y 6 de ellos (caspasas 3, 6, 7, 8, 9 y 10) están involucrados en la apoptosis. Las caspasas 8 y 9 son las principales caspasas iniciadoras, adquieren la capacidad de romper, y activar caspasas efectoras. Las caspasas 3, 6, y 7 son caspasas efectoras, capaces de romper la mayoría de los polipéptidos. La caspasa 3 activa rompe (Earnshaw y cols., 1999; Kaufmann y Earnshaw, 2000) una ADN nucleasa la cual se libera de su inhibidor en el citoplasma, posteriormente, entra en el núcleo, donde corta ADN en oligonucleosomas (180 pb) (Sakahira y cols., 1998; Chandra y Samali, 2000).

La vía intrínseca de la apoptosis se da mediante un aumento en la permeabilidad mitocondrial, esto permite la liberación del citocromo c al citosol el cual se une a una

proteína apoptótica conocida como Apaf-1 (factor activador de la apoptosis-1) (Desagher y cols, 1999; Griffiths y cols, 1999). El citocromo c y la proteína Apaf-1 forman un complejo, el cual se une al prodominio de la caspasa 9 (Chandra y cols., 2000), esta se activa, se libera del complejo y activa a otras caspasas como la caspasa 3 y 7 seguido de la caspasa 6 (Stennicke y cols., 1999; Kaufmann y Earnshaw, 2000).

Una tercera vía se ha propuesto que puede activar la cascada de las caspasas la cual es iniciada por las células citotóxicas (Yang y cols., 1998; Chandra y Samali, 2000), a través de perforinas y de la granzima B. La perforina permeabiliza las membranas celulares, lo que permite que la granzima B entre al citosol, donde activa la caspasa 3 permitiendo así la inducción de la apoptosis (Chandra y cols., 2000).

El mecanismo por el cual *E. histolytica* induce la apoptosis de la célula huésped es a través de la activación de la caspasa 3, y de las MAPK. Se ha observado que la activación de esta caspasa no es dependiente de ROS, caso contrario observado para la vía de las MAPK. Además se ha estudiado que para la apoptosis llevada a cabo por el parásito, no es esencial la vía mitocondrial para la inducción de este proceso (Sim y cols., 2005).

Con base a lo antes expuesto, es posible que durante la patogénesis causada por *E. histolytica* puedan estar involucrados factores que le permiten al parásito poder desarrollar la enfermedad y parece ser que la inmunidad innata resulta en un proceso inofensivo que no destruye a *E. histolytica*. Por tal motivo resulta importante estudiar los mecanismos que están siendo activados en este proceso de infección en un modelo de amibiasis intestinal que pueda permitir resolver algunos cuestionamientos importantes observados en esta patología.

## 2. ANTECEDENTES.

La amebiasis intestinal es causada por el protozoo *Entamoeba histolytica* y persiste como una de las principales enfermedades parasitarias que afectan millones de personas en todo el mundo. En México aproximadamente 1,3 millones de casos han sido reportados, siendo esto de tal magnitud que se ha considerado la principal causa de muerte por parasitosis (Caballero y cols., 1994).

Las ROS juegan un papel importante aún no bien conocido sobre el proceso de invasión del parásito sobre el intestino. Por un lado se ha observado en modelos experimentales que el parásito puede inducir incremento de ROS por la presencia de la Gal-GalNac, la cual estimula un aumento en los niveles de cAMP, lo que conlleva a una alteración en el transporte intracelular de iones como el calcio, agravando con esto la producción ROS (Rawal y cols., 2004). Por otro lado estudios de neutrófilos con trofozoítos de *E. histolytica in vitro* mostraron que el aumento y generación de ROS en estas células, es a través de la NADPH oxidasa (Sim y cols., 2005). Además se ha observado que *E. histolytica* presenta una clara defensa contra las ROS provenientes de las células inmunes (Revisado en Mortime y Chadee, 2010) ya que recluta un antioxidante tiol-específico por la lectina Gal-Gal-NAc para su propia defensa.

El análisis de la respuesta inflamatoria durante la amibiasis intestinal, tanto en las enfermedades humanas y modelos animales han revelado un rol importante en la regulación de quimiocinas y citocinas proinflamatorias. Estudios *in vitro* utilizando células epiteliales de colon humano (Eckman y cols., 1995), demostraron que los trofozoítos de *E. histolytica* inducen la producción de citocinas inflamatorias como la IL-1 e IL-8. Por otro lado en un modelo *in vivo* de ratones con inmunodeficiencia severa combinada con trasplante de intestino humano (SCID-HU-INT) se comprobó este efecto al ver aumentado los niveles de RNAm que codifican para estas citocinas (Seydel y cols., 1997). La importancia de la detección de la IL-8 en estos modelos ha sido la correlación de esta citocina con el incremento en la migración de neutrófilos al sitio de lesión (Belloso y cols., 2004).

Por otro lado se ha observado que durante la inflamación pueden estimularse mediadores pro-inflamatorios como el NF- $\kappa$ B, en donde la mayoría de los estudios se han enfocado en el heterodímero p50-p65. En estudios con células epiteliales (Caco-2, T84 y LS174T) tratadas con antígenos amibianos, se observó la modificación postraducciona de p65 (Kammanadiminti y cols., 2007). En el caso de p50, los ratones de la cepa C57BL/6 y 129 infectados con el parásito, presentaron sobreexpresada esta subunidad, posiblemente este efecto sea de carácter protector durante la infección (Cho y cols., 2010). La cisteín-proteasa 5 (CP5) puede estimular al NF- $\kappa$ B en células Caco-2 mediante la unión de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Hou y cols., 2009), mientras que antígenos amibianos pueden suprimir la activación del NF- $\kappa$ B en células epiteliales a través de proteínas de choque térmico (Kammanadiminti y Chadee, 2006).

El mecanismo celular de daño ha sido otro de los objetivos de numerosos estudios en esta patología. Estudios *in vitro* han demostrado que los trofozoítos inducen apoptosis en contacto con neutrófilos, linfocitos T, macrófagos (Petri y Haque, 2002), hepatocitos (Seydel y cols., 1998) y células epiteliales, además este efecto no requiere el ligando Fas / Fas, la señalización del receptor de muerte (TNF), ni la activación de caspasa 8 o 9 (células Jurkat T), pero si involucra la participación de la caspasa 3 (Huston y cols., 2003). En células Jurkat T se observó que los trofozoítos activan rápidamente la caspasa 3 produciendo un efecto apoptótico, y que la adición de inhibidores (Ac-DEVD-CHO) de esta caspasa bloquean este proceso (Huston y cols., 2000). Estos datos muestran la importancia de este proceso durante la infección, ya que ratones C57BL/6 deficientes de caspasa 3 presentaron resistencia a la amibiasis (Becker y cols., 2010). También se ha visto que dicha apoptosis es mediada por la NADPH oxidasa inductora de ROS con la consecuente activación de la vía de cinasas de receptor extracelular (ERK)1/2 (Sim y cols., 2005). Incluso en condiciones *in vitro* se ha visto como los trofozoítos inducen apoptosis en neutrófilos a través de la de la interacción con la  $\beta_2$  integrina activando la vía fosfatidilinositol-3-cinasa (Sim y cols., 2007).

En definitiva se puede decir que en el intestino *E. histolytica* evade la respuesta inmune innata, permitiendo así su migración hacia sitios extraintestinales, donde no se presenta una regeneración celular como en el intestino ocasionando la muerte del individuo.

### 3. JUSTIFICACION

*Entamoeba histolytica* ocasiona la enfermedad conocida como amibiasis y se considera una de las principales causas de muerte por enfermedades parasitarias en todo el mundo. La infección por este parásito es muy grave en aquellas poblaciones susceptibles, en donde se ha reportado que puede causar a nivel mundial cerca de 100,000 muertes por año. El éxito de su infección es debido a la presencia de una gran cantidad de factores de patogenicidad, entre los que destacan adhesinas tipo lectinas, proteínas cinasas, factor inhibidor de locomoción de leucocitos, permitiendo de tal manera que *E. histolytica* active la respuesta inmune innata del huésped la cual no es capaz de eliminar al parásito pero si capaz de contribuir a la patogénesis causando daño celular en las paredes del colon, permitiendo que el parásito penetre el ciego y posteriormente migre a otros órganos tales como el hígado y cerebro. Hasta el momento se desconoce cuáles mecanismos celulares y moleculares son los responsables de causar daño tisular y permitir la migración de *E. histolytica*.

En este contexto se pretende analizar en un modelo de amibiasis intestinal en hámster el papel que juegan las especies reactivas de oxígeno, los factores de transcripción y las citocinas en el proceso de invasión del parásito.

#### **4. HIPOTESIS.**

El daño celular inducido durante la amibiasis intestinal es modulado por el estrés oxidativo, citocinas proinflamatorias y factores de transcripción.



## 5. OBJETIVO GENERAL.

Analizar si el estrés oxidativo, los procesos pro-inflamatorios y los factores de transcripción forman parte de los mecanismos de daño inducidos por *E. histolytica* en el intestino de hámster.

### 5.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS:

- Establecer el modelo de amibiasis intestinal en hámster.
- Cuantificar al ión superóxido generado durante el desarrollo de las úlceras amibianas.
- Localizar células que expresen IL-8 y factor nuclear  $\kappa$ B en lesiones amibianas.
- Analizar el tipo de muerte celular inducida durante la amibiasis intestinal.

## **6. MATERIAL Y METODOS**

### **6.1 Modelo de amibiasis intestinal**

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

Trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM-1: IMSS (Fase V virulenta) se cultivaron en medio axénico de acuerdo con el procedimiento de Diamond (Diamond, 1980)

#### **6.1.2 Virulencia de trofozoítos de *E. histolytica***

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

#### **6.1.3 Animales de experimentación**

Se usaron 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 trozos de purina 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 animales de experimentación fueron divididos en 3 grupos: Animal intacto (CTR n=18), Asa cecal sin amibiasis (Sham n=18) y Asa cecal con amibiasis (AI n=18).

#### **6.1.4 Técnica del asa cecal lavada y cerrada**

Este procedimiento de lavado se propone para reducir la exposición de los trofozoítos al ambiente hostil del contenido intestinal y maximizar las posibilidades de interacción entre las amibas y la superficie mucosa. De tal forma que se propone suprimir el tránsito intestinal y eliminar el contenido fecal (Anaya-Velázquez y cols., 1985).

Los animales recibieron vía oral antibiótico (0.1 gr de sulfato de neomicina y 1 gr de sulfadimetilpirimidina por litro de agua) durante 5 días previos a la realización del modelo de amibiasis intestinal. Enseguida fueron sometidos a un ayuno de 24 h y posteriormente fueron anestesiados con pentobarbital con la finalidad de exteriorizar el ciego. Por laparotomía fue exteriorizado identificando la válvula ileo-cecal la cual fue cerrada. Posteriormente la región proximal del ciego fue seccionada y se introdujo una cánula de plástico dentro de la apertura final asegurándola en el lugar con hilo para sutura. A continuación, se introdujo una aguja de 18G en el lumen intestinal cerca de la válvula ileo-cecal asegurándola con una sección de hilo y a través de la aguja se lavó el contenido cecal con solución salina fisiológica estéril (0.9%) hasta que las heces fueron removidas y se procedió a inocular los trofozoítos.

#### **6.1.5 Inducción de la amibiasis intestinal**

En la porción del ciego lavado y cerrado, se inocularon las amibas vivas ( $2 - 5 \times 10^5/100 \mu\text{l}$ ) a través de la aguja localizada en el sitio distal del ciego. Finalmente la aguja y cánula fueron removidas y la pared abdominal fue cerrada en 2 capas, cuidando de no dañar la superficie mucosa o el flujo sanguíneo del ciego.

Los animales se dejaron interactuando con las amibas en lapsos de 5, 10 y 20 h. En el caso de los animales Sham (asa cecal sin amibiasis) se utilizó como inóculo  $100 \mu\text{l}$  de medio de cultivo Diamond estéril y los animales controles no recibieron ninguna manipulación. Posteriormente los animales con amibiasis intestinal, Sham y controles fueron anestesiados con pentobarbital y enseguida mediante laparotomía se extrajo la porción del ciego.

## **6.2 Procesamiento de muestras biológicas.**

### **6.2.1 Preparación del tejido**

Una vez que el ciego fue extraído se lavó con solución salina al 0.9% y se dividió en 3 porciones, las cuales fueron utilizadas para diferentes metodologías.

### **6.2.2 Procesamiento de tejidos en parafina.**

Los tejidos fueron fijados con paraformaldehído al 4% durante 24 – 48 h. A continuación las muestras se deshidrataron e incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor con un micrótopo de rotación (Leica RM 2125RT). Los cortes obtenidos se incubaron a 56°C durante 7 horas.

### **6.2.3 Procesamiento de tejidos para Western-blot.**

Los tejidos extraídos fueron pesados (balanza labtronic scientific) y congelados a -20°C, para la obtención y cuantificación de proteínas.

### **6.2.4 Procesamiento de tejidos en congelación**

Los tejidos obtenidos mediante perfusión con paraformaldehído al 4% fueron colocados en una solución de sacarosa al 15% durante 24 horas. A continuación las muestras fueron recubiertas con Tissue-Tek, y sumergidas en nitrógeno líquido durante 30 segundos. Los tejidos congelados se mantuvieron a -80°C. Posteriormente se realizaron cortes en congelación de 10  $\mu\text{m}$  de espesor (Criostato Hirax C25).

## **6.3 Determinación del anión superóxido**

El ion superóxido actúa como un electrófilo y nucleófilo, potencialmente forma más especies reactivas de oxígeno a través de reacciones secundarias (Halliwell y Gutteridge, 1984). Su medición puede ser a través del empleo de la hidroetidina, usada por primera vez por Gallop y cols, en 1984. La hidroetidina es capaz de atravesar libremente las membranas celulares y en presencia de  $\text{O}_2^-$  se oxida transformándose en etidio, el cual queda atrapado en el interior de la célula y produce fluorescencia (excitación, 500-530 nm; de emisión, 590-620 nm).

Justo 2 horas antes de que se cumpliera el tiempo de post-inoculación (5, 10 y 20 hrs) con *E. histolytica* a los grupos experimentales (Control, Sham y AI) se les aplicó 8 µg de hidroetidina por Kg de peso del animal vía vena yugular (Gottlieb y cols., 2006). Los animales se perfundieron con paraformaldehído al 4% para fijar *in situ* el intestino, como se describe en la sección 6.2.4.

#### **6.4. Localización de antígenos**

Nos permite saber la localización del antígeno de manera *in situ*.

##### **6.4.1 Técnica de Inmunohistoquímica:**

Es una técnica empleada para detectar la presencia de un antígeno en cortes histológicos utilizando anticuerpos unidos a un epítipo concreto de la proteína de estudio de manera indirecta, dirigiendo contra ellos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano rojo (HRP) que al reaccionar con diaminobenzidina en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el sustrato precipita sobre la unión del antígeno-anticuerpo. Es una técnica de uso sistemático en la anatomía patológica diagnóstica (Abbas y cols., 2002).

Los cortes de intestino se desparafinizaron en xilol 100% (2 veces/5 minutos), y se rehidrataron en alcoholes graduales del 100%, 96%, 70%, y finalmente en agua corriente. Se realizó el desenmascaramiento de epítipos a presión de vapor durante 1 minuto en solución de citratos (pH= 6.0). La actividad de la peroxidasa endógena se inhibió durante 30 minutos con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% (5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 50 ml de metanol al 100%). A continuación las muestras se lavaron con PBS (3 veces/5 minutos) y se procedió a la permeabilización de la membrana con PBS-Triton X-100 al 0.2% (30 minutos). Para el bloqueo de uniones inespecíficas las secciones de tejido se incubaron durante 1 h con una solución de suero fetal bovino al 20%. Posteriormente se incubaron los tejidos con el primer anticuerpo diluido en PBS-Tritón X-100 0.2% - BSA 3% durante 24 h en cámara húmeda a 4°C. El primer anticuerpo es descrito en la tabla 2. Después de la incubación las secciones de tejido se lavaron con PBS (3 veces/5 minutos), se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario es descrito en la tabla 1.

Una vez finalizada la incubación se lavó con PBS (3 veces/5 minutos) y se reveló con 3,3-Diaminobenzidine (DAB) durante 5 min. El tejido se lavó nuevamente con PBS (3 veces/5 minutos), se contrastó con hematoxilina durante 1 minuto, se lavó con PBS (3 veces/5 minutos) y se deshidrataron los tejidos en etanol al 100% (10 minutos) y xilol al 100% (2 veces/15 minutos). Los tejidos se cubrieron con Entellan y se dejaron secar.

| Anticuerpo Primario           | Epítotope        | Dilución | No catalogo | Casa comercial |
|-------------------------------|------------------|----------|-------------|----------------|
| IL-8                          | polipéptido      | 1:200    | Ab7747      | ABCAM          |
| Anticuerpo secundario         | Epítotope        | Dilución | No catalogo | Casa comercial |
| Envision Dual link system HRP | Rabbit/Mouse IgG | -        | K4061       | Dako           |

Tabla 1. Anticuerpos usados para la localización de antígenos mediante Inmunohistoquímica.

#### 6.4.2 Técnica de Inmunofluorescencia indirecta

Esta técnica utiliza anticuerpos para identificar células y/o tejidos según su capacidad para expresar determinadas moléculas o antígenos. Esta técnica consiste en visualizar anticuerpos unidos a un epítotope concreto de la proteína en estudio dirigiendo contra ellos anticuerpos secundarios marcados con una molécula fluorescente (Isotiocianato de fluoresceína o Tetrametil rodamina) ligada covalentemente permitiendo así su detección (Regueiro y cols., 2002).

Los cortes de intestino se desparafinizaron en xilol al 100% (2 veces/5 minutos), y se rehidrataron en alcoholes graduales del 100%, 96% 70%, y finalmente en agua corriente. Se realizó el desenmascaramiento de epítotos a presión de vapor durante 1 minuto en buffer de citratos. La actividad de la peroxidasa endógena se inhibió durante 30 minutos con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% (5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 50 ml de metanol al 100%). A continuación las muestras se lavaron con PBS (3 veces/5 minutos) y se

procedió a la permeabilización de la membrana con PBS-Triton X-100 0.2% (30 minutos). Para el bloqueo de uniones inespecíficas las secciones de tejido se incubaron durante 1 h con una solución de suero fetal bovino al 20%. Una vez realizado esto se incubaron los tejidos con el primer anticuerpo diluido en PBS-Triton X-100 0.2% - BSA 3% durante 24 h en cámara húmeda a 4°C. El anticuerpo primario es descrito en la tabla 3. Después de la incubación las secciones de tejido se lavaron con PBS (3 veces/5 minutos). Se incubaron con el anticuerpo secundario unido al cromógeno diluido en suero fetal bovino al 5% durante 1 h a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario es descrito en la tabla 2. Una vez finalizada la incubación se lavó con PSB (3 veces/5 minutos). Se procedió a disminuir la autofluorescencia con sudan negro B al 0.1% en etanol al 70% durante 10 minutos. Posteriormente se lavó con PBS (3 veces/5 minutos). La tinción de núcleos se realizó con Hoechst (5µg/ml) (33258 invitrogen) en PBS 10 minutos. Se lavó con PBS (3 veces/5 minutos). Finalmente los tejidos se montaron con glicergel y se esperó a que seicara.

| <b>Anticuerpo Primario</b>   | <b>Epítotope</b> | <b>Dilución</b> | <b>No catalogo</b> | <b>Casa comercial</b> |
|------------------------------|------------------|-----------------|--------------------|-----------------------|
| Caspasa 3                    | Asp 175          | 1:200           | 9664               | Cell Signaling        |
| P-NF-κB p65                  | S-536            | 1:200           | 3033L              | Cell Signaling        |
| <b>Anticuerpo secundario</b> | <b>Epítotope</b> | <b>Dilución</b> | <b>No catalogo</b> | <b>Casa comercial</b> |
| Rabbit IgG Alexa Fluor 488   | -                | 1:5000          | A11008             | Invitrogen            |
| Mouse IgG Alexa Fluor 594    | -                | 1:5000          | A11005             | Invitrogen            |

**Tabla 2. Anticuerpos usados para la localización de antígenos mediante inmunofluorescencia**

## **6.5 Obtención y cuantificación de proteínas**

### **6.5.1 Extracción de proteínas**

Las secciones de tejidos congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  se colocaron en un macerador de tejidos de vidrio (Kontes de 15 ml), más una solución de lisis (Tris HCl 10 mM pH de 7.4, NaCl 50 mM, Iodoacetoamida 3 mM, Tosil-L-lisina clorametil cetona (TLCK) 3 mM, fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 1mM y Triton al 0.1%). La proporción de tejido con respecto al buffer de lisis fue de 1gr / ml. Se procedió a lisar las secciones de tejido con 100 golpes manteniéndolas en hielo. El material adquirió una consistencia altamente densa por lo que fue necesario centrifugar a 15 000 *g* durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , obteniendo dos fases, una en el fondo que corresponde al pellet con el material de tejido no digerido y el sobrenadante donde quedan las moléculas citosólicas. El sobrenadante se recupero y se conservo a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior cuantificación (López-Monteon y cols., 2003).

### **6.5.2 Cuantificación de proteína por el método de Bradford**

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

### **6.5.3 Separación y caracterización inmunológica de proteínas**

La separación y caracterización de proteínas son técnicas que nos permiten purificar una proteína encontrada en una mezcla, antes de estudiar su estructura y su mecanismo de acción. Para ello se pueden aplicar muchas técnicas que permitan conocer el tipo de proteína encontrada (Regueiro y cols., 2002).

#### **6.5.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil Sulfato Sódico (SDS-PAGE)**

Es una técnica de separación de biomoléculas cargadas eléctricamente las cuales migran en un campo eléctrico aplicado; esta técnica consiste en utilizar un gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de un detergente aniónico, duodecil sulfato de sodio (SDS). En donde la acrilamida se polimeriza y se entrecruza para formar una matriz porosa. El SDS se une a proteínas desnaturalizadas en proporción de una molécula de SDS por cada dos enlaces peptídicos (Regueiro y cols., 2002). La concentración de gel (Acrilamida/Bisacrilamida al 30%, Tris HCl 1.5 M pH de 8.8, SDS al 10%, persulfato de amonio (APS) al 10%, y N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0.05%) a utilizar depende del peso molecular del antígeno a identificar, en este caso los antígenos que se identificaron pesaron 17 y 65 kDa, por lo cual se trabajo con geles al 15 % (17 kDa) y 10% (65 kDa). Durante la solidificación del gel se adiciono 2-butanol anhidro para alinear los bordes de este mismo. Una vez solidificado el gel de corrida se preparo el gel concentrador a una concentración del 4% (Acrilamida/Bisacrilamida al 30%, Tris HCl 0.5 M pH de 6.8, SDS al 10%, APS al 10% y TEMED 0.05%). Antes de que solidifique el gel concentrador se colocan los peines para la formación de los carriles en donde irán las muestras problema. Una vez solidificado el gel se procedió a montar los geles en la cámara de electroforesis la cual contiene una solución de corrida (Tris-base 250 mM, Glicina 2 M, SDS 10% y agua tridestilada). Se dispuso a colocar en los carriles las muestras problema las cuales se encuentran diluidas 1:1 con solución de muestra (041M6092, sigma) y hervidas a 96°C durante 5 minutos. La concentración de proteína utilizada fue de 40 µg / 20 µl. Las proteínas fueron corridas a 60 voltios hasta que estas sobrepasaron el gel concentrador (30 minutos), posteriormente se aumentó el voltaje a 120 voltios y se dejó correr durante 130 minutos aproximadamente.

#### **6.5.5 Electrotransferencia**

Esta técnica se basa en transferir las proteínas que se encuentran en un gel a un soporte sólido (papel de nitrocelulosa, nylon) para que su manejo sea más fácil. (Abbas y cols., 2002). Una vez corridas las muestras en la electroforesis los geles obtenidos se lavaron durante 1 hora en una solución de transferencia (Tris-base 25 mM, glicina 192

---

mM, metanol al 20%) para retirar las sales que se pudieron haber formado en el proceso. La membrana utilizada en este caso fue de nitrocelulosa 0.2  $\mu\text{m}$  (162-0112-Bio-Rad) la cual junto con los filtros y las fibras se remojaron en solución de transferencia durante 1 hora. Finalizado este tiempo se preparó el sistema de transferencia el cual contenía una solución de transferencia, un bloque de hielo, un magneto para su agitación y los electrodos colocados en los sitios correspondientes. Se corrió a 12 miliamperios durante 24 horas a 4°C.

Concluido el tiempo de la transferencia se sacaron las membranas ya transferidas, se lavaron con una solución de TBS-T (Tris-base 200 mM, NaCl 1.4 M, y Tween-20 0.1%), y con la finalidad de verificar la transferencia, las membranas se incubaron con rojo ponceau al 0.1% (18376 Sigma, ácido acético 0.5%) durante 5 minutos. Una vez que aparecieron las bandas las membranas se lavaron con TBS-T y se procedió a realizar la inmunodetección. Por otro lado los geles fueron teñidos con azul coomasie al 0.5% (1 gr azul coomasie (R B7920 sigma), ácido acético 100 ml, 400 ml de metanol), durante 1 hora para verificar si se llevó a cabo correctamente la transferencia.

#### **6.5.6 Inmunodetección de proteínas**

La identificación de las proteínas a estudiar se realizó por la incubación de la membrana de soporte con anticuerpos específicos marcados con enzimas como la peroxidasa de rabano rojo (HRP) y la fosfatasa alcalina (AP) (Regueiro y cols., 2002). Para el bloqueo de uniones inespecíficas las membranas se incubaron durante 1 hora con leche al 5% diluida en TBS-T y en agitación. Una vez concluido el bloqueo se aplicó el primer anticuerpo diluido en BSA al 5% y TBS-T, se incubó durante 24 horas a 4°C y en agitación. Los anticuerpos primarios utilizados se describen en la tabla 3.

Una vez terminada la incubación se retiró el anticuerpo y las membranas se lavaron con TBS-T (3 veces/10 minutos), el anticuerpo primario se recuperó y se conservó con azida de sodio al 0.1%. Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario diluido en leche al 5% en TBS-T, durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Pasado este tiempo las membranas se lavaron con TBS-T (3 veces/10 minutos). Las membranas se revelaron con 3,3'-Diaminobenzidina (sigma D4418) (para la caspasa 3

activa) o con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato / nitro azul de tetrazolium (BCIP / NBT sigma B565) (para el NF- $\kappa$ B). Los anticuerpos secundarios utilizados se describen en la tabla 1.

| Anticuerpo primario   | Epítotope | Dilución | No catalogo | Casa comercial |
|-----------------------|-----------|----------|-------------|----------------|
| Caspasa 3-activa      | Asp 175   | 1:1000   | 9664        | Cell Signaling |
| P-NF- $\kappa$ B p65  | S-536     | 1:1000   | 3033L       | Cell Signaling |
| Actina                | IgG       | 1:1000   | A2066       | Sigma          |
| Anticuerpo secundario | Epítotope | Dilución | No catalogo | Casa comercial |
| Goat-Rabbit HRP       | IgG       | 1:5000   | AP307p      | Millipore      |
| Goat-Rabbit AP        | IgG       | 1:4000   | Ab6722      | Abcam          |

**Tabla 3. Anticuerpos usados para la inmunodetección de proteínas**

### **6.5.7 Análisis y cuantificación de proteínas**

El análisis de las bandas se llevó a cabo mediante un analizador de imágenes Kodak digital science 1D obteniendo la media de la intensidad de las bandas problema y el control. Los resultados fueron normalizados con respecto a la actina.

### 7. Análisis estadístico

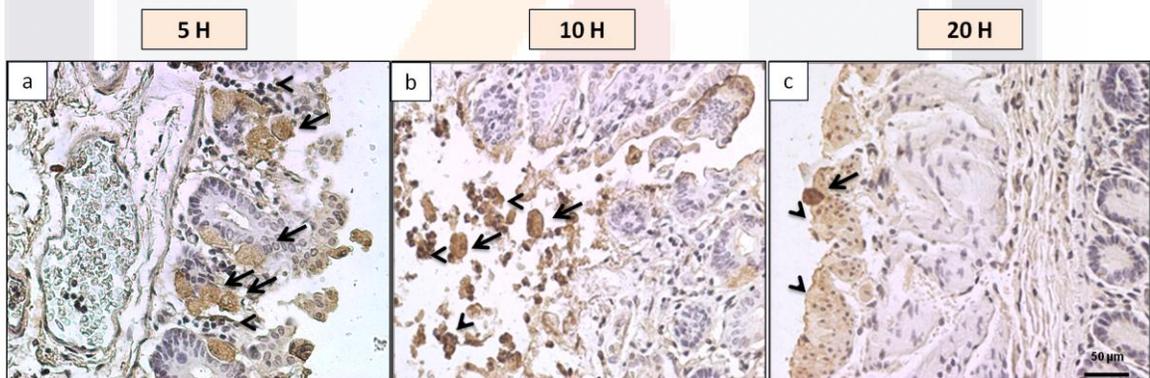
Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prisma versión 3.0, utilizando la prueba t-student para analizar la diferencia de los promedios, y la significancia estadística de la varianza con la prueba de ANOVA. Cada valor representa la media  $\pm$  S.E.M de 3 experimentos. Se considera la diferencia significativa con un valor de  $p < 0.05$ .



## 8. RESULTADOS.

### 8.1 Localización de trofozoitos de *E. histolytica* en intestino de hámster.

La infección por *E. histolytica* se caracteriza por presentar una potente actividad citotóxica la cual es probable que contribuya de forma importante al extenso daño tisular observado. El parásito es capaz de matar e ingerir células huésped en pocos minutos mediante un contacto-dependiente entre la célula y el parásito (Revisado en Ralston y Petri, 2011). Asimismo la combinación de componentes citotóxicos como las proteasas y las reacciones inmunitarias del propio organismo pueden aumentar la destrucción del tejido. Con el fin de observar el daño que genera este parásito en el tejido intestinal, se analizaron los cambios morfológicos producidos durante la invasión a distintos tiempos de interacción (5, 10 y 20 h post-inoculación).



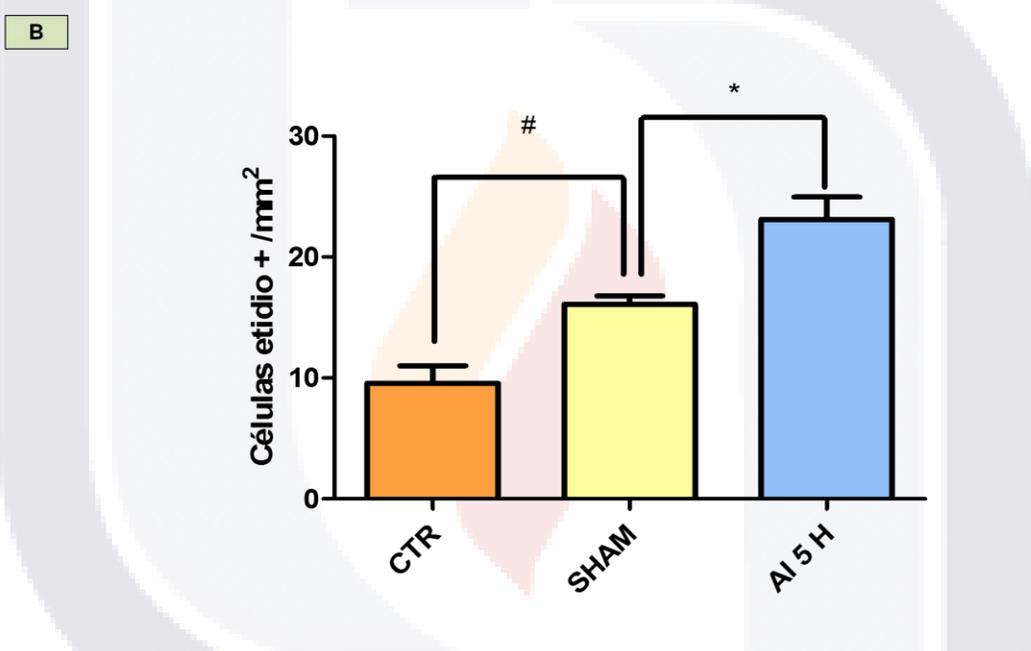
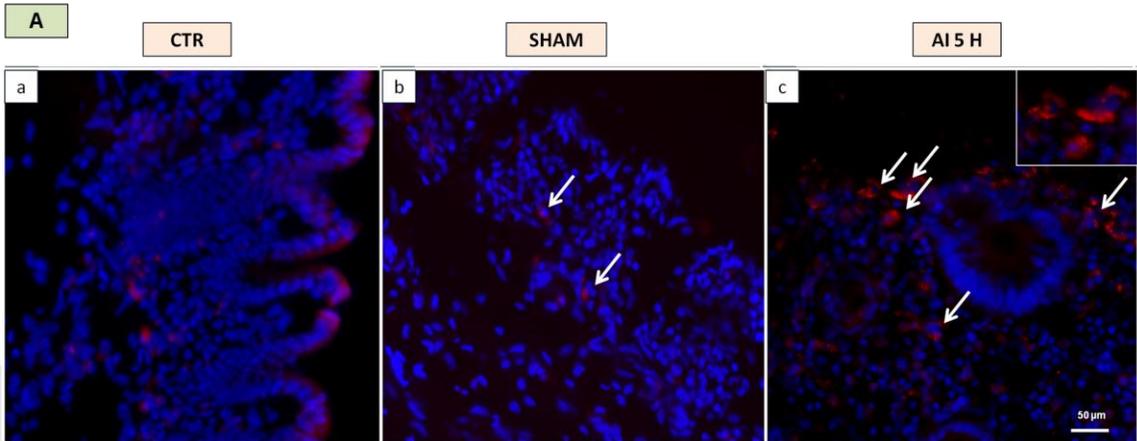
**Figuar 3. Localización de trofozoitos de *E. histolytica* en el ciego de hámster.**

Hámsteres macho fueron inoculados con trofozoitos de *E. histolytica* durante 5, 10 y 20 h, posteriormente mediante la técnica de inmunohistoquímica se identificó la presencia de los trofozoitos en el tejido. Las imágenes tomadas mediante microscopia óptica muestran a los trofozoitos ( → ) localizados en (a) la mucosa (b) submucosa y (c) serosa, se puede observar la presencia de infiltrado inflamatorio ( > ).

El análisis morfológico e inmunohistoquímico mostró que durante las primeras horas (5 h) de esta patogenia, los trofozoítos hicieron contacto con las células epiteliales de la mucosa intestinal provocando pérdida de su arquitectura (Fig 3a). Posteriormente, estos comienzan a introducirse en la zona de epitelio interglandular hasta la lámina propia; a las 10 h ya se localizaron en la submucosa, donde el tejido adyacente a los parásitos muestra desorganización (Fig 3b). Finalmente a las 20 h, el parásito se localizó en la capa más externa del intestino (serosa) (Fig 3c). Cabe mencionar que durante los distintos tiempos analizados la presencia del infiltrado inflamatorio fue variante, obteniendo que a las 5 h, las células inmunes fueron escasas, posteriormente en lo que respecta a las 10 y 20 h el infiltrado inflamatorio aumentó.

### ***8.2 E. histolytica provoca aumento de especies reactivas de oxígeno durante el proceso de infección.***

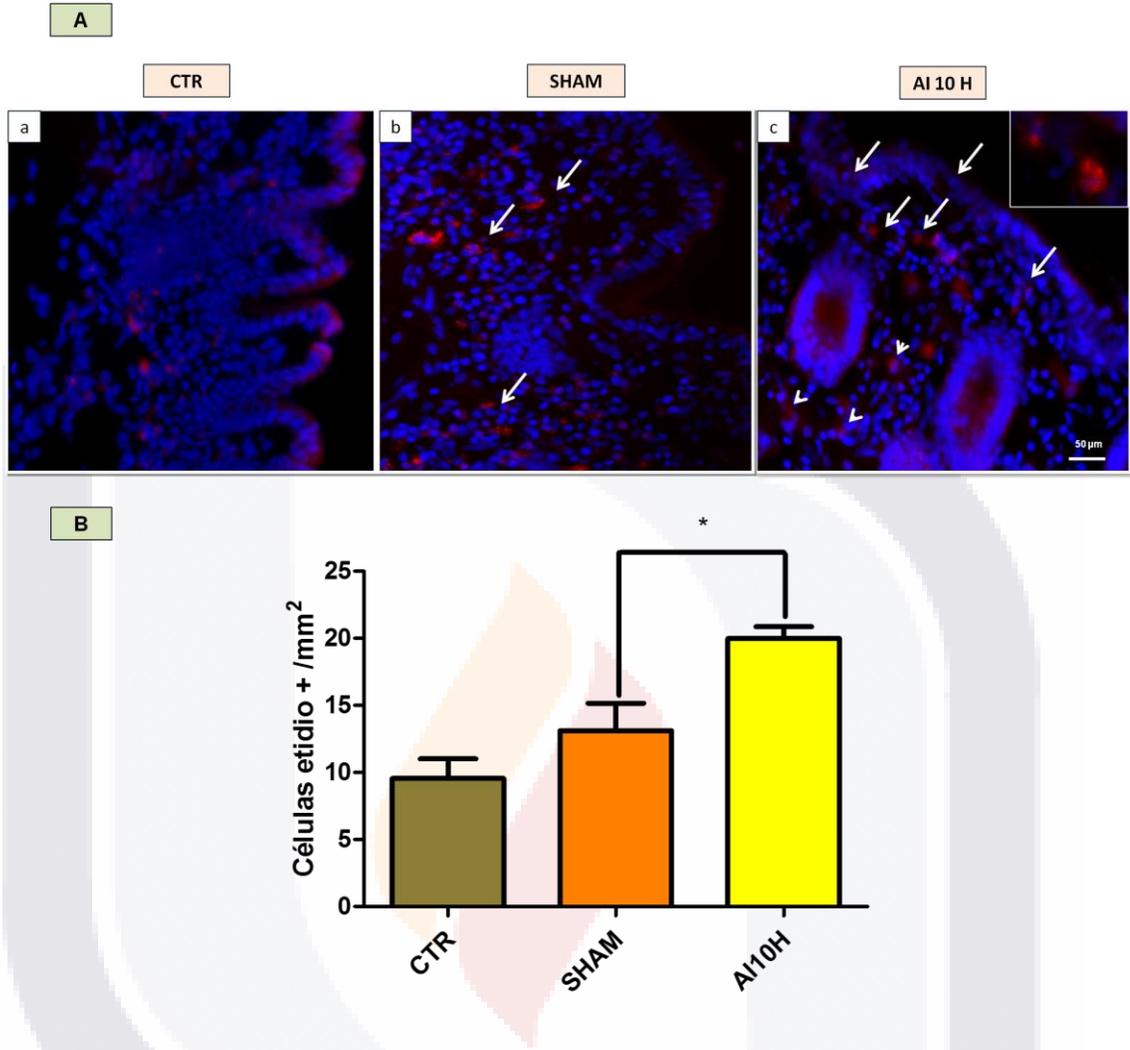
En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas juegan un papel central en el equilibrio homeostático celular (Finkel y Holbrook, 2000). Sin embargo, cuando el aumento del contenido intracelular de ROS sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos (Gamaley y Kluybin, 1999). El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas. Las ROS están también implicadas en una amplia gama de enfermedades del tracto gastrointestinal ya que desempeñan una función fisiológica importante y puede también ser causantes de grandes daños a nivel celular o tisular.



**Figura 4. *E. histolytica* en etapas tempranas estimula la producción de ROS en células epiteliales.** Hámsteres macho fueron inoculados con trofozoítos de *E. histolytica* durante 5 horas, justo dos horas antes del tiempo de inoculación fue aplicada la hidroetidina vía vena yugular para fijar *in situ* el anión superóxido producido. Posteriormente mediante fluorescencia (microscopio Axio Visión Release 4.6.3 SP1) se analizó y cuantificó a las células anión superóxido positivas. **A.** Las imágenes tomadas muestran células de la mucosa intestinal positivas (→). (a) Control, (b) animal sin amibiasis, (c) animal con amibiasis. **B.** Representación cuantitativa de células anión superóxido positivas, expresadas por mm<sup>2</sup>. Cada valor representa la media ± S.E.M de 3 experimentos. Análisis de Anova con respecto al control y Sham (#), y con respecto al Sham y al grupo con AI (\*) (\*p<0.05).

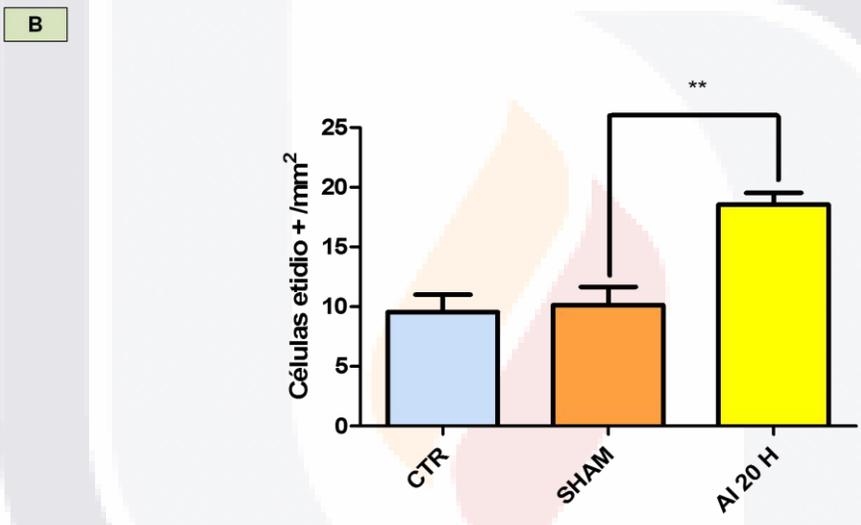
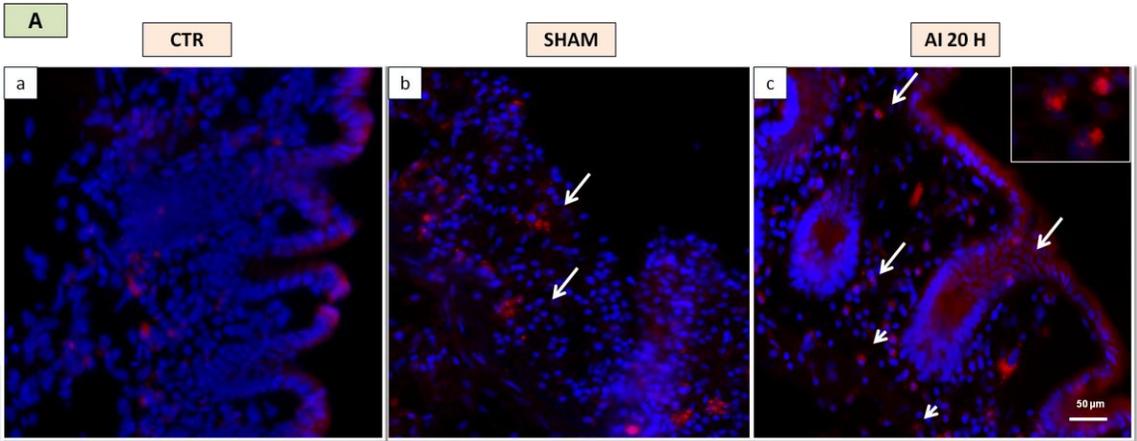
Se llevo a cabo la identificación de ROS en el modelo de amibiasis intestinal a distintos tiempos de interacción (5 h, 10 h y 20 h). La medición se realizó a través del empleo de la hidroetidina la cual es capaz de atravesar libremente las membranas celulares y en presencia de  $O_2^-$  se oxida transformandose en etidio, el cual queda atrapado en el interior de la célula. Nuestros resultados muestran que a las 5 h de la infección *E. histolytica* provoca en las células epiteliales de la mucosa intestinal, un aumento en la formación de ROS, las cuales se pueden apreciar como focos rojos en las células del tejido. La localización de ROS fue a nivel citoplásmico. Los resultados muestran que *E. histolytica* induce la formación de ROS durante su proceso de migración (Fig. 4Ac). La cuantificación de células positivas a ROS en el grupo con AI ( $23.12 \pm 1.836$ ) mostró diferencias significativas con respecto al control ( $9.562 \pm 1.454$ ) y al Sham ( $16.09 \pm 0.6973$ ), (Fig. 4B). Cabe mencionar que en el Sham los niveles de ROS detectados fueron significativamente mayores comparados con lo encontrado en el control, este efecto es debido al proceso proceso inflamatorio que se presenta durante el lavado de asa cecal. (Fig. 4Aab).

Posteriormente a las 10 h los trofozoítos son encontrados en la submucosa, estimulando de igual forma a las células intestinales a producir y aumentar ROS. Encontramos que a este tiempo las células que presentaron positividad para ROS fueron células de la mucosa intestinal y algunas células de la lámina propia. Las ROS identificadas se localizaron en el citoplasma de las células (Fig. 5Ac). La cuantificación de células positivas a ROS en el grupo con AI ( $19.33 \pm 0.6888$ ) mostró diferencias significativas, con respecto al control ( $9.562 \pm 1.454$ ) y Sham ( $13.11 \pm 2.036$ ) (Fig. 5B). Podemos observar que a este tiempo la cuantificación de células positivas a ROS en el Sham no mostró diferencias significativas comparadas con el control, esto es debido a que hay un reestablecimiento en cuanto al efecto quirúrgico.



**Figura 5. *E. histolytica* induce ROS en células epiteliales y de la lámina propia.**

Hámsteres macho fueron inoculados con trofozoítos de *E. histolytica* durante 10 horas, justo dos horas antes de haber concluido el tiempo de inoculación fue aplicada la hidroetidina vía vena yugular para fijar *in situ* el anión superóxido. Posteriormente mediante fluorescencia (microscopio Axio Visión Release 4.6.3 SP1) se analizó y cuantificó a las células anión superóxido positivas. **A.** Las imágenes tomadas muestran células de la mucosa intestinal (→) y de la lámina propia positivas (➤). (a) Control, (b) animal sin amibiasis (c) animal con amibiasis. **B.** Representación cuantitativa de células anión superóxido positivas, expresadas por mm<sup>2</sup>. Cada valor representa la media ± S.E.M de 3 experimentos. Análisis de Anova con respecto al control y Sham (\*p<0.05).



**Figura 6. Durante la infección por *E. histolytica*, las ROS se mantienen constantes.** Hámsteres macho fueron inoculados con trofozoítos de *E. histolytica* durante 20 horas, justo dos horas antes del tiempo de inoculación, fue aplicada la hidroetidina vía vena yugular para fijar *in situ* al anión superóxido. Posteriormente mediante fluorescencia (microscopio Axio Visión Release 4.6.3 SP1) se analizó y cuantificó a las células anión superóxido positivas. **A.** Las imágenes tomadas muestran células de la mucosa intestinal positivas (→) y células del infiltrado inflamatorio (↗). (a) Control, (b) animal sin amibiasis (c) animal con amibiasis. **B.** Representación cuantitativa de células anión superóxido positivas, expresadas por mm<sup>2</sup>. Cada valor representa la media ± S.E.M de 3 experimentos. Análisis de Anova con respecto al control y Sham (\*\*p<0.01).

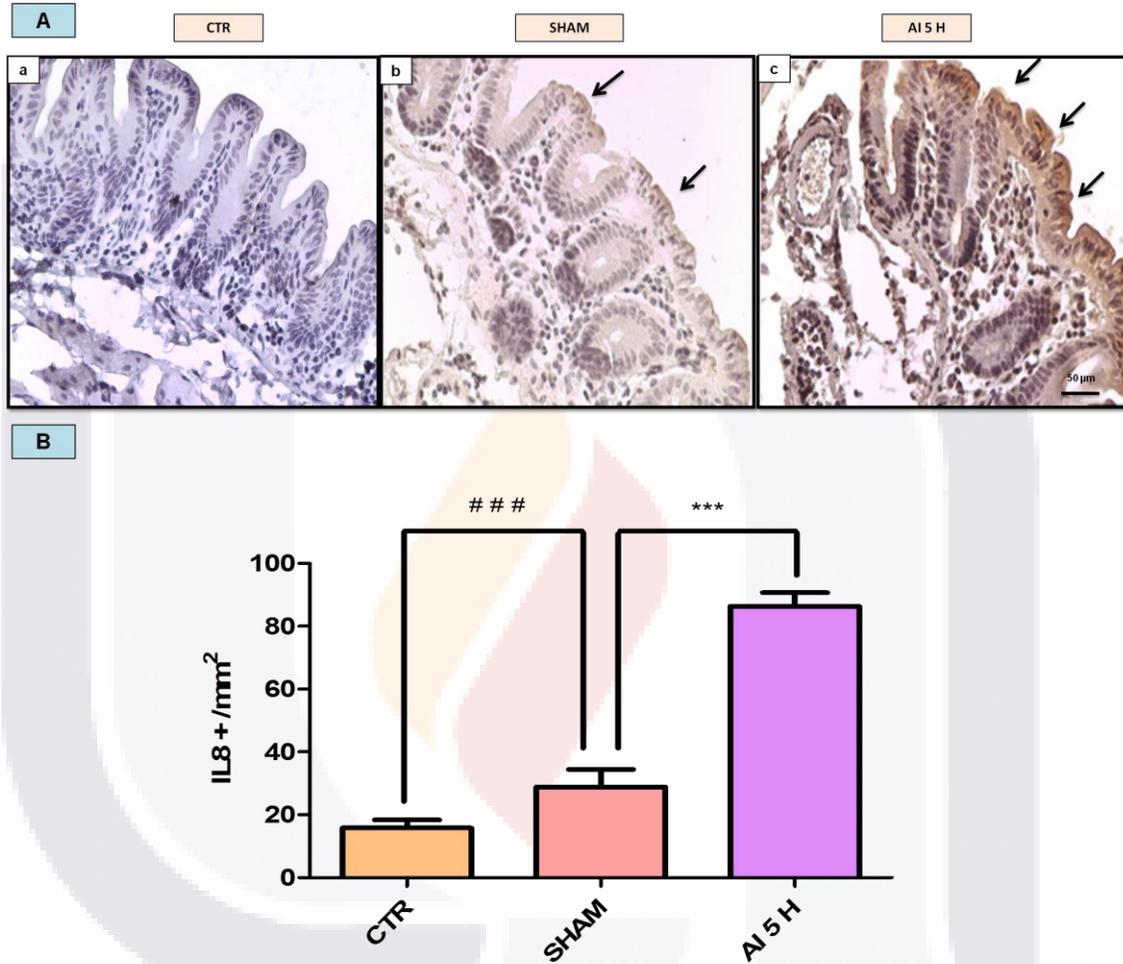
Finalmente a las 20 h encontramos a los trofozoítos en la capa mas externa del intestino (serosa), donde las células positivas a ROS fueron células de la mucosa intestinal y células de la lámina propia (Fig. 6Ac). Las células positivas a ROS presentaron diferencias significativas en el grupo con AI ( $18.56 \pm 0.9821$ ) con respecto al control ( $9.562 \pm 1.454$ ) y Sham ( $10.14 \pm 1.512$ ) (Fig. 6B). Es notorio observar que durante este tiempo, a pesar de que los trofozoítos se encuentran ya en un sitio más externo del intestino, las células de la mucosa siguen mostrando células positivas a ROS. Esto es debido a la capacidad del parásito de liberar componentes amibianos solubles que pueden estimular células alejadas a él (Ventura y cols., 2002).

De acuerdo con los resultados obtenidos durante los distintos tiempo de interacción, hemos observado que *E. histolytica* va induciendo en las células del huésped la producción de ROS que se mantienen constantes durante la amibiasis intestinal. Es posible que la estimulación de ROS durante la invasión sea uno de los mecanismos utilizados por el parásito para dañar a las células del huésped.

### **8.3 E. histolytica induce la producción de IL-8 en células epiteliales y de la respuesta inflamatoria en el intestino de hámster.**

Se ha descrito que la amibiasis induce una respuesta por parte del huésped, que estimula la expresión de factores quimiotácticos y citocinas proinflamatorias. Estudios *in vitro* han mostrado que la inducción en la producción de interleucina 8 (IL-8) funciona como un potente quimio-atrayente que promueve y activa células de la respuesta inmune (Eckmann y cols., 1995; Yu y Chadee, 1998), y que esta producción del IL8 es observada en células epiteliales del colon (Eckmann y cols., 1995; Seydel y cols, 1997). Con base a lo antes mencionado en este trabajo se determinó la presencia de intermediarios solubles como la IL-8, durante el proceso de infección analizando interacciones de 5,10 y 20 h, además de identificar las células productoras de esta citocina. Los datos muestran que a 5 h post-infección, las células del tejido intestinal que interaccionan con los trofozoítos y componentes citotóxicos de la amiba, son estimuladas en producir IL-8 y que estas células en esta primera etapa, en su mayoría son células epiteliales de la mucosa intestinal (Fig. 7Ac). La cuantificación de células IL8+ mostró niveles significativos en el grupo AI ( $86.36 \pm 4.374$ ) comparado con el

grupo control ( $15.81 \pm 2.603$ ) y Sham ( $28.88 \pm 5.569$ ) (Fig. 7B). Podemos observar que en el grupo Sham también presentó una mayor significancia en cuanto al número de células IL-8+ comparadas con el grupo control, debido al efecto del asa cecal realizada.

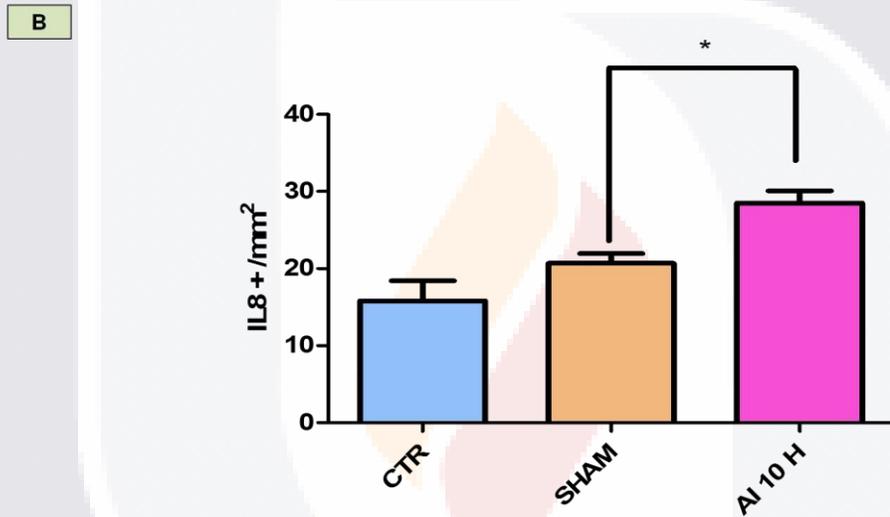
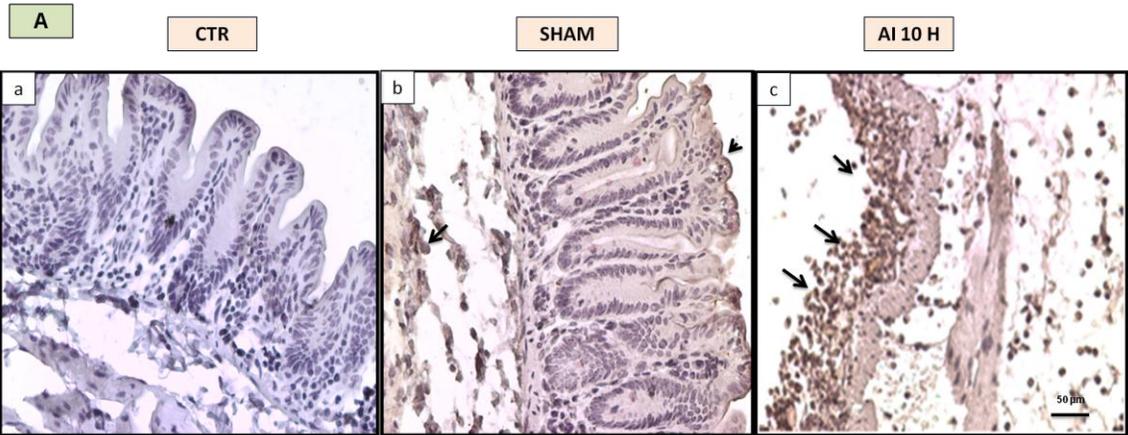


**Figura 7. *E. histolytica* estimula la producción de IL-8 en células de la mucosa intestinal.**

Hámsteres macho fueron inoculados con trofozoítos de *E. histolytica* durante 5 horas y posteriormente mediante la técnica de inmunohistoquímica se analizó y cuantificó a las células IL-8 positivas. **A.** Las imágenes tomadas mediante microscopía óptica muestran células epiteliales IL-8 positivas, localizadas en la mucosa del ciego (→). (a) Control, (b) animal sin amibiasis (c) animal con amibiasis. **B.** Representación cuantitativa de células IL-8 positivas expresadas por mm<sup>2</sup>. Cada valor representa la media ± S.E.M de 3 experimentos. Análisis de Anova con respecto al control y Sham (###) (\*\*p<0.001) y con respecto al Sham y al grupo con AI (\*\*p<0.001)

Posteriormente se analizó que sucedía con *E. histolytica* después de 10 h post-inoculación y mediante microscopia óptica pudimos observar en el ciego que *E. histolytica* había migrado a la submucosa y algunos trofozoítos ya se encontraban en la serosa. Además se observó la presencia de un infiltrado inflamatorio (submucosa y serosa) donde la mayoría de las células presentaban positividad a IL-8, además a este tiempo observamos que las células epiteliales dejaron de presentar positividad para esta citocina. Estos datos nos indican que conforme avanza el parásito en el intestino este va estimulando a distintos tipos celulares a la producción de IL-8, con la finalidad de incrementar la respuesta inmune en el huésped (Fig 8Ac). La cuantificación de células del infiltrado inflamatorio mostró niveles significativos para esta citocina en el modelo de amibiasis ( $28.53 \pm 1.543$ ) comparado con el grupo control ( $15.81 \pm 2.603$ ) y el Sham ( $20.67 \pm 1.289$ ) (Fig. 8B). En lo que respecta al grupo Sham la cuantificación de células positivas a IL-8 no mostró diferencias significativas comparadas con el control, debido al reestablecimiento del organismo al efecto quirúrgico.

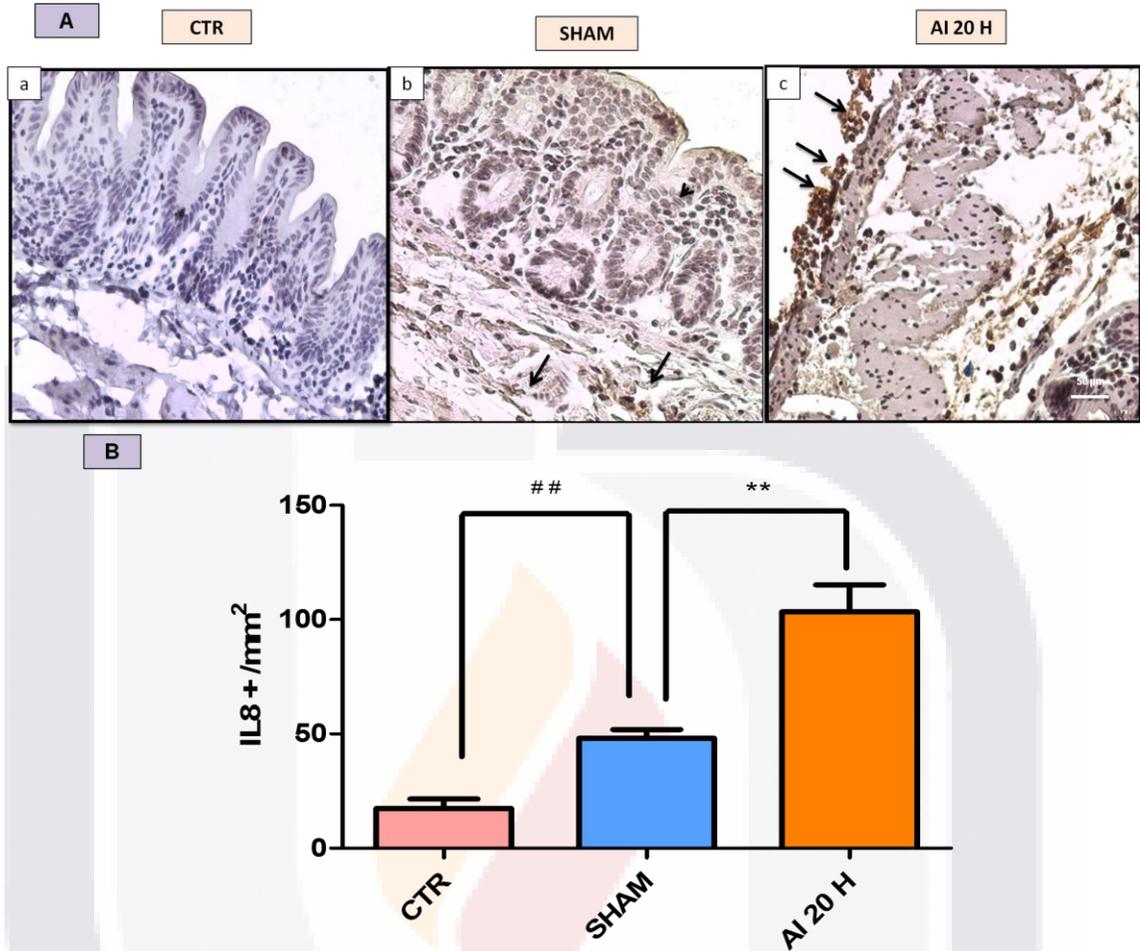
Es importante mencionar que este tiempo pudimos observar que el número de células IL-8 positivas fue menor a la observada a 5 h de interacción. Es posible que esta disminución pueda ser debida a otros estímulos que puedan actuar como reguladores inflamatorios.



**Figura 8. La infección por *E. histolytica* induce la expresión de IL-8 en células de la respuesta inflamatoria.** Hámsteres macho fueron inoculados con trofozoítos de *E. histolytica* durante 10 horas y posteriormente mediante la técnica de inmunohistoquímica se analizó y cuantificó a las células IL-8 positivas. **A.** Las imágenes tomadas mediante microscopía óptica muestran células IL-8 positivas del infiltrado inflamatorio en la submucosa ( → ) y algunas células epiteliales de la mucosa intestinal ( ▶ ). (a) Control, (b) animal sin amibiasis. (c) animal con amibiasis. **B.** Representación cuantitativa de células IL-8 positivas expresadas por mm<sup>2</sup>. Cada valor representa la media ± S.E.M de 3 experimentos. Análisis de Anova con respecto al control y Sham (\*p<0.05).

Finalmente a las 20 h post-inoculación, la localización del parásito fue solamente en la serosa del tejido, el infiltrado inflamatorio se ve aumentado en comparación al infiltrado encontrado a las 10 h. La inmunodetección de IL-8 se denotó específicamente en estas células y las células epiteliales de la mucosa presentan ya una nula positividad a IL-8 (Fig. 9Ac). A este tiempo hemos observado que las células positivas a la IL-8 detectadas en presencia del parásito se incrementan significativamente en el grupo con AI ( $103.5 \pm 11.76$ ) en comparación con el control ( $17.48 \pm 4.096$ ) y Sham ( $48.15 \pm 3.827$ ) (Fig. 9B). Este incremento observado pueda deberse quizá a que a este tiempo los trofozoítos estén interactuando con un mayor número de células inflamatorias reclutadas, y además se ha observado que el parásito es capaz de estimular células encontradas en sitios más alejados, a través de la liberación de componentes amibianos solubles (Ventura-Juárez y cols., 2002).

Con estos resultados podemos observar que durante 5, 10 y 20 h de interacción el parásito es capaz de estimular en el huésped una respuesta inflamatoria activa, a partir de la liberación de IL-8 con la finalidad de reclutar células inflamatorias capaces de contrarrestar el efecto causado por el parásito, sin embargo, hemos observado que a pesar de esto los trofozoítos migran a través del tejido sin ser destruidos, por lo que la respuesta inmune es ineficaz para la resolución de la infección.

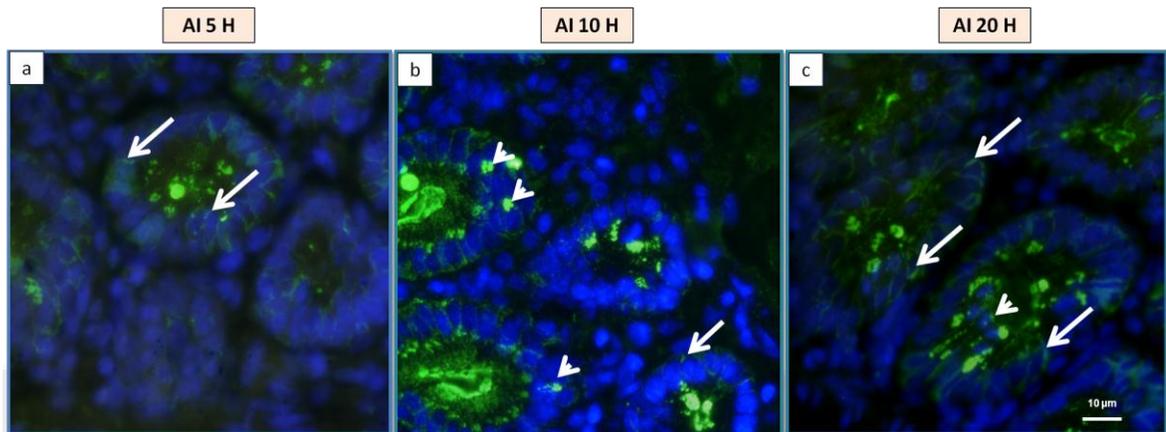


**Figura 9. La infección por *E. histolytica* induce la expresión de IL8 en células de la respuesta inflamatoria en la serosa del intestino.** Hámsteres macho fueron inoculados con trofozoítos de *E. histolytica* durante 20 horas y posteriormente mediante la técnica de inmunohistoquímica se analizó y cuantificó a las células IL-8 positivas. **A.** Las imágenes tomadas mediante microscopía óptica muestran células epiteliales IL-8 positivas, localizadas en la serosa del ciego (→). (a) Control, (b) animal sin amibiasis (c) animal con amibiasis. **B.** Representación cuantitativa de células IL-8 positivas expresadas por mm<sup>2</sup>. Cada valor representa la media ± S.E.M de 3 experimentos. Análisis de Anova con respecto al control y Sham (##) (\*\*p<0.01), y con respecto al Sham y al grupo con AI (\*\*p<0.01).

#### **8.4. *E. histolytica* no induce la activación del factor nuclear $\kappa$ B en el intestino de hámster.**

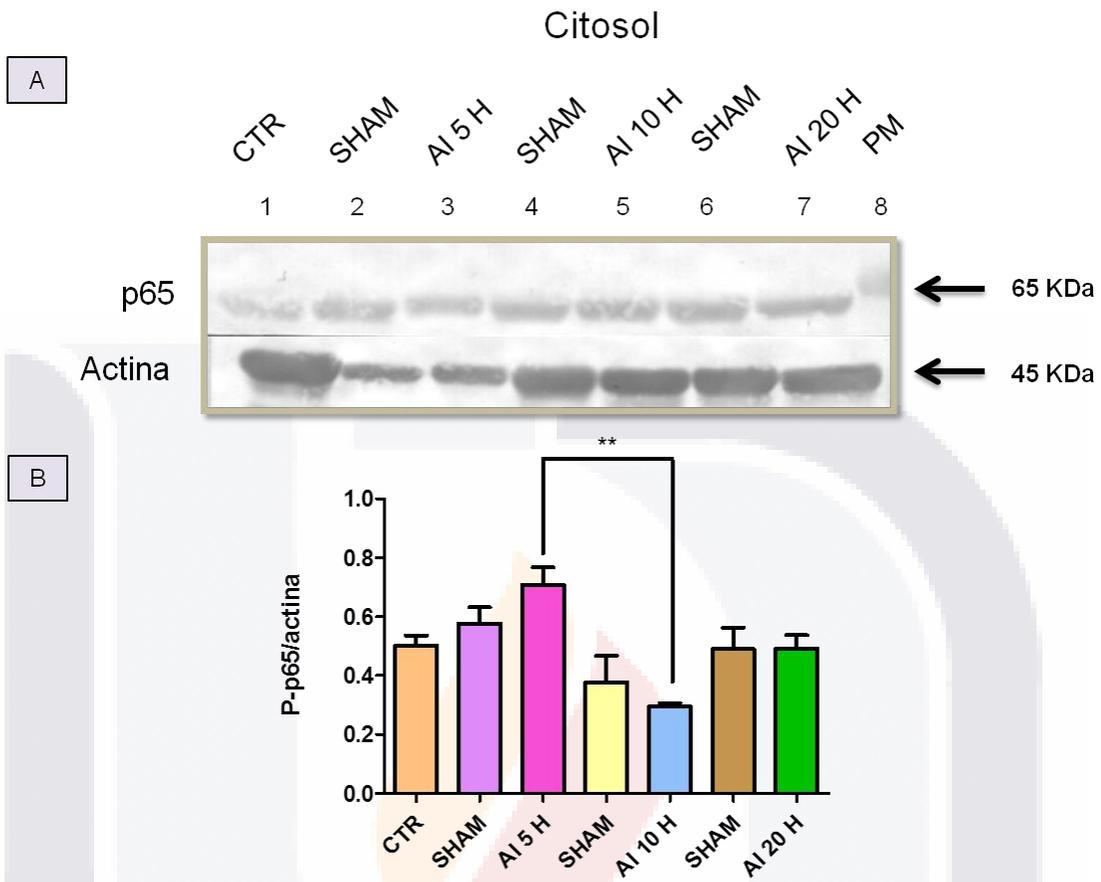
El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción pleiotrópico que regula diversas funciones celulares que van desde la proliferación y muerte celular hasta la respuesta inflamatoria. Se encarga además de dirigir la expresión génica en respuesta a patógenos, incluyendo *E. histolytica* (Seydel y cols., 1998; Maldonado-Bernal y cols., 2005; Kammanadiminti y Chadee, 2006; Kammanadiminti y cols., 2007). La mayoría de investigaciones sobre el NF- $\kappa$ B en las enfermedades asociadas a patógenos se ha centrado en los heterodímeros p50-p65 que por lo general conducen a la expresión de genes pro-inflamatorios en las células inmunes a través de una cascada de activación que van desde el citoplasma al núcleo.

Durante la infección por *E. histolytica* se determinó si el parásito era capaz de estimular al NF- $\kappa$ B para mediar procesos inflamatorios en el huésped durante 5, 10 y 20 h de interacción. Los resultados obtenidos mediante fluorescencia mostraron en los distintos tiempos de interacción la localización del NF- $\kappa$ B tanto en el citosol, como en el núcleo de las células del huésped, (Fig. 10). En el grupo Sham y el grupo con AI no se encontraron diferencias significativas en cuanto al número de células positivas a NF- $\kappa$ B. Sin embargo pudimos observar, que durante los distintos tiempos de interacción las células positivas a este factor se localizaron en las distintas capas del intestino. A las 5 h las células que expresaron positividad fueron células de la mucosa, posteriormente a las 10 h encontramos positividad en células de la submucosa y finalmente a las 20 h encontramos células positivas tanto en la mucosa como en la serosa del intestino.



**Figura 10. NF-κB fosforilado en lesiones amibianas.** Hámsteres macho fueron inoculados con trofozoítos de *E. histolytica* durante 5,10 y 20 horas. Posteriormente mediante la técnica de inmunofluorescencia se analizó y localizó la subunidad p65 fosforilada {P-p65 (NF-κB) S-536 Cell Signalin}. Las imágenes tomadas mediante microscopia de fluorescencia (microscopio Axio Visión Release 4.6.3 SP1) muestran la presencia de P-p65 en el citoplasma (→) y en el núcleo (➤) de las células. (a) animal con amibaisis 5 h, (b) animal con amibaisis 10 h, (c) animal con amibaisis 20 h.

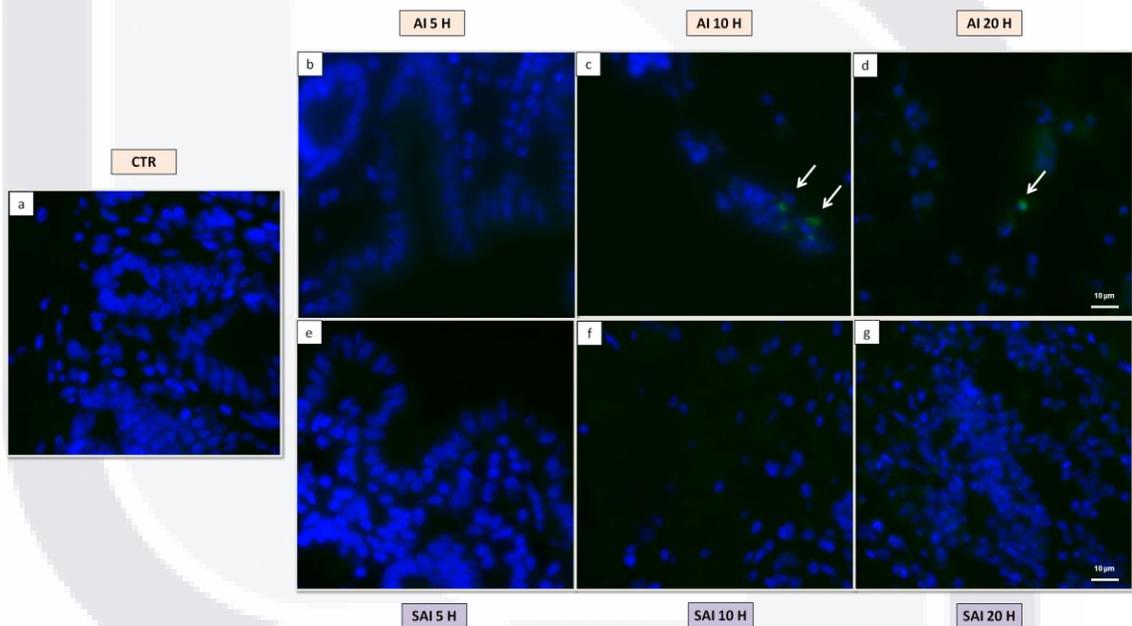
Por otro lado, mediante western blot se llevó a cabo la cuantificación del nivel de expresión del NF-κB identificando para ello la subunidad p65 fosforilada (P-p65), la cual fue analizada en el citosol de las células del tejido. Nuestros resultados mostraron que durante las 5, 10, 20 h de interacción los niveles de expresión de P-p65 fueron detectados solo en niveles basales en los distintos grupos empleados, estadísticamente los valores encontrados no mostraron diferencias significativas entre el grupo con AI 5 h ( $0.7080 \pm 0.05926$ ), el 10 h ( $0.3768 \pm 0.09039$ ) y 20 h ( $0.4928 \pm 0.04469$ ) comparados con el control ( $0.5010 \pm 0.03553$ ) y Sham ( $0.3768 \pm 0.09039$ ). Sin embargo se puede observar que entre el grupo con AI de 5 ( $0.7080 \pm 0.05926$ ) y 10 h ( $0.2953 \pm 0.01203$ ) hay una considerable disminución de la expresión de P-p65 lo cual podría indicarnos posiblemente que se esté llevando a cabo un efecto modulador ante el proceso inflamatorio por parte del huésped (Fig. 11).



**Figura 11. *E. histolytica* no estimula la activación de p65.** Hámsteres macho fueron inoculados con trofozoítos de *E. histolytica* durante 5,10 y 20 horas. Posteriormente mediante western blot se analizó y cuantificó la proteína p65 fosforilada del NF- $\kappa$ B. **A.** Las bandas muestran la proteína p65 en los distintos grupos experimentales, encontrándose en los distintos grupos solo niveles basales. (PM): marcador de peso molecular, (CTR): control, (AI 5 H): animal con amibiasis 5 h, (Sham): animal sin amibiasis, (AI 10 H): animal con amibiasis 10 h, (AI 20 H): animales con amibiasis 20 h. **B.** Se obtuvo la media de la intensidad de las bandas problema y el control. Los resultados fueron normalizados con respecto a la actina y se obtuvo la media  $\pm$  S.E.M de 3 experimentos. Análisis de Anova con respecto al control y Sham. (\*\* $p < 0.01$ )

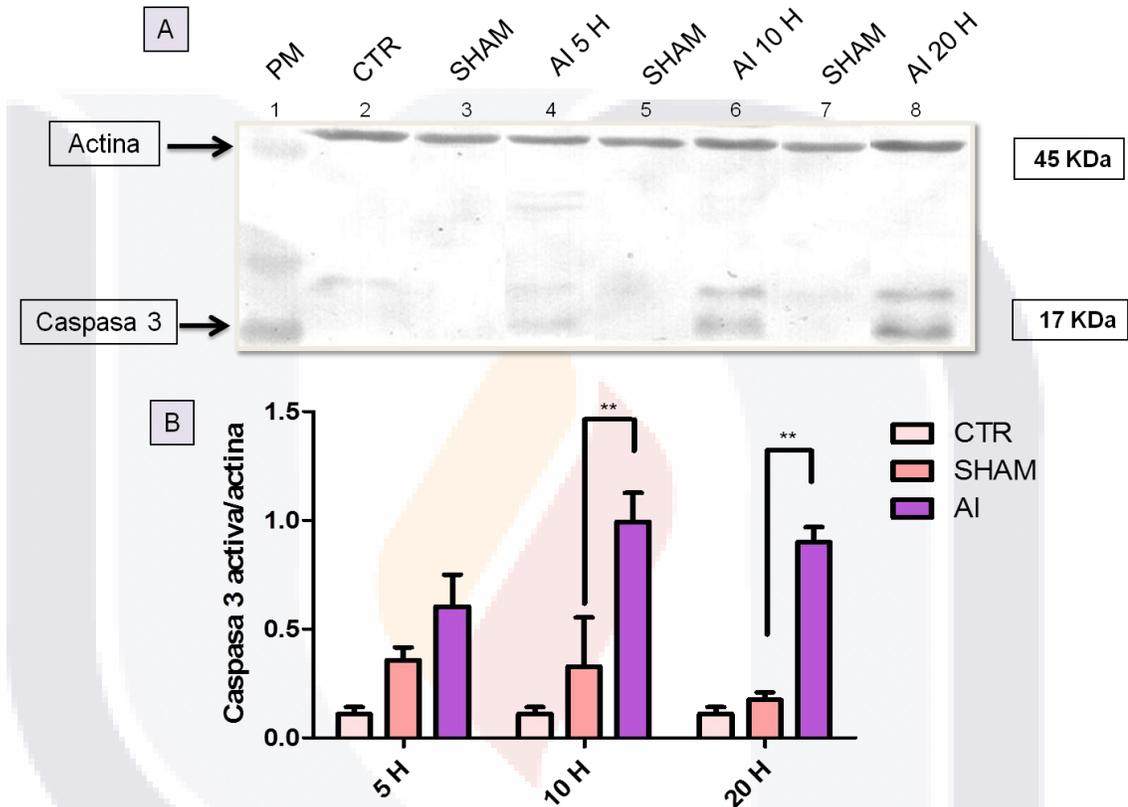
### 8.5 Localización de caspasa 3 activa en ciego de hámster con amibiasis

Durante la infección por *E. histolytica* se han observado una serie de alteraciones morfológicas que conllevan a la destrucción y muerte celular. El mecanismo celular de daño ha sido objeto de numerosos estudios en donde la mayor parte de estos resultados apoyan la idea de que la *Entamoeba* desencadena directamente la apoptosis de la célula huésped a partir de la activación de la caspasa 3. Nosotros estudiamos el rol de la apoptosis en un modelo de amibiasis intestinal en hámster para observar el efecto de dicho daño, analizado a 5, 10 y 20 h.



**Figura 12. *E. histolytica* activa la caspasa 3 activa en células inflamatorias.** Hámsteres macho fueron inoculados con trofozoítos de *E. histolytica* durante 5, 10 y 20 horas, posteriormente mediante la técnica de inmunofluorescencia se analizó y localizó la caspasa 3 activa en las células del tejido. Las imágenes tomadas mediante microscopía de fluorescencia (microscopio Axio Visión Release 4.6.3 SP1) muestran células positivas a caspasa 3 (10 y 20 h), localizadas en la submucosa y serosa del intestino. (a) control, (b) amibiasis intestinal 5 h, (c) amibiasis intestinal 10 h, (d) amibiasis intestinal 20 h, (e) sin amibiasis 5 h, (f) sin amibiasis 10 h, (g) sin amibiasis 20 h. En azul se muestran los núcleos marcados con Hoechst.

Los resultados obtenidos mediante fluorescencia muestran en intestinos con amibas células positivas a caspasa 3 activa localizadas en la submucosa y serosa del tejido (10 y 20 h) correspondiendo posiblemente a células del infiltrado inflamatorio. (Fig 12cd). El núcleo de las células positivas a caspasa 3 presentó una compactación típica de un proceso apoptótico.



**Figura 13. *E. histolytica* induce la activación de caspasa 3 en el ciego de hámster.**

Hámsteres macho fueron inoculados con trofozoítos de *E. histolytica* durante 5,10 y 20 horas, posteriormente mediante western blot se analizó y cuantificó la caspasa 3 en el citosol de las células intestinales. **A.** Las bandas muestran la caspasa 3, en los distintos grupos experimentales con un peso de 17 kDa, encontrándose mayor expresión a 10 y 20 h de interacción. (PM): marcador de peso molecular, (CTR): control, (AI 5 H): animal con amibiasis 5h, (Sham): animal sin amibiasis, (AI 10 H): animal con amibiasis 10 h, (AI 20 H): animales con amibiasis 20 h. **B.** Se obtuvo la media de la intensidad de las bandas problema y el control. Los resultados fueron normalizados con respecto a la actina y se obtuvo la media  $\pm$  S.E.M de 3 experimentos. Análisis de Anova con respecto al control y Sham (\*\* $p < 0.01$ ).

Mediante western blot analizamos e identificamos la presencia de caspasa 3 activa con un peso molecular de 17-kDa. Podemos observar que a las 5 h de interacción la caspasa 3 activa se mantuvo en niveles basales ( $0.6049 \pm 0.1456$ ) comparados con el control ( $0.1108 \pm 0.03136$ ) y Sham ( $0.3586 \pm 0.05836$ ), en el grupo de 10 h pudimos observar un cambio en el nivel de expresión, en donde la cuantificación de esta proteína mostró que en el grupo con AI ( $1.094 \pm 0.08839$ ) presentaban una mayor significancia, la cual no se encontró en el control ( $0.1108 \pm 0.03136$ ) y el Sham ( $0.3283 \pm 0.2267$ ). Posteriormente a las 20 h pudimos observar nuevamente una mayor cantidad de caspasa 3 activa que al ser comparada entre los grupos experimentales, el grupo con AI ( $0.9006 \pm 0.06861$ ) fue el que presentó mayor expresión de esta proteína con respecto al grupo control ( $0.1108 \pm 0.03136$ ) y Sham ( $0.1761 \pm 0.03391$ ) (Fig 13). Cabe mencionar que entre el grupo de AI de 10 y 20 h no se encontraron diferencias significativas.

Estos datos nos sugieren que durante la infección el parásito es capaz de inducir la apoptosis en las células del huésped mediada por la activación de caspasa 3.

## 9. DISCUSION

Una cuestión central en la comprensión de la patogénesis de la amibiasis intestinal es si el daño inducido es el resultado de los mecanismos de patogenicidad del parásito o por la respuesta inflamatoria que se lleva a cabo en el huésped durante el proceso de invasión ó finalmente, una combinación de ambos (Kim y cols, 2004). Los mecanismos de daño por *E. histolytica* son parcialmente conocidos, se ha avanzado en la determinación de que la citotoxicidad del parásito requiere de algunos factores como la lectina Gal / GalNAc, diversas proteínas de membrana del parásito, entrada de calcio a las células diana y la activación de vías apoptóticas (Revisado en Ralston y Petri, 2011), sin embargo, para comprender mejor el o los mecanismos básicos de la patogenia es necesario realizar un estudio más a fondo para conocer cómo el parásito provoca destrucción y muerte celular en el tejido invadido y así mismo dilucidar que sucede con la respuesta inmune en esta patología. En nuestro laboratorio previamente hemos reportado que en colitis fulminante amibiana (FAC) humana existe una activación de la respuesta inmune la cual no es capaz de eliminar al parásito pero si es capaz de contribuir a la patogénesis causando daño celular en las paredes del colon, de tal manera que proponemos el uso de un modelo de amibiasis intestinal en hámster para estudiar diversos factores durante el proceso de infección como; la generación ROS, procesos inflamatorios y la activación de vías intracelulares de señalización que pudiesen estar participando en el desarrollo de la infección.

Nuestro trabajo de amibiasis intestinal en hámster nos permitió observar que durante las primeras horas (5 h) de esta patogenia, los trofozoítos hicieron contacto con las células epiteliales de la mucosa intestinal provocando pérdida de su arquitectura. Posteriormente, estos comienzan a introducirse en la zona de epitelio interglandular hasta la lámina propia; a las 10 h ya se localizaron en la submucosa, donde el tejido adyacente a los parásitos muestran desorganización. Finalmente a las 20 h, el parásito se localizó en la capa mas externa del intestino (serosa). A partir de ahí, probablemente haga su migración a través de los capilares sanguíneos hacia los órganos extra-intestinales. Estos resultados de la destrucción tisular del intestino, coinciden con lo descrito por el grupo de Ventura-Juárez y colaboradores (2007) en

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

casos clínicos de colitis amibiana fulminante. Los mecanismos utilizados por el parásito para llevar a cabo la migración a través del tejido involucran factores que van desde la adhesión a las células del huésped, degradación de los componentes de la matriz extracelular (Pacheco-Yépez y cols., 2000) y quizá uno de los factores más importantes, la apoptosis celular (Revisado en Ralstone y Petri, 2011) que permita destruir células a su paso.

Las ROS son moléculas reactivas derivadas del oxígeno producidas por las células como resultado del metabolismo oxidativo aerobio. Debido a su vida media, las ROS, a concentraciones intracelulares moderadas, son mediadores clave en las rutas de señalización celular; sin embargo, concentraciones elevadas pueden provocar toxicidad y daño celular (Paravicini y Touyz, 2006). En nuestro estudio la detección de ROS en el tejido intestinal fue en los tiempos de 5, 10 y 20 h de interacción. La presencia de ROS fue detectada en células de la mucosa intestinal y células de la lámina propia. Nuestros resultados muestran que *E. histolytica* va induciendo en las células del huésped la producción de ROS que se mantienen constantes durante la amibiasis intestinal, la presencia de ROS durante las infecciones ha sido relacionada con la eliminación de patógenos (Spooner y Yilmaz, 2011), sin embargo, observamos que la migración de los trofozoítos se va llevando a cabo en el intestino. Es posible que la estimulación de ROS durante la invasión sea uno de los mecanismos utilizados por el parásito para dañar a las células del huésped, además se ha descrito que las ROS una vez presentes pueden interactuar en cascadas de señalización relacionadas con la inflamación y la respuesta inmune del organismo. Algunos autores sugieren que la inducción de ROS en las células, es por el incremento en los niveles de cAMP estimulados por la presencia de la Gal-GalNac amibiana, lo que conlleva a una alteración en el transporte intracelular de iones como el calcio (Rawal y cols., 2003) y por un decremento en la actividad de enzimas antioxidantes. Por otro lado, estudios de interacción de *E. histolytica* con neutrófilos *in vitro* mostraron generación y aumento de ROS en los neutrófilos, y sugirieron que el mecanismo fue a través de la NADPH oxidasa (Sim y cols., 2005). También se ha descrito que el incremento en la producción de ROS puede ser inducido por la presencia de citocinas pro-inflamatorias como TNF  $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Meier y col., 1989; Basuroy y col., 2009). Por lo tanto, la presencia de ROS

---

sugiere, que éstas pueden desempeñar un papel fundamental en alteraciones funcionales y estructurales de la células, como se observó *in vitro* en células Caco-2 de colon donde las ROS, conllevaron a mecanismos de muerte por apoptosis (Kim y cols., 2011). La importancia de estos resultados muestra que quizá este sea uno de los mecanismos utilizados por el parásito para eliminar o inactivar a las células del huésped, debido a la implicación que han tenido las ROS en diversos mecanismos celulares.

Estudios *in vivo* e *in vitro* de amibiasis intestinal han demostrado que durante este proceso, hay respuesta inflamatoria que comienza con la activación de diferentes factores de transcripción que inducen la liberación de citocinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$ ). En este sentido Sierra-Puente y colaboradores (2009), demostraron en casos clínicos de colitis amibiana fulminante (FAC) incremento en los niveles de IL-8, producido por las células epiteliales de la mucosa intestinal. En nuestro modelo de amibiasis intestinal el parásito indujo la producción de IL-8 por células epiteliales (5 h) y posteriormente por células del infiltrado inflamatorio (10 y 20 h). Observamos además variaciones de esta citocina en cuanto al tiempo, obteniendo que a las 5 h la producción de IL-8 fue significativa, posteriormente durante las 10 h se aprecia una notoria disminución de IL-8, la cual se ve nuevamente incrementada a las 20 h. Es posible que esta disminución pueda ser debido a otros estímulos como, la participación del TNF y el INF- $\gamma$  los cuales puedan actuar como reguladores inflamatorios y en el caso particular del INF- $\gamma$  se ha descrito que su presencia puede inhibir la IL-8. Por otro lado se ha mencionado que la presencia de ROS como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede tener también un efecto en la regulación de citocinas como la IL-8 (De Oliveira-Marques y cols., 2007) y el TNF  $\alpha$  (Nakao y cols., 2008).

Es posible que *E. histolytica* al estimular la liberación de esta citocina, la utilice en primer lugar para el reclutamiento de neutrófilos a los cuales se les ha asociado con el daño observado en las lesiones amibianas (Seydel y cols, 1997), en segundo lugar para llevar a cabo procesos de motilidad a través del tejido (Blázquez y cols., 2006; Galvan-Moroyoqui y cols., 2008), que le permitan migrar a sitios extraintestinales y causar más daño.

En estudios realizados por el grupo de Ventura-Juárez (2007) demostraron que en FAC las úlceras amibianas detectadas en el intestino dañado, presentaron una gran cantidad de neutrófilos relacionados con la IL-8 producida por el epitelio intestinal. Se ha reportado que los neutrófilos juegan un papel muy importante en la resistencia a la amibiasis debido a que hay suficientes argumentos que apuntan a la interacción de estas células directamente con *E. histolytica* contribuyendo en buena parte a la resolución de la infección (Pertuz-Belloso y Flores-Romo, 2004). En nuestro estudio la IL-8 a pesar de que fue un estímulo constante para el reclutamiento de neutrófilos, detectados en estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, los trofozoítos invaden el tejido sin ser eliminados. Es probable que la atracción de los neutrófilos durante la patogenia sea un mecanismo utilizado por el parásito para aumentar la inflamación y consecuentemente el daño al tejido (Seydel y cols., 1997; García-Zepeda y cols., 2007). Con estos resultados podemos observar que durante 5, 10 y 20 h de interacción el parásito es capaz de estimular en el huésped una respuesta inflamatoria activa, a partir de la liberación de IL-8 con la finalidad de reclutar células inflamatorias capaces de contrarrestar el efecto causado por el parásito, sin embargo, hemos observado que a pesar de esto, los trofozoítos migran a través del tejido sin ser destruidos, por lo que la respuesta inmune es ineficaz para la resolución de la infección.

Consideramos que en este mecanismo de producción de IL-8 podrían estar interviniendo, a) la estimulación de TLR 2 y 4 con la consecuente activación del NF- $\kappa$ B, b) por Protein-quinasas, c) a través de la liberación de moléculas parecidas a las prostaglandinas E2 (PGE2), las cuales actúan sobre receptores EP4 encontrados en las células (Day y Chadee., 2008), provocando con esto la inducción y liberación de la IL-8 y finalmente, d) por la presencia de ROS (LaPointe e Isanovic, 1999; Pueyo y cols., 2000) debido a que en estudios con células de monocitos humanos tratados con antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, observaron que la presencia de ROS juega un papel crucial en la expresión de CXCL8 (IL-8) (Lee y cols., 2009).

El factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), es un factor pleiotrópico que regula diversas funciones celulares que van desde la respuesta inflamatoria hasta la proliferación celular, además dirige la expresión génica en respuesta a patógenos incluyendo *E. histolytica* (Kammanadiminti y Chadee, 2006). La estimulación de cultivos celulares con trofozoítos amibianos han demostrado que durante la infección por este parásito puede observarse tanto en eventos de activación o inhibición del NF- $\kappa$ B. Hou y colaboradores (2009) en células Caco-2 (células colonicas humanas), observaron que a través de la cistein-proteasa 5 (PCP5) se podía inducir la activación del NF- $\kappa$ B mediante la ubiquitinación del modulador NEMO. Por otro lado, el grupo de Kammanadiminti y colaboradores (2006) utilizando células Caco-2 de colon y T84 mostraron que a través de la liberación de proteínas solubles (Sp) por *E. histolytica* puede haber una supresión del NF- $\kappa$ B, no obstante estos estudios han sido realizados en condiciones *in vitro*. Mediante nuestro modelo a través de la técnica de inmunofluorescencia, se observa la localización del NF- $\kappa$ B (P-p65), tanto en el citosol como a nivel nuclear de las células intestinales. Pudimos observar que tanto el grupo Sham y el grupo con AI no se encontraron diferencias significativas en cuanto al número de células positivas a NF- $\kappa$ B. Sin embargo durante los distintos tiempos de interacción las células positivas a este factor se localizaron en las distintas capas del intestino. Encontrando células positivas en la mucosa (5 h y 20 h), submucosa (10 h) y serosa (20 h). Por otro lado la cuantificación del nivel de expresión de P-p65 mediante western blot no mostro diferencias significativas entre los distintos grupos manejados, lo cual nos hace pensar si efectivamente durante la amibiasis intestinal el parásito es capaz de estimular esta vía para inducir el proceso inflamatorio observado. Correlacionado los resultados obtenidos con respecto a la IL-8 se esperaría encontrar una mayor expresión del NF- $\kappa$ B en los grupos con AI en los distintos tiempos analizados ya que se sabe que para que se lleve a cabo la producción de esta citocina es necesaria la activación de factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B (Hoffman y cols., 2002), sin embargo algunos autores también mencionan la participación de otros factores de transcripción tales como AP-1 el cual es sensible a la activación mediante las rutas de transducción de señales del receptor a IL-1 y TNF- $\alpha$  (Hoffman y cols., 2002; Khanjani y cols., 2012) citocinas activas durante la amibiasis (García-Zepeda y cols., 2007). Con base a esto

podríamos pensar que durante la amibiasis se pueda estar llevando a cabo la activación de otros factores de transcripción independientes al NF- $\kappa$ B, lo cual podría sustentar la síntesis de IL-8 a los tiempos de 5, 10 y 20 h donde encontramos esta citocina activa, condición no encontrada en el Sham. Por otro lado, también se ha descrito que las ROS pueden participar en la modulación de este factor, lo cual nos sugiere que al detectar la presencia de ROS en este modelo pudiesen estar jugando un efecto modulador sobre esta vía (Morgan y Liu, 2011).

La potente actividad citotóxica presentada por este parásito está descrito que contribuye al extenso daño tisular en modelos de animales susceptibles (Ralston y Petri 2011). Los mecanismos celulares observados durante la patogenia han sido objeto de numerosos estudios en donde la mayor parte de estos resultados apoyan la idea de que la *Entamoeba* desencadena la muerte celular a través de la activación del proceso apoptótico de la célula huésped en contacto. Este efecto se ha observado en diversas células como: células Jurkat T, células mieloides humanas y murinas, hepatocitos, (Ragland y cols., 1994; Berninghausen y Leippe., 1997; Sim y cols., 2004) neutrófilos, linfocitos T y macrófagos (Petri y cols, 2002). Al explorar este proceso apoptótico en nuestro modelo de amibiasis intestinal, detectamos la presencia de caspasa 3 activa en las interacciones de 10 y 20 h. Las células que presentaron mayor positividad para caspasa 3 fueron células del infiltrado inflamatorio, las cuales presentaron características morfológicas de este proceso, como la condensación del núcleo (Sim y cols., 2005). En modelos de amibiasis intestinal inducida en ratones (C57BL/6) se observó que durante la infección por *E. histolytica* las células cercanas a los trofozoítos presentaron un proceso apoptótico y en co-cultivos utilizando células Jurkat T este proceso apoptótico mostró características como la degradación del ADN y la disfunción mitocondrial (Becker y cols., 2010). En la interacción de 5 h no hubo un aumento en la expresión de esta proteína, en donde solo pudimos encontrar niveles basales de expresión. La mucosa intestinal presentó pequeñas zonas de daño casi no perceptibles. Huston y colaboradores (2000), Becker y colaboradores (2010) mencionan que la amiba es capaz de efectuar la apoptosis en cuestión de minutos pero hasta el contacto directo de la amiba con la célula, en un estudio utilizando modelos de explantes de colón humano, Bansal y colaboradores (2009) reporta el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tiempo que tarda el trofozoíto en interactuar directamente con células de la mucosa, donde observan que los trofozoítos hasta las 4 h pueden estar en contacto con las células, siempre y cuando la mucina que recubre al epitelio haya sido eliminada. Por lo tanto esto nos indica que durante el establecimiento de la infección el parásito si induce un proceso apoptótico importante sobre las células del huésped, siempre y cuando se de un contacto amiba-célula.

Mucho se ha cuestionado sobre cuál sería el mecanismo que emplea el parásito para inducir la apoptosis. Los trabajos realizado solo hacen referencia de que el parásito lleva a cabo este proceso a través de la activación directa de la caspasa 3, sin embargo, el hecho de está activación debe de implicar quizá otras moléculas que le permitan inducir este proceso. En estudios *in vitro* con células Jurkat T observaron que la degradación mediada por la calpaína-calpastatina juega un papel crucial en la regulación de la activación de la caspasa-3 en la apoptosis de estas células (Kim y cols., 2007). Además observaron que durante este proceso también hay incremento en los niveles intracelulares de calcio, el cual parece ser inducido por la presencia de la Gal / GalNAc (Radvin y cols., 1988). Es posible que la presencia de calcio pueda a su vez activar a las proteasas dependientes de calcio como las calpains y a la proteína tirosin-fosfatasa (PTP1B) provocando daño en las célula diana (Texeira y Mann., 2002). Sin embargo, aun existen muchas aspectos que se desconocen sobre el mecanismo que emplea *E. histolytica* para inducir la apoptosis a través de la activación directa de la caspasa 3. Nosotros podríamos pensar que la apoptosis observada durante este modelo pudiese estar relacionada con la presencia de ROS debido a que existen evidencias que sugieren la participación de ROS con la activacion de receptores de muerte y la inducción de la apoptosis (Circu y Aw, 2010), además se ha documentado el efecto de las ROS sobre la activación de caspasas como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> el cual puede activar la caspasa 3 y 8 a través de la oxidación catalítica de las cisteínas (Borutaite y Brown, 2001). Sin embargo, en la actualidad no existen estudios sobre la relación de ROS en este proceso apoptótico durante la amibiasis intestinal, lo cual seria un punto de estudio a seguir.

## 10. CONCLUSIONES

- Durante la amibiasis, *E. histolytica* induce en las células epiteliales e inflamatorias aumento en la producción de ROS, probablemente este mecanismo sea responsable de activar vías de inflamación o muerte.
- La expresión de IL-8 activa el reclutamiento de células inflamatorias, sin embargo, *E. histolytica* continúa migrando a través del tejido con la posibilidad de invadir otros tejidos extraintestinales.
- La vía del NF- $\kappa$ B en el modelo de amibiasis intestinal no participa como mediador en los procesos inflamatorios.
- Las células caspasa 3 positivas sufren muerte por apoptosis permitiendo así la migración de los parásitos.

## 11. GLOSARIO

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| <b>Apaf-1</b>                     | Factor activador de apoptosis-1                           |
| <b>C3a, C5a</b>                   | Proteínas del Complemento                                 |
| <b>CAM</b>                        | Moléculas de Adhesión Celular                             |
| <b>CSF-GM</b>                     | Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos |
| <b>EhCP</b>                       | Cisteín-Proteasa  |
| <b>ERK</b>                        | Cinasas del receptor extracelular                         |
| <b>FAC</b>                        | Colitis amibiana fulminante                               |
| <b>FEC-1</b>                      | Factor estimulante de colonias 1                          |
| <b>Gal-GalNac</b>                 | Galactosa-N-acetil-Dgalactosamina                         |
| <b>GPx</b>                        | Glutación peroxidasa                                      |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Peróxido de hidrógeno                                     |
| <b>HOCl</b>                       | Ácido hipocloroso   |
| <b>IgA</b>                        | Inmunoglobulina A   |
| <b>IgG</b>                        | Inmunoglobulina G   |
| <b>IL</b>                         | Interleucina  |
| <b>INF-γ</b>                      | Interferón gamma  |
| <b>Ikk</b>                        | Enzima quinasa Ikk  |
| <b>JNK</b>                        | Cinasa N-terminal   |
| <b>MAPK</b>                       | Proteínas cinasas activadas por mitógenos                 |
| <b>MnSOD</b>                      | Superóxido dismutasa de manganeso                         |
| <b>NF-κB</b>                      | Factor nuclear Kb   |
| <b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>  | Anión superóxido  |
| <b>OH<sup>·</sup></b>             | Radical hidroxilo   |
| <b>ON</b>                         | Oxido nítrico   |
| <b>PCP5</b>                       | Pro-madura cisteín-proteasa                               |
| <b>PGE2</b>                       | Prostaglandinas E2  |
| <b>PTP1B</b>                      | Proteína tirosin-fosfatasa                                |
| <b>ROS</b>                        | Especies reactivas de oxígeno                             |
| <b>ROS</b>                        | Especies reactivas de oxígeno                             |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>RRP</b>                     | Receptores de reconocimiento de patrones  |
| <b>SCID-HU-INT</b>             | Ratones con inmunodeficiencia severa combinada con trasplante de intestino humano |
| <b>SOD</b>                     | Superoxido dismutasa  |
| <b>Sp</b>                      | Proteínas solubles  |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b>  | Factor transformador del crecimiento beta   |
| <b>Th</b>                      | Células T cooperadoras  |
| <b>TLR</b>                     | Receptores tipo Toll  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Factor de necrosis tumoral-alfa   |
| <b>Zn-SOD</b>                  | Superóxido dismutasa cobre-zinc   |



## 12. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, K.A. Lichtman, A.H. Pober, J.S. 2002. Mecanismos efectores de las respuestas inmunitarias, Técnicas de laboratorio de uso habitual en la inmunología. En: Inmunológica Celular y Molecular, Cuarta Edición, Editorial McGraw, USA. pp 280- 300.
- Anaya-Velázquez, F. Martínez-Palomo, A. Tsutsumi, V. González-Robles, A. 1985. Intestinal invasive amebiasis: an experimental model in rodents using axenic or monoxenic strains of *Entamoeba histolytica*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 34(4) pp 723-30.
- Avello, M. Suwalsky, M. 2006. Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular. Atenea. 494 pp 161-172.
- Banki, K. Hutter, E. Gonchoroff, N.J. Perl, A. 1999. Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occurs independently from activation of caspase in Fas signaling. Journal of Immunology. 162(3) pp 1466-79.
- Bansal, D. Ave, P. Kerneis, S. Frileux, P. Boché, O. Baglin, A.C. Dubost, G. Leguern, A.S. Prevost, M.C. Bracha, R. Mirelman, D. Guillén, N. Labruyère, E. 2009. An ex-vivo Human Intestinal Model to Study *Entamoeba histolytica*. PLoS Neglected Tropical Diseases. 3(11) pp 551.
- Basuroy, S. Bhattacharya, S. Leffler, C.W. Parfenova, H. 2009. Nox4 NADPH oxidase mediates oxidative stress and apoptosis caused by TNF{alpha} in cerebral vascular endothelial cells. American Journal of Physiology. Cell Physiology. 296(3) pp 422-32.
- Belley, A. Keller, K. Göttke, M. Chadee, K. 1999. Intestinal mucin in colonization and host defense against pathogens. Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 60(4) pp 10-15.
- Belloso, P. Saloma, P. Benitez, I. Soldevila, G. Olivos-García, A. García-Zepeda, E. 2004. *Entamoeba histolytica* cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic. Parasite Immunology. 26(5) pp 237-41.
- Beckman, J.S. Beckman, T.W. Chen, J. Marshall, P.A. Freeman, B.A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America. 87(4) pp1620–1624.
- Beinke, S. Ley, S.C. 2004. Functions of NF-kappa B1 and NF-kappa B2 in immune cell biology. *Biochemical Journal*. 382(Pt 2) pp 393-409.
- Bekker-Mendez, V.C. Pérez-Castillo, V.L. Rico-Rosillo, M.G. Pérez-Rodríguez, M. Arellano-Blanco, J. Kretschmer-Schmid, R.R. Talamás-Rohana, P. 2006. Downregulation of selected cytokines in amebiasis. *Archives of Medical Research*. 37(4) pp 556-8.
- Becker, S.M. Cho, K.N. Guo, X. Fendig, K. Oosman, M.N. Whitehead, R. Cohn, S.M. Houpt, E.R. 2010. Epithelial cell apoptosis facilitates *Entamoeba histolytica* infection in the gut. *American Journal of Pathology*. 176(3) pp 1316-22.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 2(1-2) pp 248-254.
- Berninghausen, O. Leippe, M. 1997. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*. 65(9) pp 3615-21.
- Blazquez, S. Zimmer, C. Guigon, G. Olivo-Marin, J.C. Guillen, N. Labruyère, E. 2006 Human tumor necrosis factor is a chemoattractant for the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity* 74(2) pp 1407-11.
- Bonizzi, G. Karin, M. 2004. The two NF-kappa B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunology*. 5(6) pp 280-8.
- Borutaite, V. Brown, G.C. 2001. Caspases are reversibly inactivated by hydrogen peroxide. 500(3) pp 114-8.
- Caballero, A. Viveros, M. Salvatierra, B. Tapia, R. Sepúlveda, J. Gutierrez, G. y Ortiz-Ortiz, L. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in México. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*. 50(4) pp 412-9.

- Campbell, D. Chadee, K. 1997. Interleukin (IL)-2, IL-4, and tumor necrosis factor-alpha responses during *Entamoeba histolytica* liver abscess development in gerbils. *Journal of Infection Diseases*. 175(5) pp 1176-83.
- Casados-Vázquez, L.E. Lara-González, S. Brieba, L.G. 2010. Crystal structure of the cysteine protease inhibitor 2 from *Entamoeba histolytica*: functional convergence of a common protein fold. *Gene*. 471(1-2) pp 45-52.
- Circu, M.L. Aw, T.Y. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Free Radical Biology Medicine*. 48(6) pp 749-62.
- Connaris, S. Greenwell, P. 1997. Glycosidases in mucin-dwelling protozoans. *Journal Glycoconjugate*. 14(7) pp 879-82.
- Chandra, J. Samali, A. Orrenius, S. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 29 (3-4) pp:323–333.
- Chadee, K. Petri, W.J. Innes, D.J. Ravdin, J.I. 1987. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Clinical Investigation*. 80(5) pp 1245–1254.
- Chadee, K. Keller, K. Forstner, J. Innes, D.J. Ravdin, J.I. 1991 . Mucin and nonmucin secretagogue activity of *Entamoeba histolytica* and cholera toxin in rat colon. *Gastroenterology*. 100(4) pp 986-97.
- Chen, J. Adikari, M. Pallai, R. Parekh, H.K. Simpkins, H. 2008. Dihydrodiol dehydrogenases regulate the generation of reactive oxygen species and the development of cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 61(6) pp 979-87.
- Christopherson, K. Bredt, D. 1997. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *Journal Clinical Investigation*. 100(10) pp 2424-9.
- Cho, K.N. Becker, S.M. Houpt, E.R. 2010. The NF- $\kappa$ B p50 Subunit Is Protective during Intestinal *Entamoeba histolytica* Infection of 129 and C57BL/6 Mice. *Infection and immunity*. 78(4) pp 1475-81.

- Das, K.C. Lewis-Molock, Y. 1995. White CW. Activation of NF-kappa B and elevation of MnSOD gene expression by thiol reducing agents in lung adenocarcinoma (A549) cells. *American Journal Physiology*. 269(5 Pt 1) pp L588-L602.
- Desagher, S. Osen-Sand, A. Nichols, A. Eskes, R. Montessuit, S. Lauper, S. Maundrell, K. Antonsson, B. Martinou, J.C. 1999. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *Journal Cell Biology*. 144(5) pp 891-901.
- Dey, I. Chadee, K. 2008. Prostaglandin E2 produced by *Entamoeba histolytica* binds to EP4 receptors and stimulates interleukin-8 production in human colonic cells. *Infection and Immunity* 6(11) pp 5158-63.
- Dey, I. Giembycz, M.A. Chadee, K. 2009. Prostaglandin E(2) couples through EP(4) prostanoid receptors to induce IL-8 production in human colonic epithelial cell lines. *British Journal of Pharmacology*. 156(3) pp 475-85.
- De Oliveira-Marques, V. Cyrne, L. Marinho, H.S. Antunes, F.A. 2007. Quantitative study of NF-kappaB activation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: relevance in inflammation and synergy with TNF-alpha. *Journal Immunology*. 178(6) pp 3893-902.
- Diamond, L.S. 1980. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*: progress and problems. *Archives of medical investigation*. 11(1 Suppl) pp 47-54.
- Earnshaw, W.C. Martins, L.M. Kaufmann, S.H. 1999. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 68 pp 383-424.
- Eckmann, L. Reed, S.L. Smith, J.R. Kagnoff, M.F. 1995. *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. *Journal of clinical Investigation*. 96(3) pp 1269-79.
- Eichinger, D. 2001. A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba histolytica*. *Journal Eukaryot Microbiology*. 48(1) pp17-21.
- Espinosa-Cantellano, M. Martínez-Palomo, A. 1991. The plasma membrane of *Entamoeba histolytica*: structure and dynamics. *Biology Cell*. 72(3) pp 189-200.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Espinosa-Cantellano, M. Martínez-Palomo, A. 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 13 pp 318-331.
- Forman, H. J. Torres, M. 2002. Reactive oxygen species and cell signaling. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*. 166(12 Pt 2) pp 4-8.
- Finkel, T. Holbrook, N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408 pp 23-247.
- García-Zepeda, E.A. Rojas-López, A. Esquivel-Velázquez, M. Ostoa-Saloma, P. 2007. Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis. *Parasite Immunology*. 29(12) pp 679-84.
- Gamaley, I.A. Kluybin, I.V. 1999. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *International Review Cytology*. 188 pp 203-55.
- Galván-Moroyoqui, J.M. Del Carmen Domínguez-Robles, M. Franco, E. Meza I. 2008. The Interplay between *Entamoeba* and Enteropathogenic Bacteria Modulates Epithelial Cell Damage. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2(7)pp 266.
- Griffiths, G.J. Dubrez, L. Morgan, C.P. Jones, N.A. Whitehouse, J. Corfe, B.M. Dive, C. Hickman, J.A. 1999. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *Journal of Cell Biology*. 144(5) pp 903-14.
- Guo, X. Houpt, E, Petri, W.A. 2007. Crosstalk at the initial encounter: interplay between host defense and ameba survival strategies. *Current Opinion in Immunology*. 9(4) pp 376-84.
- Guo, X. Stroup, S.E. Houpt, E.R. 2008. Persistence of *Entamoeba histolytica* infection in CBA mice owes to intestinal IL-4 production and inhibition of protective IFN-gamma. *Mucosal Immunology*. 1(2) pp 139-46.
- Gómez. J.C. Cortés, J.A. Cuervo, S.I. López, M.C. 2007. Amibiasis intestinal. *Infection*. 11(1) pp 36-45.
-

- Haddad, J.J. 2004. Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: Immunopharmacoredox conception of oxidative siege versus cell death commitment. *International Immunopharmacology*. 4(4) pp 475-93.
- Halliwell, B. Gutteridge, J.M.C.1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and diseases. *Biochemical*. 219(1) pp 1-14.
- Hatada, E.N. Nieters, A. Wulczyn, F.G. Naumann, M. Meyer, R. Nucifora, G. McKeithan, T.W. Scheidereit, C.1992. The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding. *Proceedings of the national Academy of sciences U.S.A.* 89(6) pp 2489-93.
- Hayden, M.S. Ghosh, S. 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 132(3) pp 344-62.
- Hoffmann, E. Dittrich-Breiholz O. Holtmann, H. Kracht, M. 2002. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of Leukocyte Biology*. 72(5) pp 847-55.
- Huston, C.D. Houpt, E.R. Mann, B.J. Hahn, C.S. Petri, W.A. 2000. Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiology*. 2(6) pp 617-25.
- Hou, Y. Mortimer, L. Chadee, K. 2009. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 5 binds integrin on colonic cells and stimulates NFkappa B mediated pro-inflammatory responses. *Journal of Biological Chemistry*. 285(46) pp 35497-504.
- Huston, C. Boettner, D. Miller, V. Petri, W. 2003. Apoptotic Killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection Immunity*. 71(2) pp 964-972.
- Jarillo-Luna, R.A. Campos Rodríguez, Tsutsumi. V. 2002. *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. *Experimental Parasitology*. 101(1) pp 40-56.
- Jones, P.L. Ping, D. Boss, J.M. 1997. Tumor Necrosis Factor alpha and interleukin-1beta regulate the murine manganese super-oxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP-beta and NF-kappaB. *Molecular Cellular Biology*.17(12) pp 6970-81.

- Kammanadiminti, S. J. Chadee, K. 2006. Suppression of NF- $\kappa$ B activation by *Entamoeba histolytica* in intestinal epithelial cells is mediated by heat shock protein 27. *Journal of Biological Chemistry*. 281(36) pp 26112-20.
- Kammanadiminti, S. J. Dey, I. Chadee, K. 2007. Induction of monocyte chemotactic protein 1 in colonic epithelial cells by *Entamoeba histolytica* is mediated via the phosphatidylinositol 3-kinase/p65 pathway. *Infection and Immunity*. 75(4) pp 1765-70.
- Kabe, Y. Ando, K. Hirao, S. Yoshida, M. Handa, H. 2005. Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxidants Redox Signaling*. 7(3-4) pp 395-403.
- Kaufmann, S.H. Earnshaw, W.C. 2000. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*. 256(1) pp 42-9.
- Kim, K.H. Rodríguez, A.M. Carrico, P.M. Melendez, J.A. 2001. Potential mechanisms for the inhibition of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Antioxidants Redox Signaling*. 3(3) pp 361-73.
- Kim, K. Lee, Y. Shin, M. 2007. Calpain-dependent calpastatin cleavage regulates caspase 3 activation during apoptosis of Jurkat T cells induced by *Entamoeba histolytica*. *Journal of Parasitology*. 37(11) pp 1209-1219.
- Kim, K.A. Kim, J.Y. Lee, Y.A. Song, K.J. Min, D. Shin, M.H. 2011. NOX1 participates in ROS-dependent cell death of colon epithelial Caco2 cells induced by *Entamoeba histolytica*. *Microbes and Infection*. 13(12-13) pp 1052-61.
- Kroemer, G. Dallaporta, B. Resche-Rigon, M. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review Physiology*. (60) pp 619-642.
- Khan, I. Schwartzman, J. Matsuura, T. Kasper, L. 1997. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Proceedings National Academy of Sciences*. 94(25) pp 13955-13960.

- Khanjani, S. Terzidou, V. Johnson, M.R. Bennett, P.R. 2012. NF- $\kappa$ B and AP-1 Drive Human Myometrial IL-8 Expression. *Mediators of inflammation*. 504952 pp 8.
- Kyou-Nam, C. Becker, S. Houpt, E. 2010. The NF- $\kappa$ B p50 Subunit Is Protective during Intestinal *Entamoeba histolytica* Infection of 129 and C57BL/6. *Infection and Immunity*. 78(4) pp1475-81.
- LaPointe, M.C. Isenović, E. 1999. Interleukin-1beta regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 involves the p42/44 and p38 MAPK signaling pathways in cardiac myocytes. *Hypertension*. 33(1 Pt 2) pp 276-82.
- Leis, M. Single, B. Naumann, H. Fava, E. Simon, B. Kuhnle, S. Nicotera, P. 1999. Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Experimental Cell Research*. 249(2) pp 396-403.
- Leroy, A. De Bruyne, G. Mareel, M. Nokkaew, C. Bailey, G. Nelis, H. 1995. Contact-dependent transfer of the galactose specific lectin of *Entamoeba histolytica* to the lateral surface of enterocytes in culture. *Infection and Immunity*. 63(11) pp 4253-60.
- Leroy, A. Lauwaet, T. De Bruyne, G. Mareel, M. 2000. *Entamoeba histolytica* disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers. *FASEB Journal*. 14(9) pp 1139-46.
- Lee, H.M. Shin, D.M. Kim, K.K. Lee, J.S. Paik, T.H. J, E.K. 2009. Roles of reactive oxygen species in CXCL8 and CCL2 expression in response to the 30-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Immunology*. 29(1) pp 46-56.
- Lidell, M.E. Moncada, D.M. Chadee, K. Hansson, G.C. 2006. *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proceedings of the National Academy of Science of U.S.A.* 103(24) pp 9298-303.
- Liu, H. Nishitoh, H. Ichijo, H. Kyriakis, J.M. 2000. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Molecular and Cellular Biology*. 20(6) pp 2198-208.

- Lynch, R. Fridovich, I. 1978. Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *Journal Biological Chemistry*. 253(13) pp 4697-9.
- Loftus, B. Anderson, I. Davies, R. Alsmark, U. Samuelson, J. Amedeo, P. 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*. 433(7028) pp 865-8.
- López-Monteon, A. Ramos-Ligonio, A. Pérez-Castillo, L. Talamás-Rohana, P. Rosales-Encina, J.L. 2003. Specific antibody immune response against the parasitic portion of a glutathione-S-transferase fusion protein. *FASEB*. 17(6) pp 621-7.
- Martínez-Palomo, A. 1987. The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitology Today*. 3(4) pp 111-8.
- Mates, J.M. Sanchez-Jimenez, F.M. 2000. Role of reactive oxygen species in apoptosis: Implications for cancer therapy. *International Journal Biochemistry Cell Biology*. 32(2) pp 157-70.
- Maldonado-Bernal, C. Kirschning, C.J. Rosenstein, Y. Rocha, L.M. Rios-Sarabia, N. Espinosa-Cantellano, M. Becker, I. Estrada, I. Salazar-González, R.M. López-Macías, C. Wagner, H. Sánchez, J. Isibasi, A. 2005. The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by Toll-like receptors 2 and 4. *Parasite Immunology*. 27(4) pp 127-37.
- McGuinness, D.H. Dehal, P.K. Pleass, R.J. 2003. Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends of Parasitology*; 19:312-9.
- Meza, I. Torres, H. Meraz, A. 1994. Organización Molecular de *Entamoeba histolytica*. En. *Amibiasis, Infección y Enfermedad por Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas, México. pp. 39-55.
- Melino, G, Bernassola, F. Knight ,R.A.,Corasaniti MT, Nistico, G. Finazzi-Agro, A. 1997. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature*. 388(6641) pp 432-3.
- Meier, B. Radeke, H.H. Selle, S. Younes, M. Sies, H. Resch, K. Habermehl, G.G. 1989. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *The Biochemical Journal*. 263(2) pp 539-45.

- Meurens, F. Girard-Misguich, F. Melo, S. Grave, A. Salmon, H. Guillén, N. 2009. Broad early immune response of porcine epithelial jejunal IPI-2I cells to *Entamoeba histolytica*. *Molecular Immunology*. 46(5) pp 927-36.
- Michael, J. M. Liu, Z. 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Research* 21(1) pp 103-15.
- Mortimer, L. Chadee, K. 2010. The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology*. 126(3) pp 366-80
- Morgan, M.J. Kim, Y.S. Liu, Z.G. 2008. TNF $\alpha$  and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell Research*. 18(3) pp 343-9.
- Morgan, M.J. Liu, Z.G. 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Research*. 21(1) pp 103-15.
- Naik, E. Dixit, V. M. 2011. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *Journal Experimental Medicine*. 208(3) pp 417-20.
- Noguchi, T. Takeda, K. Matsuzawa, A. Saegusa, K. Nakano, H. Gohda, J. Inoue, J. Ichijo, H. 2005. Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*. 280(44) pp 37033-40.
- Nakahira, K. J. A. Haspel, V. A. K. Rathinam, S. J. Lee, T. Dolinay, H. C. Lam, J. A. Englert, M. Rabinovitch, M. Cernadas, H.P. Kim, K.A. Fitzgerald, S.W. Ryter, and A.M. Choi. 2011. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature Immunology*. 12(3) pp 222-30.
- Nakao, N. Kurokawa, T. Nonami, T. Tumurkhuu, G. Koide, N. Yokochi, T. 2008. Hydrogen peroxide induces the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  in RAW 264.7 macrophage cells via activation of p38 and stress activated protein kinase. *Innate Immunology*. 14(3) pp 190-6.

- Pacheco-Yépez, J. Campos, R. Serrano, J. Espinosa, M. Petri, W. Tsutsumi, V. Shibayama, M. 2000. *Entamoeba histolytica*: localization of theGal/GalNAc adherence lectin in experimental amebic liver abscess. Archives of Medical Research. 31 pp S242-4.
- Pacheco-Yépez, J. Campos-Rodríguez, R. Shibayama, M. Ventura-Juárez, J. Serrano-Luna, J. Tsutsumi, V. 2001. *Entamoeba histolytica*: production of nitric oxide and in situ activity of NADPH diaphorase in amebic liver abscess of hamsters. Parasitology Research. 87(1) pp 49-56.
- Paulsen, C.E. Carroll, K.S. 2010. Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. Chemical Biology. 5(1) pp 47-62.
- Paravicini, T.M. Touyz, R.M. 2006. Redox signaling in hipertensión. Cardiovascular Research. 71 (2) pp 247-58.
- Pérez-Tamayo, R. Martínez, R. Montfort, I. Becker, I. Tello, E. Pérez-Montfort, R. 1991. Pathogenesis of acute experimental amebic liver abscess in hamsters. Journal of Parasitology. 77(6) pp 982-8.
- Pelicano, H. Carney, D. Huang, P. 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. Drug Resistance Updatates: Review and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemoteraphy. 7(2) pp 97-110.
- Petri, W. 2002. Pathogenesis of Amebiasis. Current Opinion Microbiology. 5(4) pp 443-7
- Petri, W. A., R. Haque, and B. J. Mann. 2002. The bitterweest interface of parasite and host: lectin carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. Annuals. Reviews Microbiology. 56 pp 39-64.
- Pertuz-Belloso, S.B. Flores-Romo, L. 2004. Papel de la respuesta inmune celular en la resolución a la amibiasis. Bioquímica. 29(3) pp 91-98.
- Pomytkin, I.A. Kolesova, O.E. 2002. Key role of succinate dehydrogenase in insulin-induced inactivation of protein tyrosine phosphatases. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 133(6) pp 568 70.

- Pueyo, M.E. Gonzalez, W. Nicoletti, A. Savoie, F. Arnal, J.F. Michel, J.B. 2000. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 20(3) pp 645-51.
- Que, X. Reed, S. 2000. Cysteine proteinase and the pathogenesis of amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 13(2) pp 196-206
- Ralston, K.S. Petri, W.A. 2011. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends in Parasitology*. 27(6) pp 254-63.
- Ramírez-Emiliano, J. Lerida, L. Flores-Villavicencio, J. Arias-Negrete, S. 2007. Participación del Oxido Nítrico durante el desarrollo del absceso hepático amebiano. *Medicina*. 67(2) pp 167-76.
- Ranganathan, A. C. Nelson, K. K. Rodriguez, A.M. Kim, K. H. Tower, G.B. 2001. Manganese superoxide dismutase signals matrix metalloproteinase expression via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent ERK1/2 activation. *Journal of Biological Chemistry*. 276(17) pp 14264-70.
- Ragland, B.D. Ashley, L.S. Vaux, D.L. Petri, W.A. 1994. *Entamoeba histolytica*: target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2. *Experimental Parasitology*. 9(3) pp 460-7.
- Ravdin, J.I. Moreau, F. Sullivan, J.A. Petri, W.A. Mandell, G.L. 1988. Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*. 56(6) pp 1505-12.
- Rawal, S. Majumdar, S. Dhawan, V. Vohra, H. 2004. *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin depletes antioxidant defences of target epithelial cells. *Parasitology*. 128(Pt 6) pp 617-24.
- Reed, S.L. Ember, J.A. Herdman, D.S. DiScipio, R.G. Hugli, T.E. Gigli, I. 1995. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *Journal of Immunology*. 155(1) pp 266-74.

- Reuther-Madrid, J.Y. Kashatus, D. Chen, S. 2002. The p65/RelA subunit of NF-kappaB suppresses the sustained, antiapoptotic activity of Jun kinase induced by tumor necrosis factor. *Molecular and Cellular Biology*. 22(23) pp 8175-83.
- Regueiro, J. Lopez, C. González, S. Martínez, E. 2002. Técnicas empleadas en la inmunología. En: *Inmunología, Biología y patología del sistema inmune*. 3ª. Editorial Panamericana. España. 218 p.
- Rojo, A.I. Salinas, M. Martín, D. Perona, R. Cuadrado A. 2004. Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB. *Journal of Neurosciencie*. 24(33) pp 7324-34.
- Salata, R. Ravdin, J.1985. Review of the human immune mechanisms directed against *Entamoeba histolytica*. *Review Infected Disease*. 8(2) pp 261-72.
- Sakahira, H. Enari, M. Nagata, S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 391(6662) pp 96-9.
- Saitoh, M. Nishitoh, H. Fujii, M.1998. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signalregulating kinase (ASK) 1. *EMBO Journal*. 17(9) pp 2596-606.
- Seydel, K.B. Li, E. Swanson, P.E. Stanley, S.L. 1997. Human Intestinal Epithelial Cells Produce Proinflammatory Cytokines in Response to Infection in a SCID Mouse-Human Intestinal Xenograft Model of Amebiasis. *Infection and Immunity*. 65(5) pp 1631-9.
- Seydel, K. Stanley, S. 1998. *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amoebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor -dependent pathway of apoptosis. *Infection and Immunity*. 66 pp 2980
- Seydel, K. B. Li, E. Zhang, Z. Stanley, S. L. 1998. Epithelial cell-initiated inflammation plays a crucial role in early tissue damage in amebic infection of human intestine. *Gastroenterology*. 115(6) pp 1446-53.

- Shibayama, M. Rivera, V. Barbosa, E. Rojas, S. Jarillo, A. Tsutsumi, V. Pacheco, J. Campos, R. 2008. Innate immunity prevents tissue invasión by *Entamoeba histolytica*. Canadian Journal of Microbiology. 54(12) pp 1032-42.
- Shacter, E. Williams, J.A. Hinson, R.M. Senturker, S. Lee, Y.J. 2000. Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: Inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. Blood. 96(1) pp 307-13.
- Sierra-Puente, R. Campos-Rodríguez, R. Jarillo-Luna, R. Muñoz-Fernández, L. Rodríguez, M. Muñoz-Ortega, M. Ventura-Juárez, J. 2009. Expression of immune modulator cytokines in human fulminant amoebic colitis. Parasite Immunology. 31(7) pp 384-91.
- Singh, S. Upadhyay, A. Ajay, A. Bhat, M. 2007. p53 regulates ERK activation in carboplatin induced apoptosis in cervical carcinoma: a novel target of p53 in apoptosis. FEBS Lett. Journal of Biological Chemistry. 581 (2) pp 289-295.
- Sim, S. Yong, T.S. Park, S.J. Im, K.I. Kong, Y. Ryu, J.S. Min, D.Y. Shin, M.H. 2005. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of ERK1/2 is required for apoptosis of human neutrophils induced by *Entamoeba histolytica*. Journal of Immunology. 174(7) pp 4279-88.
- Sim, S. S. J. Park, T. S. Yong, K. I. Im, and M. H. Shin. 2007. Involvement of beta2-integrin in ROS mediated neutrophil apoptosis induced by *Entamoeba histolytica*. Microbes Infection. 9(11) pp 1368-75.
- Stanciu, M. Wang, Y. Kentor, R. Burke, N. Watkins, S. Kress, G. Reynolds, I. Klann, E. Angiolieri, M. Johnson, J. DeFranco, D. 2000. Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. Journal of Biological Chemistry . 275 (16), pp 12200–12206.
- Stennicke, H.R. Deveraux, Q.L. Humke, E.W. Reed, J.C. Dixit, V.M. Salvesen, G.S.1999. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. Journal Biological Chemistry. 274(13) pp 8359-62.

- Spooner, R. Yilmaz, O. 2011. The role of reactive-oxygen-species in microbial persistence and inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(1) pp 334-52.
- Takeuchi, O. Akira, S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 40(6) pp 805-20.
- Teramoto, S. Tomita, T. Matsui, H. 1999. Hydrogen peroxide induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts: protective roles of glutathione. *Japanese Journal of Pharmacology*. 79(1) pp 33-40.
- Tsutsumi, V. Mena, R. Anaya, F. Martínez, A. 1984. Cellular basis of experimental amebic liver abscess formation. *American Journal of Pathology*. 117(1) pp 81-91.
- Teixeira, J.E. Mann, B.J. 2002. *Entamoeba histolytica*-induced dephosphorylation in host cells. *Infection and Immunity*. 70(4) pp 1816-23.
- Thannickal, V.J. Fanburg, B.L. 1998. Activation of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *Journal of Biological Chemistry*. 273(36) pp 23611-5.
- Ushio-Fukai, M. 2009. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxidants Redox Signaling*. 11(6) pp 1289-99.
- Vallabhapurapu, S. Karin, M. 2009. Regulation and function of NF-kappa B transcription factors in the immune system. *Annual Review Immunology*. 27 pp 693-733.
- Vargas, F. Rivas, C. Nursama, A. Zoltan, T. 2007. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Química*. 2(002) pp 3-15.
- Ventura-Juárez, J. Campos-Rodríguez, R. & Tsutsumi, V. 2002. Early interactions of *Entamoeba histolytica* trophozoites with parenchymal and inflammatory cells in the hamster liver: an immunocytochemical study. *Canadian Journal Microbiology*. 48 (2) pp 123–131.
- Ventura-Juárez, J. Barba-Gallardo, L.F. Muñoz-Fernández, L. Martínez-Medina, L. Márquez-Díaz, F. Sosa-Díaz, S.J. Gerardo-Rodríguez, M. González-Romo, R. Campos-Rodríguez, R. 2007.

Immunohistochemical characterization of human fulminant amoebic colitis. *Parasite Immunology*. 29(4) pp 201-9.

Ventura-Juárez, J. Campos-Rodríguez, R. Jarillo-Luna, R.A. Muñoz-Fernández, L. Escario-G-Trevijano, J.A. Pérez-Serrano, J. Quintanar, J.L. Salinas, E. Villalobos-Gómez, F.R. 2009. Trophozoites of *Entamoeba histolytica* express a CD59-like molecule in human colon. *Parasitology Research*. 104(4) pp 821-6.

Vivanco-Cid, H. Alpuche, C. Wong, I. Rocha, L. Rios, N, Estrada, I, Villasis, M. Lopez, C. Isibasi A. 2007. Lipopeptidephosphoglycan from *Entamoeba histolytica* activates human macrophages and dendritic cells and reaches their late endosomes. *Parasite Immunology*. 29(9) pp 467-74.

Yang, X. Stennicke, H.R. Wang, B. Green, D.R. Janicke, R.U. Srinivasan, A. Seth, P. Salvesen, G.S. Froelich, C.J. 1998. Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. *Journal Biological Chemistry*. 273(51) pp 34278-83.

Yu, Y. Chadee, K. 1998. Prostaglandin E2 stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. *Journal of immunology*. 161(7) pp 3746-52.

Zhang, X. P. Shan, M. Sasidhar, G. L. Chupp, R. A. Flavell, A. M. Choi, and P. J. Lee. 2003. Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinases 1/2 mitogen-activated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium. *American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology*. 28(3) pp 305-15.

Zhou, R. Yazdi, A.S. Menu, P. Tschopp, J. 2011. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 469(7329) pp 221-5.

**APENDICE A**

**TECNICA DE CULTIVO ÁXENICO DE TROFOZOÍTOS DE *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*.  
(DIAMOND Y COLS., 1978).**

| <b>Medio de cultivo para amibas</b> |          |
|-------------------------------------|----------|
| Biosate                             | 30 gr    |
| Dextrosa                            | 10 gr    |
| Cloruro de sodio                    | 2 gr     |
| Fosfato de potasio monobásico       | 0.6 gr   |
| Fosfato de potasio dibásico         | 1 gr     |
| L Cisteina monohidroclorada         | 1 gr     |
| Acido ascórbico                     | 0.2 gr   |
| Citrato férrico de amonio           | 0.0236gr |
| Agua bidestilada                    | 1L       |
| pH                                  | 6.8      |

- a) El medio de cultivo una vez ya obtenido se envasa en tubos limpios de 10 ml, con un volumen de 7 ml aproximadamente.
- b) Esterilizar los tubos durante 15 min a 15 lb.

**RESIEMBRA (STOCK TUBOS)**

|  |        |
|--|--------|
| Suero bovino adulto (descomplementado) | 1 ml   |
| Vitaminas                              | 200 ul |
| Antibac                                | 70 ul  |

Este proceso se deberá de realizar cada 3 días

**PREPARACION DE AMIBAS PARA INOCULACION EN HAMSTERES (ABSCESO HEPATICO 1 ó 6/ ml)**

**Obtención de pastilla (amibas)**

- a) Los tubos de medio con amibas se lavan con medio de cultivo sin nutrir.
- b) Se colocan en frio a 4°C durante 20 min.
- c) Posteriormente se centrifugan a 2,500-3,000 rpm durante 20 min (4°C).

- d) Una vez centrifugados se decanta el sobrenadante observando en el fondo la pastilla de amibas, las cuales será resuspendidas en un volumen de 1ml de medio de cultivo.

**Conteo de amibas (Tinción vital con Azul Tripan)**

- e) Para este conteo se necesitan 20 ul de azul tripan mas 5 ul de amibas resuspendidas, posteriormente se toman de esta mezcla 10 ul de la solución (amibas mas colorante) se colocan en una cámara neubauer y se contabilizan las células que no estén teñidas de azul (se contabilizan los cuatro cuadrantes).

- f) Realizar el siguiente cálculo Ejemplo.

$((119)(4) \times 10^{-5})$ , finalmente por el volumen del resuspendido.

Se deberán tener 300,000 trofozoítos por cada 100 ul.

**Virulencia de Trofozitos de *E. histolytica***

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

## APENDICE B

### INMUNOHISTOQUIMICA

#### 1. Desparafinizar

Xileno (2 veces/7 min.)

Etanol 100% (2 veces /7 min.)

Etanol 96% (1 vez /15 min.)

Etanol 70% (1 vez /5 min.)

Enjuagar con agua corriente durante 5 min

#### 2. Desenmascaramiento de epítomos

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

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

#### 4. Inactivación de las peroxidasas endógenas

Las laminillas se colocan en una solución de metanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente

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

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

#### 7. Permeabilización de la membrana

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

**8. Bloqueo de uniones inespecíficas**

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

**9. Primer anticuerpo**

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

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

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

**11. Segundo anticuerpo**

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

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

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

Los restos de DAB inactivarlos en una solución clorada

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

15. Contrastar con hematoxilina durante 1 minuto

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

**17. Deshidratación del tejido**

Etanol 100% (1 vez/10 minutos)

Xileno (2 veces/15 minutos)

18. **Cubrir el tejido** con entellan

## INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA

### 1. Desparafinizar

Xileno (2 veces/7 min.)

Etanol 100% (2 veces /7 min.)

Etanol 96% (1 vez /15 min.)

Etanol 70% (1 vez /5 min.)

Enjuagar con agua corriente durante 5 min

### 2. Desenmascaramiento de epítomos

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

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

### 4. Inactivación de las peroxidasas endógenas

Las laminillas se colocan en una solución de metanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente

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

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

### 7. Permeabilización de la membrana

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

### 8. Bloqueo de uniones inespecíficas

---

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

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

**9. Primer anticuerpo**

Incubar el primer anticuerpo durante toda la noche en cámara húmeda 4 °C  
El anticuerpo se diluye en PBS–Tritón X-100 0.2%-BSA 3%

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

**11. Segundo anticuerpo**

El anticuerpo se diluye 1:1000 en Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 5% en Tritón X-100 0.1% + PBS. Incubar el tejido durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Proteger de la luz.

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

13. Disminución de la auto fluorescencia.

14. Tinción de núcleos. Preparar 500 µl de Hoechst 1X en PBS.

15. Incubar las células con 50 µl Hoechst 1X durante 10 minutos a temperatura ambiente. Proteger de la luz.

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

17. 10. Sobre un portaobjetos montar con Glicergel los cubres con las células marcadas, procurando no dejar burbujas.

18. Análisis de imagen

19. Las células se observan en un microscopio Axio Visión Release 4.6.3 SP1 usando los filtros rojo (575 – 640 nm) y azul (343 nm) específicos para la absorción de luz UV. Las imágenes se capturan con el programa Image – Pro Plus procurando no saturar de luz las imágenes y se editan con Adobe Photoshop CS2.