



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

**"AMIBIASIS INTESTINAL:
RESPUESTA INMUNE INNATA"**

ROSA ERÉNDIRA SIERRA PUENTE

**Tesis para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas**

Tutor:

Dr. en C. Javier Ventura Juárez

Cotutor:

Dr. en C. Rafael Campos Rodríguez

Comité Tutorial:

Dra. en C. Rosa Adriana Jarillo Luna

Aguascalientes, Ags., México, Junio del 2009

Agradecimientos

Al **Dr. Javier Ventura Juárez** por permitirme formar parte de su equipo, por su amistad y por su invaluable guía y apoyo durante el desarrollo de este proyecto y de la tesis.

Al **Dr. Rafael Campos Rodríguez** por su valiosa contribución durante el desarrollo del proyecto.

A la **Dra. Rosa Adriana Jarillo Luna** por su valioso asesoramiento durante el desarrollo del proyecto.

A la **Dra. Eva Salinas Miralles** por sus valiosas observaciones y crítica constructiva que permitieron mejorar la tesis.

A la **Dra. María Consolación Martínez Saldaña** por la revisión y sugerencias para mejorar la tesis.

A la **Dra. Manuela de la Asunción Carrera Gracia** por la revisión a la tesis.

AL **personal del Departamento de Morfología del Centro de Ciencias Básicas de la UAA** por la asistencia técnica y compañerismo en especial a TLQ Rosa Isela Sandoval Lozano y Biol. Fabiola del Rocío Villalobos Gómez.

A la **Facultad de Medicina de la UJED, muy en especial al Dpto. de Histopatología** por las facilidades otorgadas durante mi formación académica.

A **José Ignacio** Por su comprensión y por estar a mi lado en el trayecto.

A **mi Familia** por sus innumerables muestras de solidaridad durante todos estos años, sobre todo en los momentos adversos.

A **Dios** por permitir que las cosas sucedan....

Dedicatoria

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



A mis hijas

Julia Bárbara

y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Alix Estefanía



Aguascalientes, Ags. A 29 de Mayo de 2008.

Dr en C. Francisco Javier Álvarez Rodríguez,
Decano del Centro de Ciencias Básicas y presidente del
CONSEJO ACADÉMICO DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS,
Centro de Ciencias Básicas,
Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Presente:

Por este conducto, hacemos de su conocimiento que la aspirante a Doctora en Ciencias estudiante del doctorado en Ciencias Biológicas M. en C. Rosa Eréndira Sierra Puente, ha cumplido con los objetivos y metas del proyecto doctoral titulado: **"AMIBIASIS INTESTINAL. RESPUESTA INMUNE INNATA"**, adicionalmente, los resultados de este proyecto fueron aceptados para ser publicados en la revista Parasite Immunology, en Inglaterra con el artículo: Expression of immune modulator cytokines in human Fulminant Amebic Colitis (PIM 1118-2009); con lo que cumple con los requisitos para obtener el grado de Doctora 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,


Dr Javier Ventura Juárez
Director de tesis

Vo Bo


Dr en C. Rafael Campos Rodríguez
Escuela Superior de Medicina, IPN
Departamento de Bioquímica.
Co-director de tesis


Dra. En C. Rosa Mariana Jurillo Luna
Escuela Superior de Medicina, IPN
Depto. De Morfología
Miembro del comité tutorial

Resumen

La amibiasis intestinal es una enfermedad causada por el parásito *E. histolytica* que invade principalmente al colon y a otros órganos como el hígado, piel, cerebro, con o sin manifestaciones clínicas. La enfermedad afecta a la población de países en desarrollo como México, países sudamericanos, India, Bangladesh, etc. La histopatología así como el comportamiento del sistema inmune ante la invasión por *E. histolytica* se ha estudiado en animales de experimentación como el hámster, gerbo, conejo, cobayo, rata y ratón. Pero estudios en humanos, que son huéspedes naturales del parásito aún no aportan datos concluyentes, por lo que este trabajo se realizó en humanos y se estudió la respuesta inmunitaria inespecífica local durante la amibiasis intestinal. En las lesiones intestinales se analizó la interacción de las amibas con el epitelio; se identificaron los tipos de células inmunitarias presentes, así como la respuesta de las células del huésped al interactuar con los parásitos, expresada en la síntesis y secreción de moléculas proinflamatorias como componentes del complemento, citocinas, óxido nítrico (NO), etc.

Contenido

I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
II.1 Epidemiología de la amibiasis.....	2
II. 2 Aspectos morfológicos de <i>E. histolytica</i>.....	3
II.3 Patogenia	5
II.4 La histología del colon	6
II.5 Patología.	8
II.6 Interacción de <i>E. histolytica</i> con mecanismos humorales y celulares de la inmunidad innata en la lámina propia.	10
III. Objetivos.....	20
III.1 Objetivo General	20
III.2 Objetivos Particulares.....	20
IV. Resultados.....	30
V. Discusión.	48
VI. Conclusiones.....	56

VII. Anexos.....	57
VIII.1 Personal Participante:.....	57
VIII.2 Consentimiento informado para participar en un Proyecto de Investigación.	58
VIII.3 Diagnóstico quirúrgico de los pacientes.....	61
VIII.4 Productos del Proyecto.	62
VIII. Glosario	73
IX. Bibliografía	82

I. Introducción

La amibiasis intestinal es una enfermedad causada por el parásito *E. histolytica* que invade principalmente al colon y puede extenderse a otros órganos por vía hematológica, tales como hígado, piel, cerebro, con o sin manifestaciones clínicas¹.

Este protozoo infecta aproximadamente a 50,000,000 de personas en el mundo y es responsable de la muerte de más de 110,000 personas por año². En áreas endémicas, la pobreza, ignorancia, abastecimientos de agua contaminados y pobre saneamiento favorecen la transmisión fecal-oral de las amibas de una persona a otra³.

La histopatología así como el comportamiento del sistema inmune ante esta enfermedad se ha estudiado en animales de experimentación como el hámster, gerbo, conejo, cobayo, rata y ratón^{4,5}. Pero estudios en humanos, que son huéspedes naturales del parásito aún no aportan datos concluyentes, por lo que este trabajo se realizó en humanos y se estudió la respuesta inmunitaria inespecífica local durante la amibiasis intestinal. En las lesiones intestinales se analizó la respuesta de las células del huésped al interactuar con los parásitos, expresada en la síntesis y secreción de moléculas proinflamatorias como componentes del complemento, citocinas, óxido nítrico (NO), etc.

II. Antecedentes

De las nueve especies de amibas intestinales que albergan los humanos solo *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) es patógena, pues es la causante de colitis y de absceso hepático amibianos¹; es uno de los eucariontes más primitivos de cuya existencia hay registros desde 1000 años AC.

E. histolytica fue descubierta por Lösch (1875) en las heces de un enfermo con disentería en San Petersburgo (hoy Leningrado) Rusia, y se ha encontrado en todas las poblaciones del mundo en las que ha sido buscada⁶.

II.1 Epidemiología de la amibiasis.

Es más frecuente en los trópicos y zonas subtropicales que en los climas fríos, pero en las poblaciones carentes de higiene de zonas templadas y subárticas la frecuencia de esta parasitosis es tan elevada como en los trópicos. En el hemisferio occidental, la *E. histolytica* ha sido encontrada desde Anchorage, Alaska (61° de latitud norte), hasta el estrecho de Magallanes (52° de latitud sur) y en el hemisferio oriental, desde Finlandia (60° de latitud norte) hasta Australia y África del Sur (30° de latitud sur)⁷.

En México, la población portadora de este parásito es variable, desde un 2.4% en Ometepe Guerrero hasta un 55 % en Mixquic D.F.⁸; Escandón *et al.*,(1996)⁹ estimaron una cifra de medio millón de enfermos de amibiasis cada

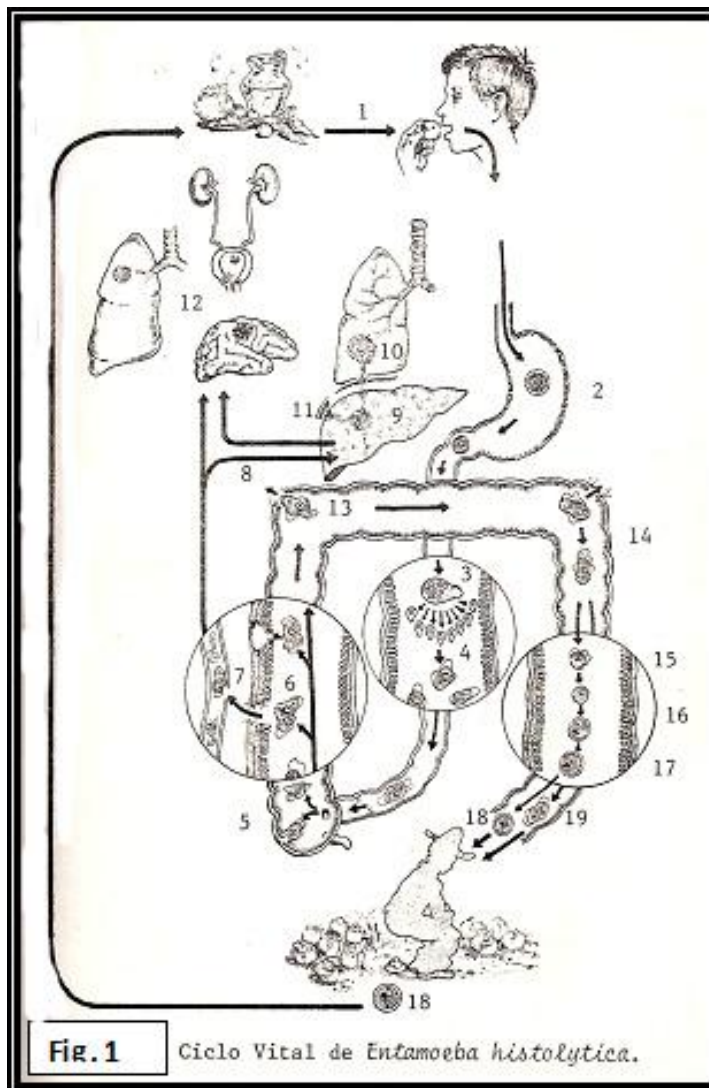
año, sólo en la población cubierta por el IMSS; recientemente, Ramos *et al.*, (2005)¹⁰, mediante PCR encontraron que hasta el 43% de la población del Estado de Morelos, México, presentó positividad a *E. histolytica*¹⁰; y en Aguascalientes, con una población de 1,065,416 habitantes, el Instituto de Salud del Estado de Aguascalientes (ISEA)¹¹ reportó un acumulado de 4278 enfermos de amibiasis, lo que corresponde al 0.4% de la población. Como se aprecia con los datos anteriores, esta parasitosis sigue siendo un problema de salud pública en México y en algunas partes del mundo.

II. 2 Aspectos morfológicos de *E. histolytica*.

E. histolytica tiene dos fases de desarrollo: el **trofozoíto** (20 a 60 micrómetros), que es irregular, presenta plasmalema de 10 nm de espesor con una cubierta externa o glicocáliz rica en carbohidratos y citoplasma dividido en ectoplasma y endoplasma. El núcleo es esférico con cromatina puntiforme o centrosoma. Presenta cromatina adherida al nucleolema. El **quiste** maduro, de 10 a 12 micrómetros, tiene cuatro núcleos¹².

Ciclo vital de *E. histolytica* (fig 1).

La principal fuente de infección es el ser humano, como enfermo crónico o como portador asintomático, expulsan quistes maduros, que son las formas infectantes o de transmisión. **(1)** Los alimentos y bebidas pueden contaminarse con quistes de *E. histolytica* por: a) contaminación del abastecimiento de agua; b)



manipulación por individuos infectados, c) deyecciones de moscas y otros insectos; d) empleo de excrementos humanos como abono de huertas, y e) el descuido extremo en la higiene, personal en hospicios, hospitales psiquiátricos, prisiones y población general⁷. El quiste maduro que llega a la boca y es deglutido pasa al estómago **(2)** y penetra en el intestino delgado, en el medio alcalino se transforma en metaquiste

(3). La pared del metaquiste, debilitada por los jugos digestivos permite que la amiba multinucleada salga. El citoplasma se divide en tantas partes como núcleos tiene, de tal manera que cada núcleo pasa a ser el centro de un pequeño trofozoíto llamado metaquístico **(4)**. En condiciones desfavorables para el desenquistamiento, en el intestino grueso **(18)**, los quistes son arrastrados por la materia fecal y eliminados con las heces.

COLONIZACIÓN (fig 1). Los trofozoítos metaquísticos llegan hasta el colon **(5)** donde pueden establecerse poniéndose en contacto con la mucosa. Por diversos mecanismos que mencionaremos más adelante la amiba puede invadir los tejidos **(6)** y pasar a la circulación, donde por vía portal **(7)** llega al hígado **(8)**, por contigüidad afectar el diafragma **(9)** y el pulmón **(10)** o incluso la piel **(11)**, o más raramente puede llegar al cerebro, el pulmón o el aparato urinario **(12)**.

ENQUISTAMIENTO (fig 1). Normalmente no se produce el enquistamiento en los tejidos, sino que conforme avanza la materia fecal empieza a deshidratarse. En la luz del colon los trofozoítos se desprenden de los alimentos no digeridos **(13)(14)** y se condensan en una masa esférica, el prequiste **(15)**. Posteriormente secreta una cubierta resistente delgada con un solo núcleo, recibiendo el nombre de quiste inmaduro **(16)**. Sufre dos mitosis consecutivas el núcleo, produciendo 4 núcleos y dos tipos de inclusiones alimenticias, las barras cromatoidales y la masa de glucógeno **(17)**. Estas formas salen al exterior **(18)** con las heces, y por condiciones higiénicas deficientes (falta de drenaje) pueden contaminar el agua, alimentos o manos, iniciándose un nuevo ciclo **(1)**^{12,13}.

II.3 Patogenia

El mecanismo agresivo de los trofozoítos de *E. histolytica* es un fenómeno complejo multifactorial que incluye: a) daño a la membrana

plasmática de las células efectoras por contacto y deslizamiento (*hit and run*); b) fagocitosis de células epiteliales lisadas o aparentemente intactas pero desprendidas, y c) degradación intracelular de las células fagocitadas. La adhesión de las amibas a la capa de moco intestinal y a componentes de la matriz extracelular es mediada por glicoproteínas de superficie tipo lectinas inhibibles por galactosa¹⁴⁻¹⁶. La adhesión también se debe a que otra lectina con PM de 140 KDa permite el reconocimiento a la fibronectina de la matriz extracelular¹⁷, o la presencia de antígenos de superficie vinculados a su alta patogenicidad como la proteína 30,000-Mr¹⁸ y la de 29 kDa¹⁹. Un vez adherido el parásito a las células blanco, produce y secreta al medio cistein proteinasas²⁰, lipopeptidofosfogluanos²¹ ó amebaporos²². Adicionalmente, Talamás *et al.*, (1995)²³ mostraron que un componente de *E. histolytica* tipo lectina con PM de 220 kDa participa en el proceso de adhesión y es muy inmunógeno, por lo que induce la producción de interleucinas.

Como consecuencia de la unión de amibas y células epiteliales, estas pueden activarse y producir defensinas con probable capacidad de destruir a los trofozoítos. Es posible que sinteticen citocinas pro-inflamatorias, como sucede en modelos animales²⁴, NO y prostaglandinas por activación de sintasa del óxido nítrico (NOS) y ciclo-oxigenasa (COX)²⁴⁻²⁶.

II.4 La histología del colon

La pared del colon está compuesta por cuatro capas que de la luz hacia fuera son la mucosa, submucosa, muscular y serosa. La mucosa tiene una superficie relativamente lisa y a través de todo su espesor hasta la muscular de la

mucosa se extienden abundantes glándulas tubulares simples (criptas de Lieberkühn). Las glándulas así como la superficie están revestidas por un epitelio cilíndrico simple que contiene células caliciformes, células absortivas y células enteroendócrinas, las células madre están restringidas al fondo de las criptas y normalmente no poseen células de Paneth²⁷. En las criptas las células caliciformes son abundantes; en cambio en el epitelio superficial son mucho menos frecuentes. Las células absortivas poseen microvellosidades muy largas y tienen muchas mitocondrias. Su función principal es la resorción de agua. En las criptas las células epiteliales absortivas poseen en su región apical gránulos de secreción pequeños, hay granulocitos epiteliales²⁸ localizados en las criptas de Lieberkühn en procesos patológicos del colon y expresan los precursores de Defensina Humana-5²⁹. La lámina propia contiene muchos macrófagos, plasmocitos, eosinófilos, linfocitos y mastocitos.

En la submucosa se encuentran con regularidad adipocitos. La muscular externa tienen una gruesa capa cerrada de músculo circular mientras que el músculo longitudinal, en cambio, forma tres haces acintados (**tenias**). Entre las tenias el músculo longitudinal es muy delgado o falta.

Las estructuras características del colon son los pliegues de orientación transversal (**pliegues semilunares**), con capacidad de extensión que sobresalen con su forma semicircular en la luz intestinal y en cuya formación participa la muscular externa. Las dilataciones entre estos pliegues reciben el nombre de **haustros**. En la serosa puede haber una gran cantidad de adipocitos, los cuales forman salientes circulares (apéndices epiploícos).

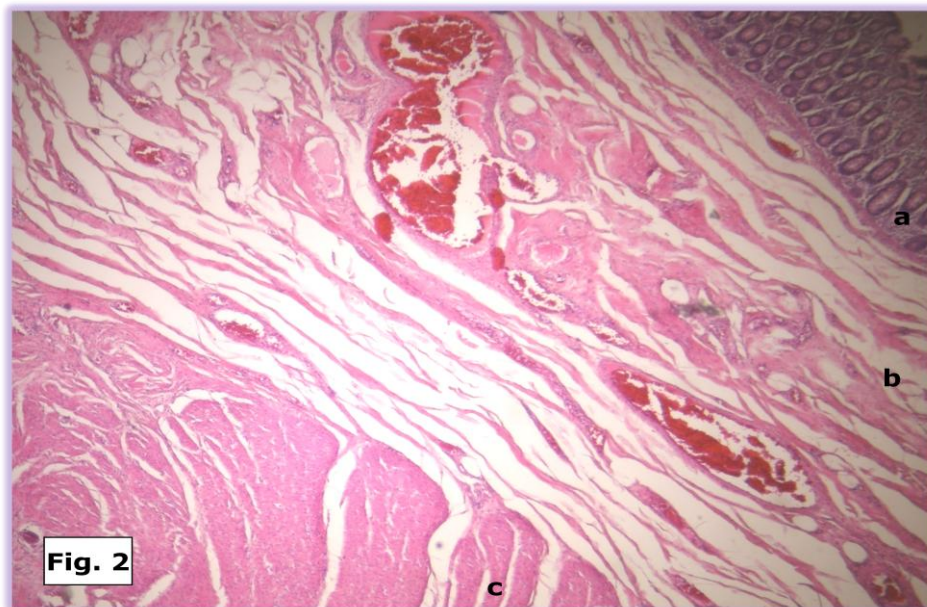


Fig 2.- Histología de Intestino grueso sano. Hematoxilina/Eosina (40X): donde se aprecian su capa mucosa (a), submucosa (b) y la muscular longitudinal interna (c).

II.5 Patología.

Se describen cuatro formas clínicas de amibiasis intestinal invasora: a) disentería o diarrea con sangre, b) colitis fulminante, c) apendicitis amibiana y d) ameboma del colon³⁰. Prathap y Gilman (1970)³¹ describieron con detalle los cambios microscópicos característicos de la colitis ulcerativa amibiana. Los diferentes tipos de lesiones pueden o no ser secuenciales y consisten en inflamación difusa, lesión focalizada o microulceración, lesión invasora y lesión invasora tardía que es la típica lesión que se extiende desde la mucosa a la submucosa por la muscular de la mucosa (Fig. 3 A y B)³²⁻³⁴.

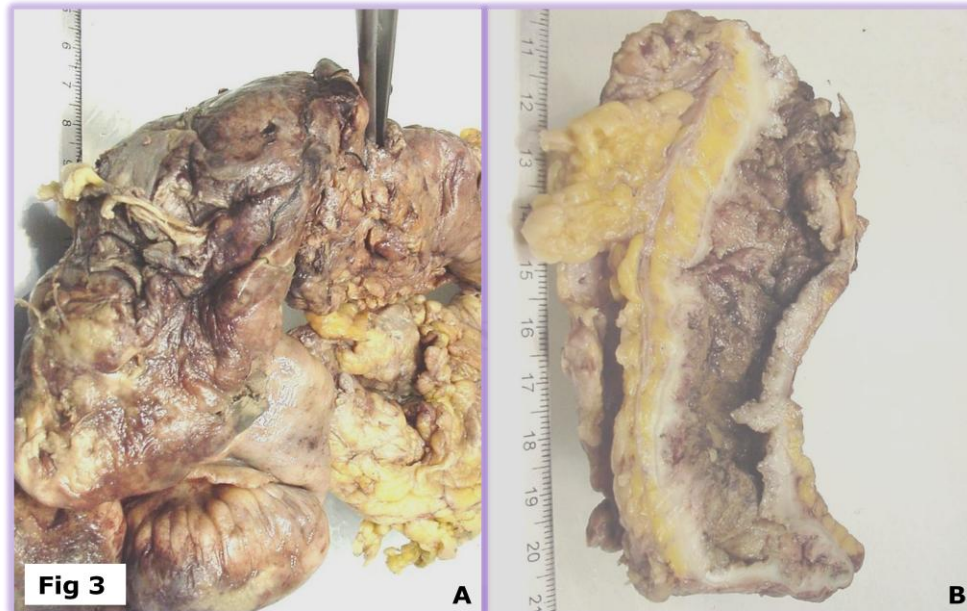


Fig. 3.- Aspecto macroscópico de intestino grueso de pacientes con colitis amibiana fulminante, (A) cara externa y (B) cara interna.

Ensayos de colitis amibiana en ratones mostraron una fuerte participación de mastocitos e infiltrado inflamatorio semejante al de humanos³⁴.

Mientras que en el modelo de hámster para el absceso hepático se ha descrito en etapas tempranas la presencia de moderado infiltrado de neutrófilos alrededor de los capilares y dentro del epitelio, posterior al infiltrado de neutrófilos se agregan linfocitos y macrófagos³⁵. Se considera que los neutrófilos pueden participar tanto al provocar daño tisular como en controlar la infección amibiana³⁶.

No obstante estas descripciones anatomopatológicas detalladas y los diversos estudios realizados en animales, poco se ha indagado acerca de la

participación de las células epiteliales intestinales (producción de defensinas, activación de enzimas como NOS y COX-2) para evitar la invasión o promover el infiltrado inflamatorio. El poco conocimiento que de esto se tiene, es que los productos amibianos estimulan a las células epiteliales humanas en un modelo de ratón (SCID-HU-INT) para demostrar que producen citocinas proinflamatorias (IL-1 β e IL-8) y contribuir de esta manera al establecimiento del infiltrado²⁴; también se ha demostrado *in vitro* que modifican las uniones intercelulares epiteliales³⁷ lo que pudiera provocar inestabilidad del epitelio y a partir de ello facilitar la invasión.

II.6 Interacción de *E. histolytica* con mecanismos humorales y celulares de la inmunidad innata en la lámina propia.

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa frente a las infecciones. Un mecanismo importante de la inmunidad innata es la secreción de moco por las células epiteliales intestinales, que protege la mucosa de agentes dañinos y permite el crecimiento de la flora bacteriana normal. Esta capa de moco está compuesta por mucina, glucoproteínas y glucolípidos. Chadee y Petri (1987)³⁸ demostraron que la mucina purificada de ratas y humanos se une a la lectina de adherencia de *E. histolytica* y de esta manera previene su unión a las células epiteliales y la consecuente citólisis, pero por otra parte, esta unión puede contribuir a la resistencia de *E. histolytica* al complemento. En la amibiasis intestinal humana y en la colitis aguda se ha

visto depleción de la capa de moco que recubre las células epiteliales intestinales³¹.

En lámina propia hay diversas poblaciones celulares de la respuesta inmune innata entre las cuales se incluyen macrófagos, neutrófilos y células NK³⁹. Por lo tanto, los trofozoítos de *E. histolytica* al sobrepasar la barrera de células epiteliales y localizarse en la lámina propia de la mucosa se encontrarán con mecanismos de defensa adicionales como el complemento y células de la inmunidad innata. En este encuentro es probable que se establezcan interacciones físicas entre las amibas y células inflamatorias y sus productos (enzimas lisosomales y metabolitos dependientes del oxígeno), así como con componentes de la vía alterna del complemento y la vía de la lectina que se une a manosa.

E. histolytica puede destruir a las células con las cuales establece contacto a través de apoptosis⁴⁰ o por el contrario, las células o moléculas del hospedero pueden eliminarla^{41,42}.

Las moléculas que pueden reconocer y eliminar a *E. histolytica* son el complemento activado por la vía alternativa o por la vía de la lectina que se une a manosa (MBL) *in vitro*^{43,44}; pero estudios *in vivo* en hámster muestran que el complemento no tiene efecto sobre las amibas⁴⁵, lo que introduce un campo de incertidumbre al respecto.

Las células que pueden destruir a las amibas son NK y macrófagos. Las células NK estimuladas por citocinas como IL-12 e IL-18 producen IFN- γ el cual a su

vez estimula la producción de NO por parte de macrófagos⁴⁶. Por otro lado las células NK pueden ser capaces de destruir a las amibas directamente o a través de la producción de perforina, Granzima y NO^{47,48}; sin embargo, no existe ninguna evidencia hasta el momento sobre el resultado de interacciones *in vivo* e *in vitro* entre trofozoítos de *E. histolytica* y células NK.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Durante las infecciones por amibas los neutrófilos son reclutados al sitio de la invasión para destruirlas, aunque se ha visto que las amibas de cepas más patógenas fagocitan polimorfonucleares neutrófilos completos y otras células. Sin embargo en los tejidos donde están las amibas el daño a los mismos es ocasionado por la liberación del contenido de los gránulos de los fagocitos como neutrófilos, más que por el contacto de las amibas con las células del huésped. Esto se ha observado en las lesiones hepáticas por amibas en animales de experimentación como el hámster⁴⁹.

Los macrófagos pueden responder a los microorganismos casi tan rápido como los neutrófilos, pero persisten más tiempo en los lugares de la inflamación. Por lo tanto los macrófagos son las células efectoras que predominan en las fases avanzadas de la respuesta inmune innata, 1 o 2 días después de la infección. Los macrófagos viven más tiempo que los neutrófilos y no se encuentran en diferenciación terminal por lo que se pueden dividir en el lugar de la infección. El mecanismo efector de los macrófagos involucra la secreción de enzimas hidrolíticas, liberación de productos que activan el complemento y otras sustancias que actúan en las células blanco por ejemplo bacterias, protozoos células neoplásicas⁵⁰. Ghadirian y Meeroovitch (1982)⁵¹ estudiaron la respuesta

de los macrófagos en absceso hepático en hámster y sus resultados sugieren que los macrófagos están involucrados en la defensa del huésped contra el establecimiento de absceso hepático y diseminación de las amibas. En estudios *in vitro* se ha visto que de todas las células de defensa del huésped, solo los macrófagos activados son capaces de destruir a las cepas de amibas virulentas⁵². TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Por otro lado, aun cuando el macrófago participa en la destrucción *in vitro* de amibas^{42,53,54} su papel en la amibiasis intestinal en humanos es incierto.

CD59 también conocido como inhibidor de membrana de lisis reactiva (MIRL), es un factor que impide la polimerización de la proteína C9 durante la fase final de la formación del complejo de ataque a la membrana, (es un complejo molecular de fracciones del complemento que incluye C5b,C6,C7,C8,C9n, el cual rompe la bicapa lipídica de la membrana de las células blanco llevándolas a la lisis y muerte). Por lo tanto una de las funciones de esta proteína reguladora del complemento es la de inhibir la inserción de la primera unión C5B-9 e impedir la polimerización posterior de C9n en la membrana de la célula blanco^{55,56}

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Citocinas y mediadores de la inflamación

La respuesta del huésped en esta interacción huésped-parásito a nivel de la mucosa intestinal puede ser que este mediada inicialmente por citocinas para establecer una respuesta inmune inmediata a la presencia de *E. histolytica*, como observa Jung et al.,⁵⁷

INTERLEUCINA 4 (IL-4).- Citocina secretada por las células Th2 activadas y por los mastocitos, eosinófilos y basófilos; es una glicoproteína de aproximadamente 15 kDa de PM. Promueve la diferenciación de Th2, que actúan en el control de la respuesta inmune humoral, principalmente de la IgE; también participa en la regulación negativa de la respuesta inmune celular junto con la IL-10 e IL-13 mediante la inhibición de la producción de citocinas (INF- γ e IL-2) por las células Th1⁶². Activa a las células B hacia la proliferación y diferenciación en células plasmáticas. De igual manera induce la hiperexpresión del Complejo Principal de Histocompatibilidad II (MHCII) en éstas células. Activa la expresión de receptores de IgE y junto con MHCII. Inducen la presentación antigénica hacia las células T. De igual manera induce a las células B a la expresión de IgM superficial, de IL-6 y TNF- α . Todos los mecanismos anteriores hacen que las células B sean activas presentadoras de antígenos a las células T. Los efectos sobre las células T son la inducción de proliferación sobre los timocitos, actúan sobre la diferenciación de las células CD8+ (Th2) y estimulan la producción de más IL-4 por éstas células.

INTERLEUCINA 8 (IL-8).- Quimiocina que participa en las reacciones inflamatorias. Se sintetiza de forma constitutiva en diferentes células en los tejidos. IL-8 atrae neutrófilos. Los neutrófilos y los macrófagos expresan receptores para IL-8 entre otras quimiocinas^{63,64}.

INTERLEUCINA 10 (IL-10).- Citocina producida por los macrófagos activados y por algunos linfocitos T cooperadores cuya función más importante

consiste en inhibir a los macrófagos activados y, por tanto, en mantener el control homeostático de las reacciones inmunitarias innatas y adquiridas. Se expresa principalmente en células del epitelio de colon de enfermos^{23,65,66}. Se sabe que hay una amplia lista de células que producen IL-10: incluye células T CD8+, microglia, monocitos CD14+ (pero no CD16+), células Th2 CD4+ (ratón), queratinocitos, célula estelar hepática, células TCD4+ Th1 y Th2 (humano), células de melanoma, macrófagos activados, células NK, células dendríticas, células B (CD5+ y CD19+) y eosinófilos⁶⁷.

FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMADOR BETA (TGF- β).- Citocina producida por los linfocitos T activados, los fagocitos mononucleares y otras células; sus acciones más importantes consisten en inhibir la proliferación y diferenciación de los linfocitos T, inhibir la activación de los macrófagos y contrarrestar los efectos de las citocinas pro-inflamatorias.

Esta citocina descubierta en 1980 y producida por células Th3. De acuerdo a las funciones descritas para TGF- β como la regulación de la apoptosis, inducción de tolerancia e inmunosupresión⁶⁸ y para las de IL-10 como inmunosupresor y regulador de la interfase de la inmunidad innata y adaptativa para limitar la magnitud de la respuesta inmune a los antígenos⁶⁹, en amibiasis el trabajo conjunto de ambas citocinas desarrollan una función importante en tratar de limitar el daño a los tejidos del huésped.

CICLOOXIGENASA-2 (COX-2).- Enzima importante en el metabolismo del ácido araquidónico para producir prostaglandina E2 entre otras⁷⁰. Se encuentra de manera constitutiva en pulmones de ratas, predominantemente en células musculares lisas de la túnica media de los vasos donde participa en la regulación del tono vascular⁷¹. Se encuentra también en el ovario y el útero e interviene en varios procesos reproductivos de la hembra⁷². COX-2 no se detecta en la mayoría de los tejidos, pero se puede inducir sus síntesis en altos niveles después de algunas horas de haber sido estimulado el tejido con sustancias proinflamatorias⁷³⁻⁷⁵. Wang y Chadee (1995)⁷⁶ describieron que los macrófagos producen PGE2 como respuesta al contacto con trofozoítos de *E. histolytica* y en consecuencia inducen un estado de inmunosupresión local por esta vía, ya que la PGE2 se asocia fuertemente a la disminución de la respuesta inmune al actuar como inmunosupresor sobre linfocitos B, Th1, Th2 y macrófagos⁶⁸.

INOS.- El Óxido Nítrico (NO) se produce a partir de L-arginina por la actividad de las sintasas del Óxido Nítrico (NOS)⁷⁷. En esta reacción la L-arginina, el O₂ y el NADPH son sustratos; y el mononucleótido de flavina y dinucleótido de flavina y adenina, hemo y tetrahidrobiopterina son cofactores y el NO y la citrulina son productos de la reacción catalizada por la NOS que es una dioxigenasa⁷⁸⁻⁸⁰.

Hasta el momento se han identificado tres isoformas de NOS: NOS I, constitutiva de tejido neuronal (nNOS); NOS II, inducible por citocinas o

endoxinas en macrófagos, hepatocitos, células mesangiales y células de músculo liso de los vasos (iNOS); y NOS III constitutiva de las células endoteliales (eNOS). La expresión de iNOS se induce con endotoxinas bacterianas y/o citocinas⁸¹⁻⁸³ iNOS es una enzima que genera radicales libres de nitrógeno (óxido nítrico) cuya función es muy importante en varios procesos celulares como la inflamación y en respuestas antiparasitarias como en *Leshmania* y *E. histolytica* se ha estudiado en modelos animales⁸⁴⁻⁸⁶.

Se han descrito numerosos factores de crecimiento y factores vasoactivos que están implicados en la regulación de su expresión. Entre estos se encuentran el factor activador de plaquetas⁸⁷ y el factor de crecimiento de fibroblastos⁸⁸. Y por otra parte entre los factores que disminuyen su expresión, se encuentran, la trombina⁸⁹ el factor de crecimiento derivado de las plaquetas⁹⁰ y el Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)⁹¹⁻⁹³

DEFENSINAS.-Péptidos ricos en cisteína que se encuentran en la piel y en los gránulos de los neutrófilos y que actúan como antibióticos de amplio espectro, eliminando una amplia variedad de bacterias y hongos. La síntesis de defensinas aumenta en respuesta a citocinas inflamatorias con IL-1 y TNF. Hay 6 tipos de defensinas dependiendo de la célula donde se encuentre^{94,95}, se sabe que las defensinas se producen normalmente en las células de Paneth del intestino delgado y esta aumentada su producción en la enfermedad inflamatoria intestinal^{96,97}, pero disminuida en la enfermedad de Crohn⁹⁸.

INTERFERON GAMA (INF- γ): Citocina producida por los linfocitos T y NK cuya función más importante es ser el principal inductor de la actividad bactericida de los macrófagos y estimula la expresión de las moléculas del MHC I y II, así como de moléculas coestimuladoras, en las células presentadoras de antígeno, como los macrófagos y las células dendríticas. Mientras que en la inmunidad innata las células NK producen el IFN- γ en respuesta al reconocimiento de ciertos componentes de microorganismos, en la adaptativa las células T producen INF- γ en respuesta al reconocimiento del antígeno⁹⁹. (IFN- γ se llama también interferón inmunitario de tipo II). El INF- γ es uno de los mediadores más importantes de la inflamación en el intestino, tanto en la patología humana como en los modelos experimentales en animales, y su expresión se ha relacionado directamente con el daño tisular en varios procesos inflamatorios del intestino como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn¹⁰⁰.

***Entamoeba histolytica* induce un estado de inmunosupresión local o sistémico.**

Algunos pacientes cursan con estado clínico grave que incluso ha llegado a la extirpación de amplias zonas de intestino grueso en el caso de colitis fulminante por amibiasis, o a realizar intervenciones quirúrgicas de laparotomía exploradora para hacer lavados de amplios abscesos hepáticos que comprometen la vida del paciente. Para tratar de explicar los extremos a los que llegan estos individuos invadidos por *E. histolytica*, se ha propuesto

que existe un estado de supresión transitoria de la inmunidad celular durante el curso de la enfermedad¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Sin embargo, se desconoce si ocurre inmunosupresión de la respuesta inmunitaria a nivel de los órganos afectados (intestino grueso e hígado).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

II. Hipótesis.

Durante la invasión de la mucosa por *E. histolytica* es probable que se active la respuesta inmunitaria innata, por lo que se podrá detectar la activación de los elementos de dicha respuesta.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

III. Objetivos.

III.1 Objetivo General

Analizar la interacción de las amibas con las células epiteliales y la participación de los componentes celulares y humorales de la respuesta inmunitaria innata en la mucosa intestinal de individuos con amibiasis invasora.

III.2 Objetivos Particulares

1. Analizar si las amibas inducen en células epiteliales la expresión y producción de moléculas con actividad pro-inflamatoria (COX-2, IL-8).
2. Detectar la posible activación de macrófagos, neutrófilos y células NK, mediante marcadores específicos como: iNOS y defensina.
- 3.- Analizar mediante técnicas de inmunohistoquímica la localización de componentes de la vía de activación (C3b) y de moléculas reguladoras del complemento (CD59) en la superficie de la amiba.
- 4.- Analizar por inmunohistoquímica la producción *in situ* de las citocinas IL-10, TGF- β , IL-4 e INF- γ .
- 5.- Realizar la detección de RNAm de IL-10 mediante Hibridación *in situ*.

IV. Materiales y Métodos

Previo consentimiento informado (Anexo VIII.2) se realizó el estudio en 10 pacientes reclutados en Hospital Hidalgo del Instituto de Salud del Estado de Aguascalientes (ISEA), Hospital General de Zona #2 del Instituto Mexicano del Seguro Social (HGZ #2 IMSS) Aguascalientes y Hospital General de Zacatecas (HGZ). En el servicio de Urgencias de los hospitales antes mencionados se detectaron aquellos pacientes con antecedentes de amibiasis y que fueron sometidos a cirugía y se les extirpó una porción de intestino grueso; de igual manera se obtuvieron porciones de intestino grueso de cinco personas que por causas ajenas a la amibiasis fueron intervenidos quirúrgicamente. (Anexo VIII.3)

REACTIVOS Y TÉCNICAS.

Los tejidos fueron fijados en formaldehído al 10% y procesados con la técnica histológica de rutina. Se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes de 6 micras de espesor de intestino grueso normal e infectado. Posterior a esto se tiñeron con Hematoxilina y Eosina. De igual manera se hicieron las Inmunotinciones Anti amibas¹⁰⁶, anticuerpos anti iNOS de humano (Chemicon PAB AB5380), anticuerpos anti COX-2 de humano (Chemicon PAB AB5118), anticuerpos de cabra anti Defensina Humana (Chemicon PAB AB2114P), anticuerpo de raton anti IL-8 humana (US biological MAB 18430-15), anticuerpo de conejo anti IL-2 humana (Chemicon AB1418), anticuerpo de

conejo anti IL-10 humana (Chemicon AB1416), Biotin-Rat anti-mouse IL-4 (US biological Reagent cat: 18426-004), Anticuerpo de ratón Anti C3b humana (Chemicon MAB), TGF- β , (Chemicon MAB 1032), INF- γ (Pierce M701), y CD 59 mouse anti-human (Chemicon MAB CBL467); Se emplearon anticuerpos secundarios IgG (1:100) marcados con peroxidasa de cabra anti conejo (Chemicon AP307P) y de cabra anti ratón (IgG (Hyclone). Se hizo Hibridación *in situ*, para IL-10. (Sigma)

TÉCNICA DE CORTE Y TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA ⁴².

OBTENCIÓN DE MUESTRA Y FIJACIÓN

- 1) Obtención de la muestra.
- 2) Traslado en solución Buffer de fosfatos.
- 3) Fijación en solución de formalina neutra al 10% durante 12-24 hrs.

DESHIDRATACIÓN, ACLARAMIENTO, INCLUSIÓN EN PARAFINA Y CORTE.

- 4) Lavado en agua corriente por 30 minutos
- 5) Deshidratación por paso en alcoholes de concentración ascendente 70%(2X), 80%, 96%(2X), 100%(2X), cada paso es de una hora aproximadamente.
- 6) ACLARAMIENTO en dos pasos de xileno, cada paso es por una hora aproximadamente.
- 7) Inclusión en Parafina en dos pasos 2 hrs cada uno.

- 8) Obtención del bloque.
- 9) Obtención de cortes de 6 micrómetros de espesor y su montaje en portaobjetos.

TINCIÓN.

- 10) Desparafinización en estufa a 56 grados C. Por dos horas aproximadamente.
- 11) Desparafinización en dos pasos de xileno 5 minutos cada uno.
- 12) Rehidratación en pasos de alcoholes de concentración descendente 100%(2X), 96%(2X), 80%, 70%, agua destilada, 5 minutos en cada paso.
- 13) Tinción con hematoxilina de Harris por 5 minutos.
- 14) Viraje en agua corriente por 3 minutos.
- 15) Tinción en eosina alcohólica por 2 minutos.
- 16) Deshidratación en pasos de alcoholes de concentración ascendente iniciando en 80%, 96%(2x), 100%(2X) 5 minutos en cada uno.
- 17) Aclaramiento en dos pasos de Xileno 5 minutos cada uno.
- 18) Montaje con resina sintética.
- 19) Observación al microscopio.

TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS^{42,43}

Para la detección trofozoítos de *E. histolytica*, de células iNOS+, COX-2+, citocinas IL 1, IL 2, IL 4, IL 8, IL 10, TGF beta, Interferon gama, defensinas, complemento (c3b), CD59.

Procedimiento:

Previamente se ha incluido el tejido en bloques de parafina para poder obtener cortes de 5 a 7 micras de espesor.

- 1- Desparafinar en 2 pasos de xilol, 10 minutos cada uno
- 2- OH 100% 1 cambio.
- 3- Metanol + Peróxido de Hidrógeno.
50 ml. Metanol + 1 ml. Peróxido de Hidrógeno 30% (Grado Reactivo) 30 minutos.
- 4- OH 100% 3 minutos
- 5- OH 96% dos pasos c/u por 3 minutos
- 6- OH 70% 3 minutos
- 7- *PBS 1x 5 minutos
- 8- Desenmascarar con Citrato de Sodio 0.01M en olla Express por un minuto (Hayat MA 2002)
- 9- Buffer de fosfato salino (PBS) 1X 5 minutos
- 10- Agregar 100 µl de suero fetal (Hyclone) al 25% en PBS 1X durante 45 minutos.
- 11- Inclinar la laminilla para quitar el líquido.
Agregar 100 µl del Anticuerpo primario anti las moléculas ó

marcadores celulares mencionados al principio de la técnica a diluciones entre 1:50 y 1:200. Incubar 1 hr. a 37 °C. Ó dejar toda la noche en refrigeración.

12- Lavar en PBS Tween por 3 veces.

Incubar con el 2^{do} Anticuerpo específico para el anticuerpo primario marcado con Peroxidasa ó fosfatasa alcalina, A la dilución de 1:100.

13- Lavar x 3 veces en PBS Tween.

14- Revelar con Diamino Benzidina si el anticuerpo está marcado con peroxidasa o con rojo rápido, si el anticuerpo está marcado con fosfatasa alcalina. Lavar en PBS 3 veces.

15- Pasar a agua destilada x 5 minutos.

16- Teñir en Hematoxilina ó con verde luz como contrastante.

17- Deshidratar y cubrir.

Nota: Duración de la técnica aproximadamente 8 horas.

TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Antes de Iniciar:

- 1.- Preparar 4 baños de TBS (vasos de Coplin)
- 2.- Precalentar la placa de calor a 90°C.
- 3.- Precalentar la cámara húmeda a 37°C.
- 4.- Preparar solución astringente y precalentar a 58°C.
- 5.- Sacar las sondas y otros reactivos del refrigerador y permitir que estén a temperatura ambiente.
- 6.- Preparar la solución de pepsina/HCL y precalentar a 37°C.

PASO 1 DESPARAFINACIÓN:

- Poner en el horno durante 30 minutos a 60°C.
- Sumergir en xilol 2 veces
- Alcohol absoluto 100% (ETOH) 2 baños de 2 minutos cada uno,
- ETOH 95% 1 baño de 5 min.
- ETOH 70% 1 baño de 5 min.
- ETOH 50% 1 baño de 5 min.
- Agua tratada- DEPC 2 baños rápidos
- DEPC-PBS 2 baños de 5 min. c/u

PASO 2

Digestión con Pepsina:

- Incluir los tejidos en una solución precalentada de pepsina (500 µg/ml)-
HCL (200mM) durante 3-10 minutos al 37°C.

- Lavado con TBS durante 2 minutos.
- Introducir las laminillas en la solución astringente e incubarlas durante 30 minutos a 37°C.
- Lavar en TBS por 5 minutos.

PASO 5 DETECCIÓN

- Para prevenir el secado de los tejidos este paso se hace en la cámara húmeda.
- Aplicar streptavidina-HRP a los tejidos. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Sumergir las laminillas en TBS durante 5 minutos.
- Aplicar a las laminillas suficiente substrato DAB/H₂O₂ por 60 minutos en la oscuridad. Incubar a temperatura ambiente.
- Lavar en agua destilada por 5 minutos.

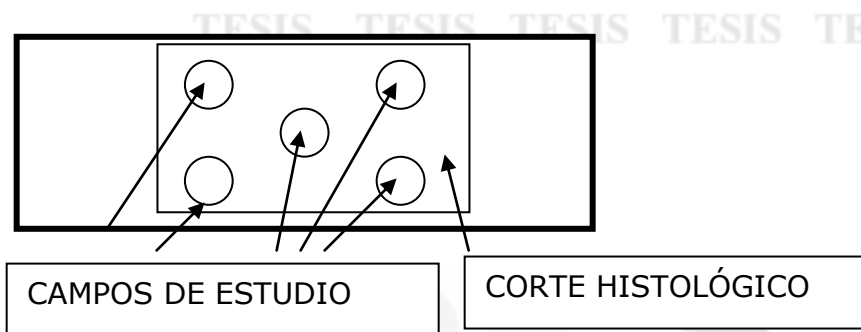
PASO 6 CONTRASTADO Y MONTAJE

Contrateñir con Hematoxilina de Harris 5 minutos

Deshidratar y aclarar en xilol y poner resina y un cubreobjetos

Análisis morfométrico.

Como recomienda Méndez (1990) ¹⁰⁵, se tomaron en cuenta por lo menos 3 cortes histológicos; de cada corte se seleccionaron 5 campos a 400X según esquema anexo. Por cada campo, se realizó el análisis morfométrico en al menos 10 células; con estas 10 mediciones se hizo análisis estadístico.



Análisis estadístico.

El conteo de células teñidas para cada citocina tanto de los controles como de las muestras de los pacientes fue expresado como la Media $\pm$ Desviación Estandar, y las diferencias estadísticas entre dos medias fue analizada usando *t*-de Student. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron con significancia estadística.

El análisis se realizó con el programa Sigma Stat para Windows versión 2-03 (SPSS Inc.).

IV. Resultados.

Los cortes de intestino grueso sano no mostraron ninguna alteración histológica (Fig. 2); Los cortes de intestino grueso con colitis amibiana mostraron alteraciones tanto macroscópicas como microscópicas.

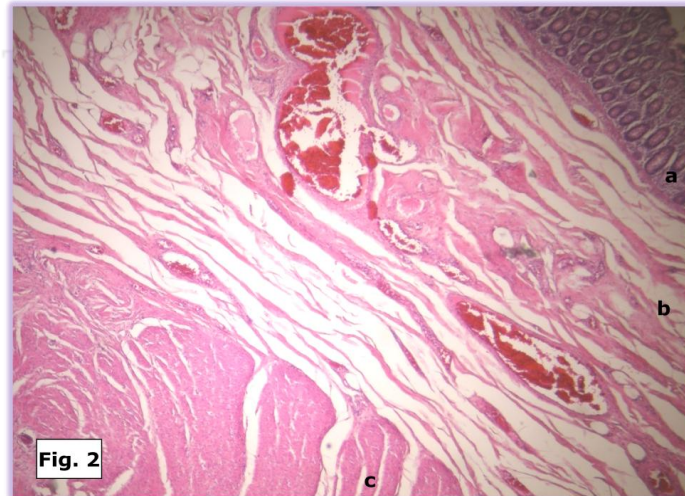


Fig 2B.- Histología de Intestino grueso sano. Hematoxilina/Eosina (40X): donde se aprecian su capa mucosa (a), submucosa (b) y la muscular longitudinal interna (c).

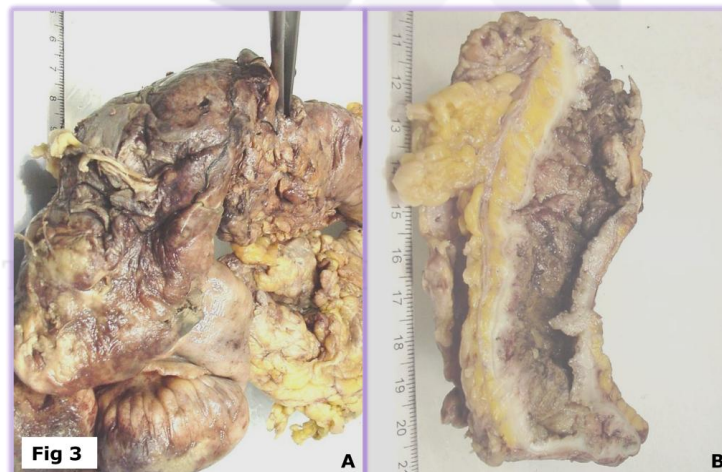


Fig. 3B.- Aspecto macroscópico de intestino grueso de pacientes con colitis amibiana fulminante, (A) cara externa y (B) cara interna.

Las úlceras amibianas se localizaron a lo largo de los intestinos analizados y se caracterizaron por su color verde amarillento cubiertas por material mucoso, presentaron orificios tanto por la superficie interna del intestino como por la cara peritoneal (Fig. 3).

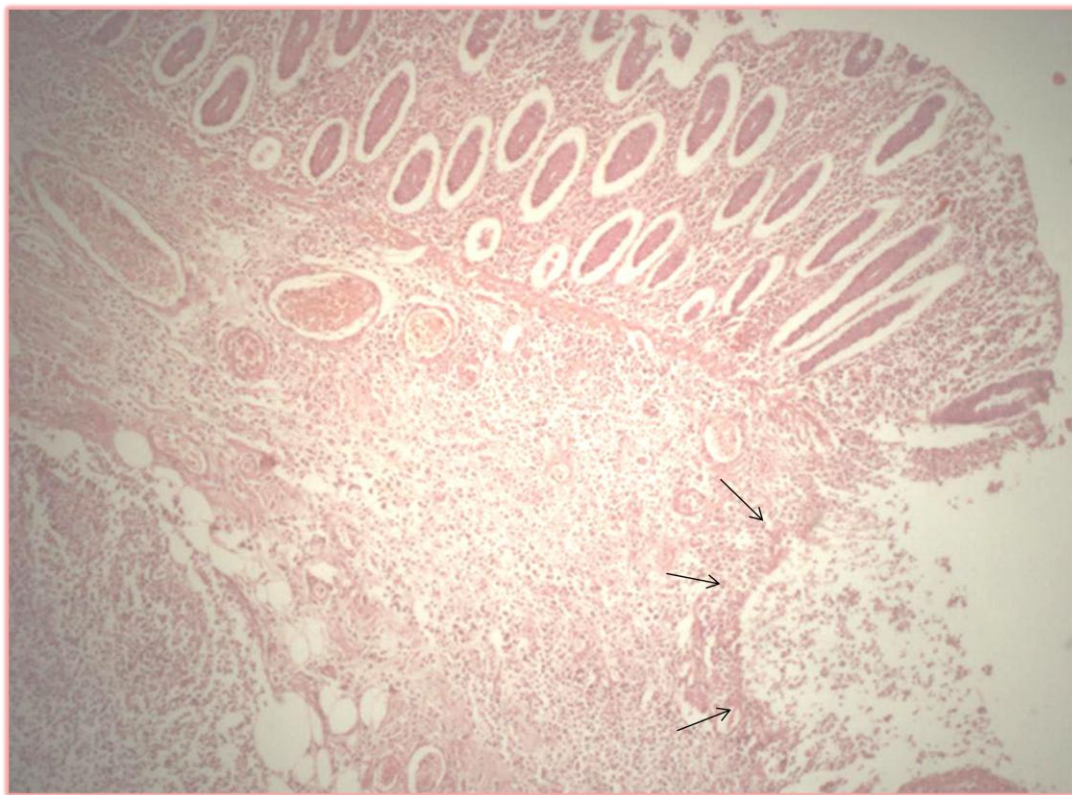


Fig. 4.- Intestino grueso con colitis fulminante (25X). Hematoxilina/Eosina. Áreas de destrucción en fondo de Botella (flechas).

En los cortes de intestino con colitis amibiana se observaron zonas de destrucción de la mucosa que coinciden con las ya descritas por varios autores en fondo de botella o botón de camisa, estas lesiones llegan en algunos casos hasta la muscular externa.

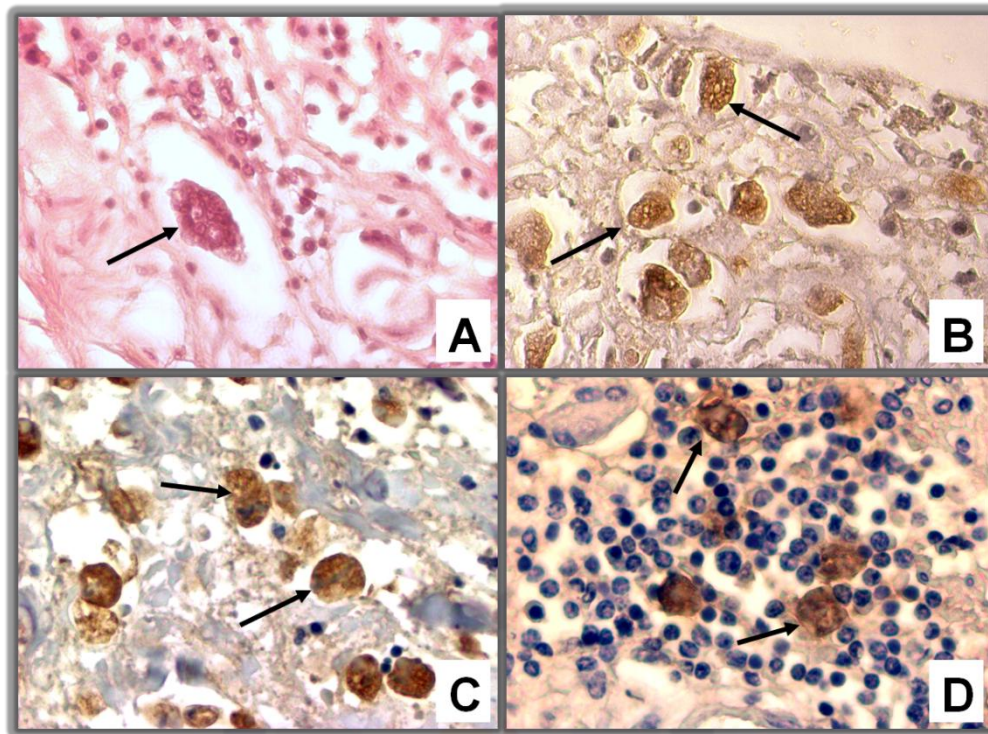


Fig. 5. Detección de trofozoítos de *E. histolytica* (Inmunoperoxidasa 400X). Todos los casos de colitis amibiana estudiados presentaron trofozoítos de *E. histolytica* en los tejidos en estudio; en A) se observa un trofozoíto (flecha) rodeado de abundante tejido inflamatorio (H & E, 400 X); B) trofozoítos (flechas) en zona sin infiltrado inflamatorio (Inmunoperoxidasa anti-*E. histolytica*, 400 X); c) Trofozoítos (flechas) en zona de necrosis con poco infiltrado inflamatorio (Inmunoperoxidasa anti-*E. histolytica*, 400 X); D) Trofozoítos (flechas) en zona con abundante infiltrado inflamatorio (Inmunoperoxidasa anti-*E. histolytica*, 400 X).

Los trofozoítos se identificaron por reacción inmunohistoquímica con anticuerpo primario de conejo anti *E. histolytica*, elaborado por Ventura et al., (2002)¹⁰⁶,

en cortes procesados e incluidos en parafina, las amibas se localizaron en diferentes zonas de la mucosa como lo reportó Ventura *et al.* (2007)¹⁰⁷.

Estos diferentes aspectos los han descrito Ventura, *et al.* (2007)¹⁰⁷, así como su relación con los tipos de células inmunitarias que conforman en infiltrado inflamatorio.

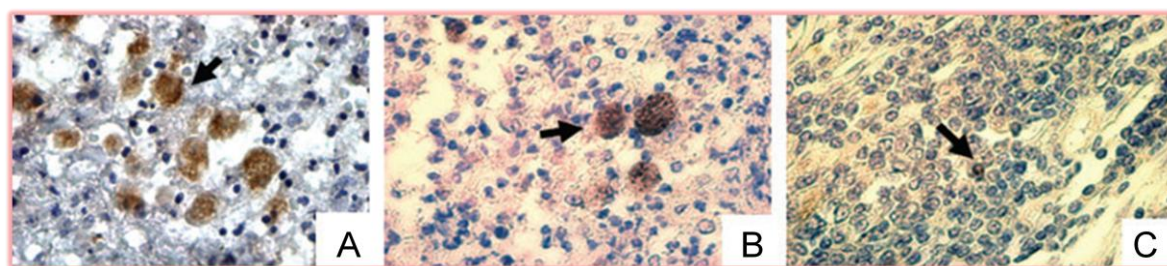


Fig. 6.- Detección de Interferón-γ.- (Inmunoperoxidasa 400X) (A y B) Trofozoítos de *E. histolytica* fueron positivos a INF-γ. (C) Escasos linfocitos del infiltrado inflamatorio de las lesiones amibianas positivos.

INF-γ no fue expresado por las células inflamatorias cercanas o distantes a las amibas, aunque ocasionalmente se observaron algunos linfocitos positivos. Cabe destacar que la gran mayoría de los trofozoítos de *E. histolytica* localizados en las áreas de tejido dañado fueron marcados con el anticuerpo anti INF-γ.

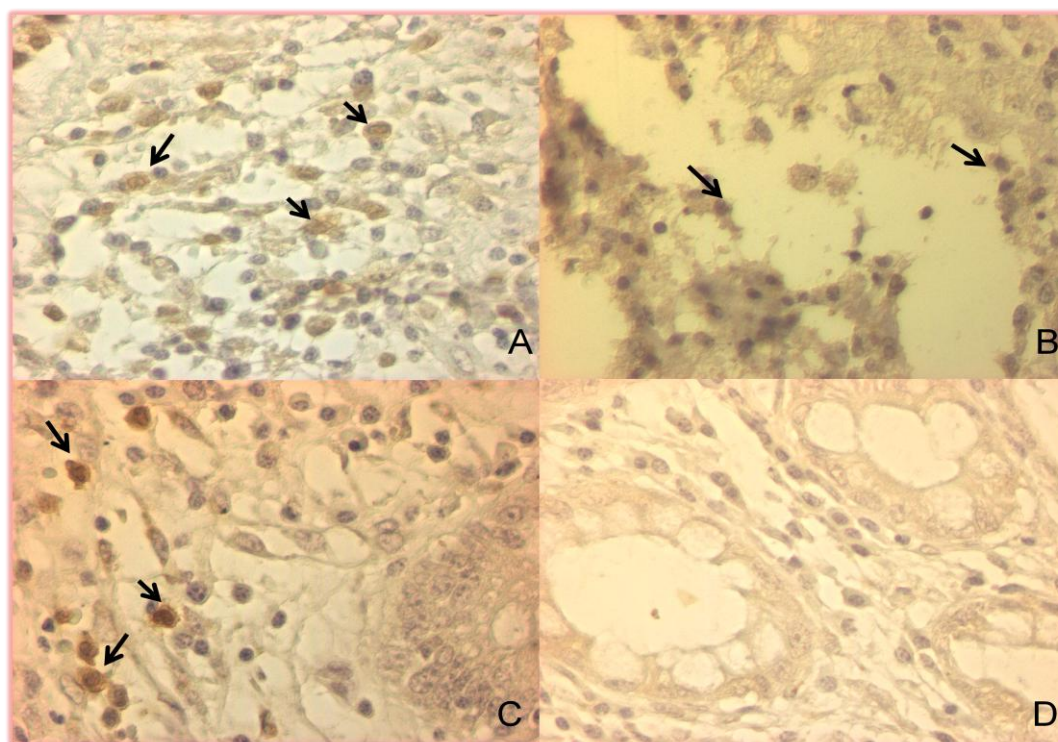


Fig. 7.- Detección de IL-4 (Inmunoperoxidasa 400X). A) Infiltrado inflamatorio con células positivas a IL-4 (flechas); B) Algunas células positivas distantes de los trofozoitos C) infiltrado inflamatorio abundante, pero con muy pocas células positivas a esta citocina (flechas); D) En los casos de colon sano, no se observaron en lámina propia células positivas a IL-4.

Mientras que IL-4 no fue expresada en las células de la mucosa de colon sano (Fig. 7 D). La mucosa del colon con lesiones amibianas tenía numerosas células positivas a IL-4 en el infiltrado inflamatorio. (Fig. 7 A y C) Mientras que los linfocitos cercanos a las amibas no expresaban IL-4 (Fig. 7 B).

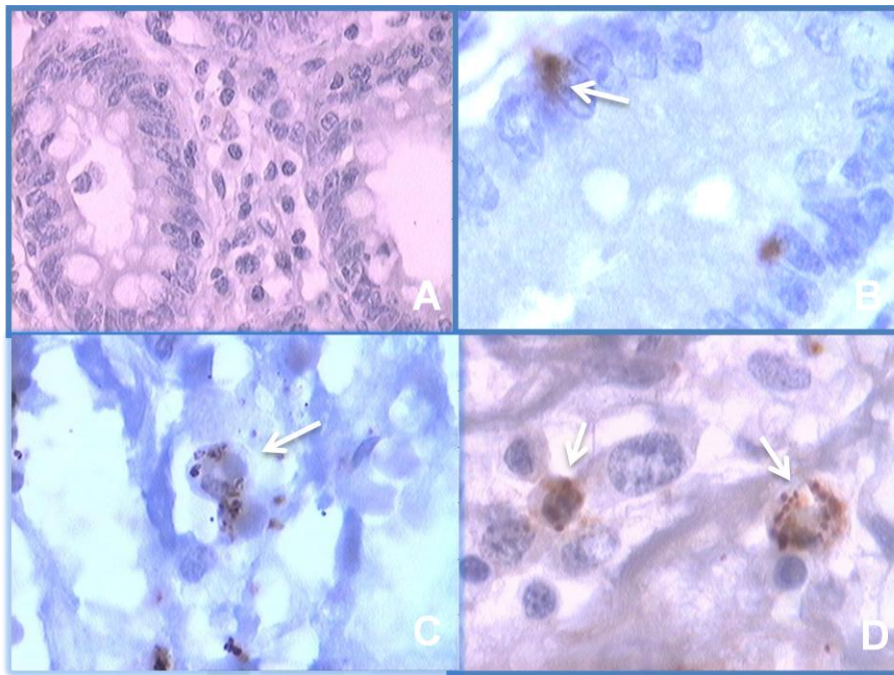


Fig. 8.- Detección de IL-8 (A) No fue expresada en células de la mucosa de colon sano. B) Se observó reacción positiva en escasas células epiteliales de las criptas de Lieberkühn de la mucosa de colon afectado por *E histolytica*. (C y D) Una reacción fue encontrada en mayor número de células de lámina propia de los casos con colitis amibiana (flechas). (Inmunoperoxidasa A y B 400X C y D 1000X)

IL-8 no fué expresada en las células de la mucosa de colon sano (Fig. 8A). En la mucosa de colon afectada por *E histolytica* los neutrófilos en el infiltrado inflamatorio de lámina propia expresaron IL-8 (Fig. 8 C y D)

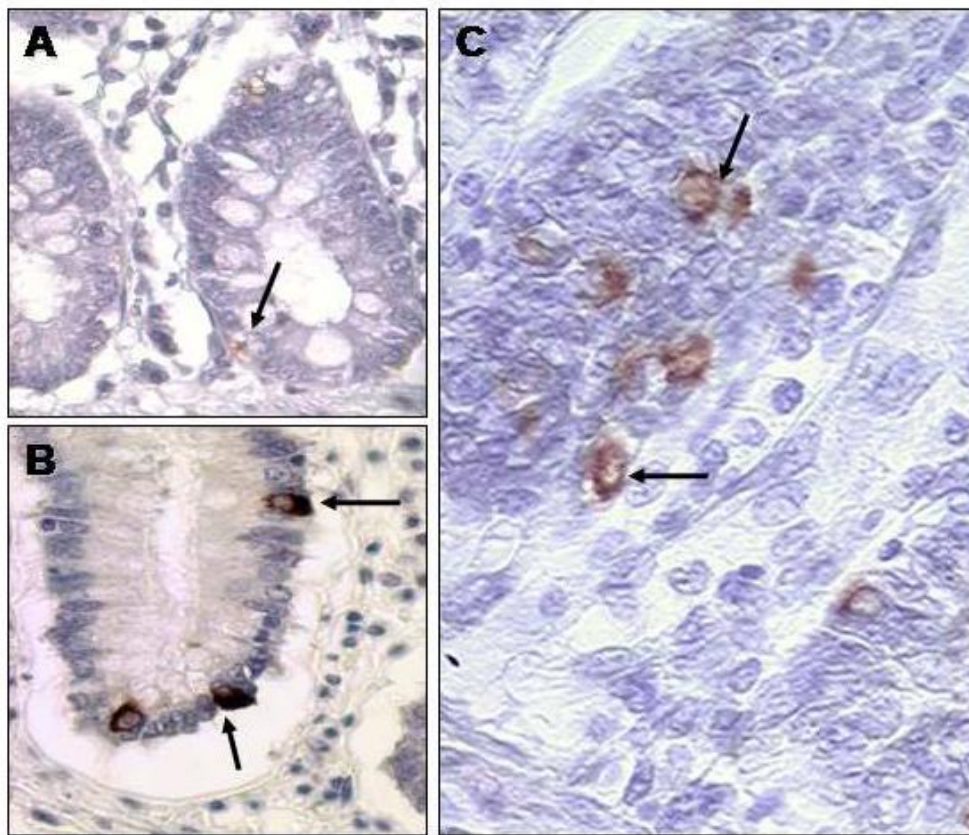


Figura 9.- Detección de IL-10.- (Reacción a la inmunoperoxidasa, 400X).
 (A) Se observó una reacción muy débil en las células epiteliales de las criptas.
 (B y C) Una reacción más intensa se detectó en las células epiteliales de las criptas de las muestras de colon con amibas.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

IL-10 no fue expresada en una de las seis muestras de colon sano. En las otras cinco muestras, la expresión de IL-10 fue débil y únicamente se observó en las células epiteliales de las criptas de Lieberkühn. (Fig 9 A). IL-10 fue expresada intensamente en las células epiteliales de la mucosa de colon afectado por *E histolytica* (Fig 9 B y C). La localización y características de las células que

expresan IL-10 indican que estas células son al parecer células enteroendócrinas.

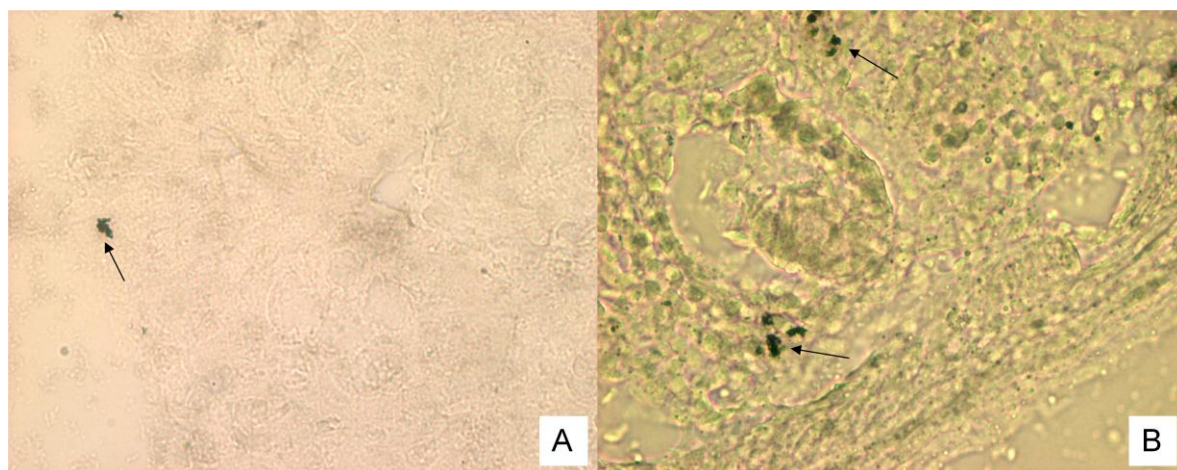


Figura 10.- Detección de RNAm de IL-10. (A) Intestino sano; (B) Intestino con colitis ambiana donde se observa mayor expresión del RNAm de IL-10 en las células epiteliales de las criptas de Lieberkühn, este resultado coincide con el encontrado mediante Inmunohistoquímica.

TGF- β .- En las muestras de colon sano, TGF- β se expresó en algunas células epiteliales (flechas en fig. 11 A). En las muestras de los pacientes con colitis ambiana se observó una proporción más alta de células positivas a TGF- β (Flechas Figuras 11B, C y D)

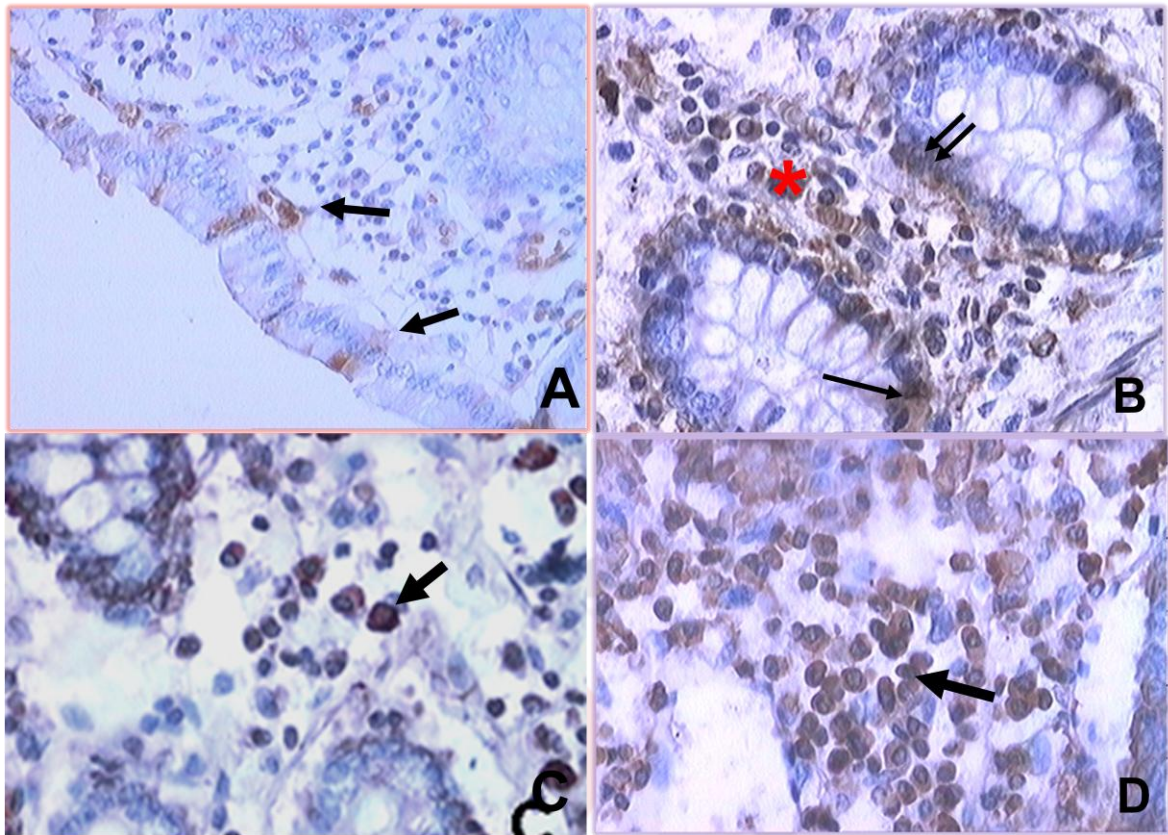


Figura 11.- Detección de TGF-β. (inmunoperoxidasa anti-TGF-β, X400).A)

En tejidos sanos se encontró inmunorreactividad en escasas células del epitelio de recubrimiento de intestino grueso (flechas). (B, C y D). En 3 casos se observó positividad para TGF-β en células de criptas de Lieberkühn (doble flecha) y abundantes leucocitos positivos en lámina propia de todas las muestras con colitis amibiana(*).

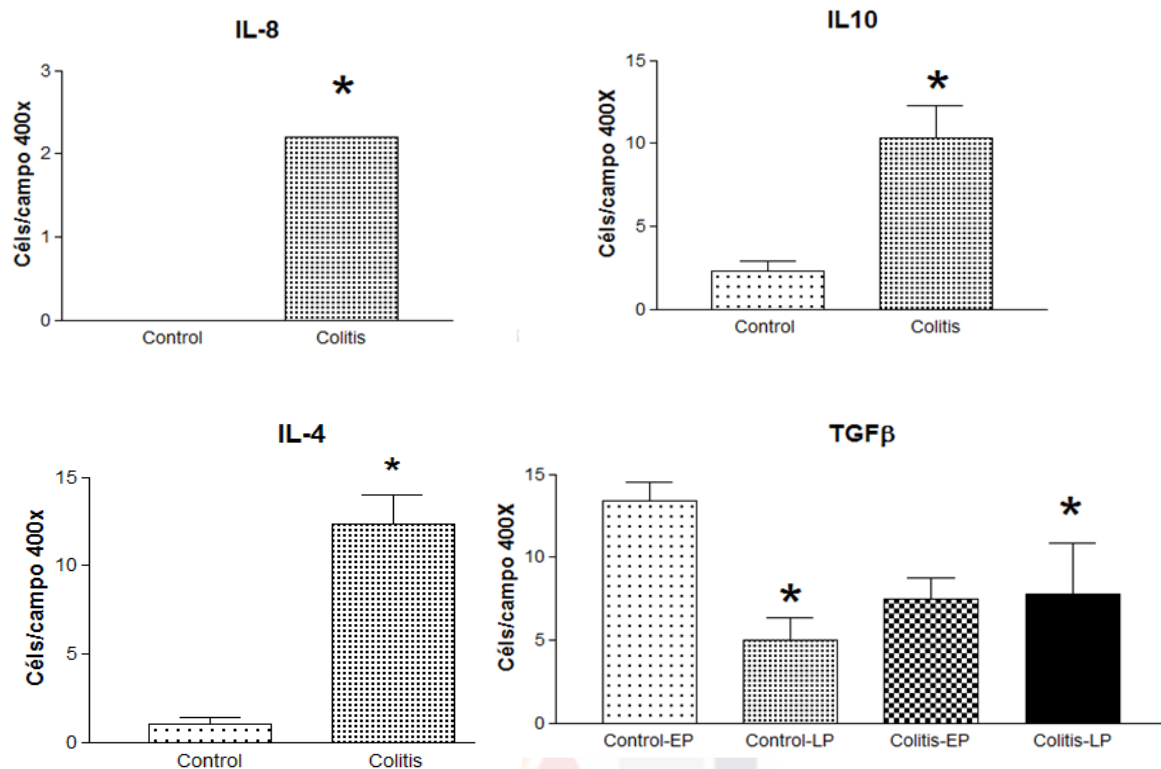


Figura 12.- Conteo de células en mucosa normal y mucosa con colitis amibiana.

(A) Solo en los casos de colitis amibiana se encontraron células positivas a IL-8. ($p = 0.031$) (B) En la mucosa del colon afectada por *E. histolytica* se detectaron un número considerable de células epiteliales positivas a IL-10 que en las células epiteliales de los controles ($p = 0.004$). (C) En la lámina propia de las muestras afectadas por amibas se un número mayor de linfocitos fuertemente positivos a IL-4 que en lámina propia del colon de los controles ($p < 0.001$).

(D) Encontramos más células epiteliales (EP) positivas a TGF- β en los controles que en los casos de colitis amibiana ($p < 0.001$); sin embargo, detectamos más linfocitos TGF- β en lámina propia de los casos colitis amibiana que en lámina propia de colon de los controles ($p = 0.003$).

COX-2.- En las muestras de colon sano, se observó en 3 de los casos una reacción muy débil y en los otros 3 fue nula a la detección de la enzima ciclooxigenasa 2 (flechas fig. 13). Se detectaron células epiteliales de las criptas positivas a esta enzima pro-inflamatoria (Figs 13B y C); algunos casos mostraron positividad en la cara apical de las células epiteliales de las criptas. (Fig 13 flecha)

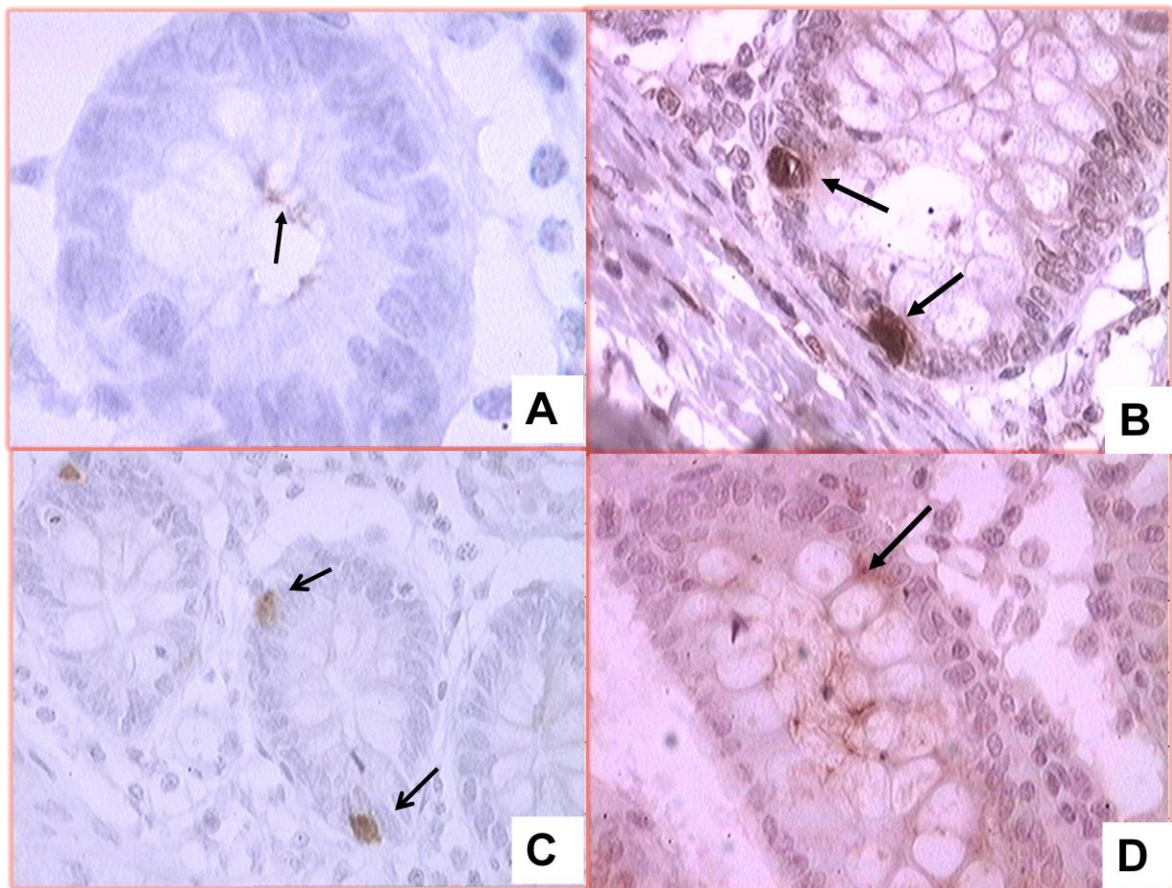


Figura 13.- Ciclooxigenasa. A) Débil reacción en las células de las criptas de Lieberkühn del intestino sano (flecha) y en otras nula; B) Se detectaron células

epiteliales de las criptas de Lieberkühn (flecha) con fuerte positividad en los tejidos con lesiones amibianas; D) algunas células de las criptas presentaron positividad en sus porciones apicales (flechas). (inmunoperoxidasa anti-COX-2; X400).

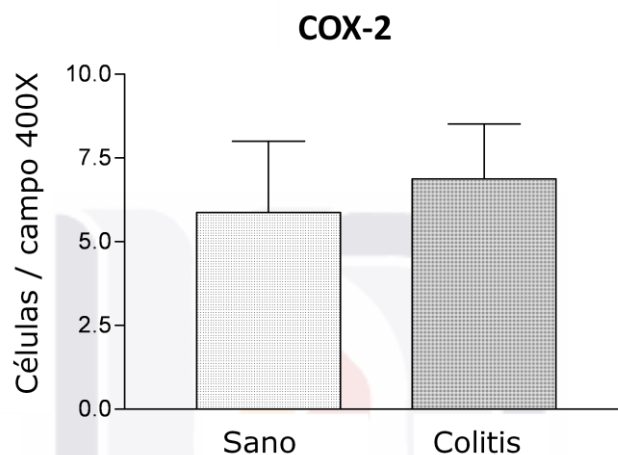


Figura 14.- Conteo de células positivas a COX-2 Esta enzima se detectó en el tejido intestinal del 50% de los individuos tanto en sanos como con colitis. La positividad estuvo presente en el borde superficial del epitelio intestinal (figs 13A), Las células positivas se localizaron en el epitelio de las criptas de Lieberkühn tanto en sano como en colitis (flechas en figs. 13B y 13D), fue muy distinta la intensidad de la marca en los diferentes casos.

iNOS.- Las muestras de colon sano fueron negativas para iNOS (fig 15), el borde apical de las células epiteliales mostraron inmunorreacción a iNOS, y en todos los casos de colitis amibiana se observaron macrófagos positivos (flechas

C, D y F) en lámina propia de las áreas de tejido lejanas a las amibas. Los trofozoítos de uno de los casos dió positividad a iNOS.

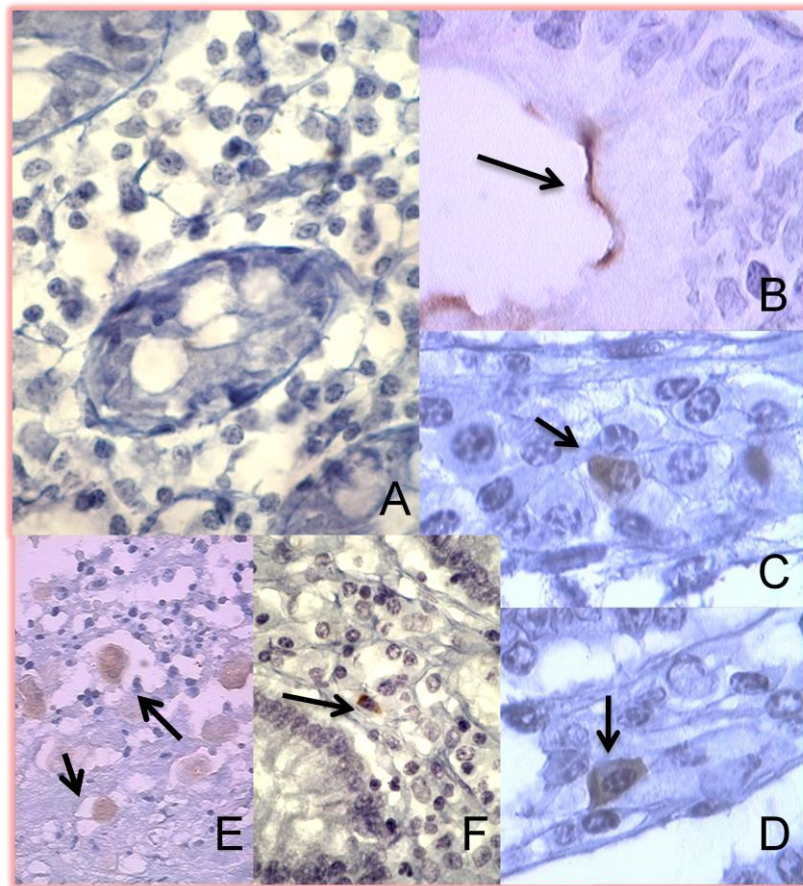


Figura 15.- Sintasa del Óxido Nítrico inducible (iNOS). A) El intestino sano es negativo a la producción de esta enzima. B) El borde apical de las células epiteliales de las criptas de Lieberkühn (flecha) de intestinos con amibiasis mostraron inmunorreactividad para iNOS; C, D y F) algunos macrófagos de la lámina propia (flecha) fueron de igual manera positivos; E) Trofozoítos (6 por campo) marcados con anticuerpo anti iNOS. (Inmunoperoxidasa anti-iNOS; X400).

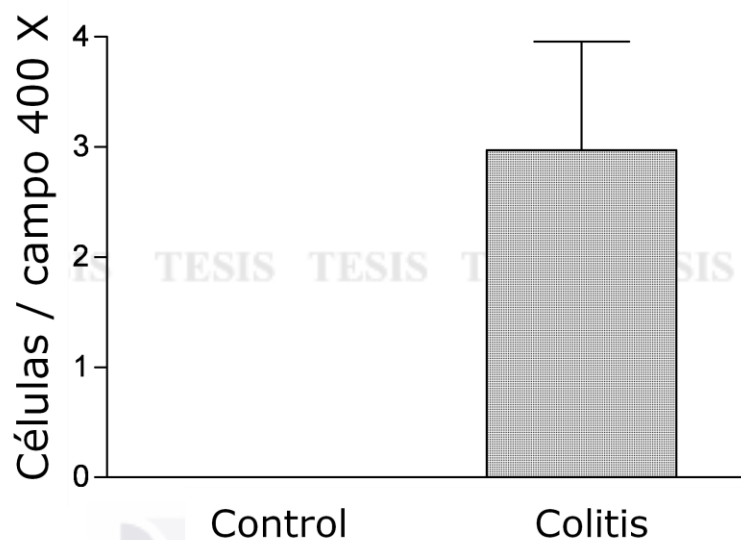


Figura 16.- Conteo de células positivas a Sintasa del oxido nítrico (iNOS).- enzima presente en células de lámina propia de mucosa de intestinos con colitis (3 células por campo a 40X), pero no en intestinos sanos, la positividad estuvo presente en escasas células epiteliales (flecha en fig 15B) y principalmente en macrófagos (flecha en fig. 15C y 15D).

Defensina humana β -3.- En las muestras de colon sano no se observaron células positivas a esta clase de Defensina (Fig 17A). En las muestras de colon con colitis amibiana los gránulos de los neutrófilos de lámina propia y submucosa mostraron reacción positiva (Figs 17B,C y D).

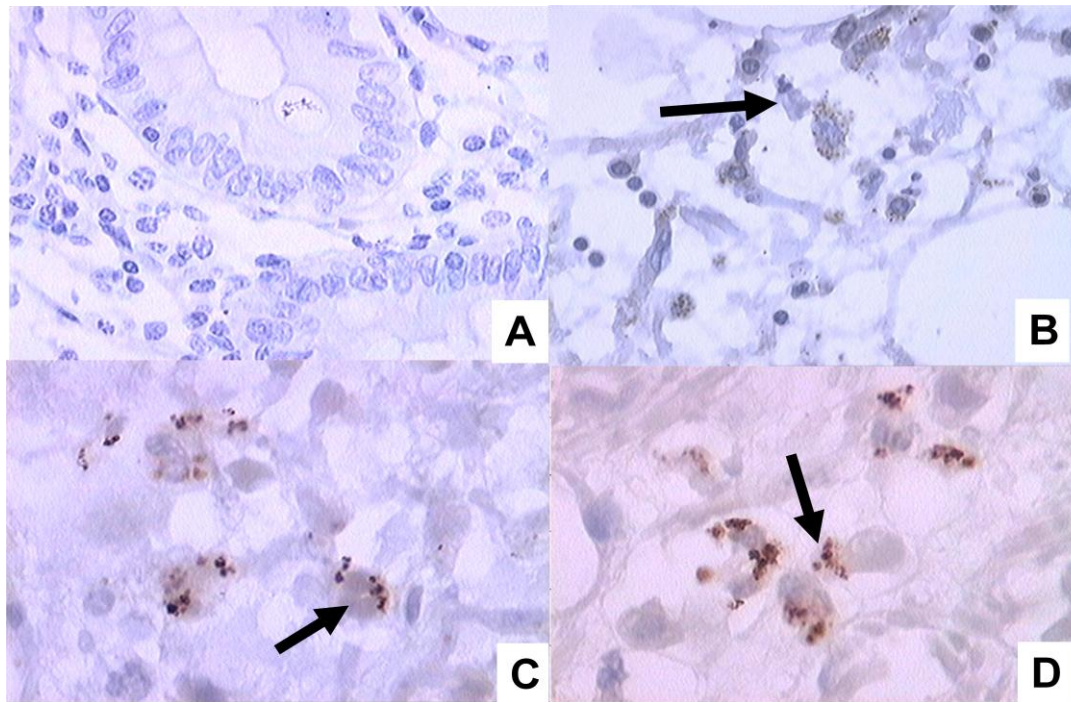


Figura 17.- Defensina Humana β -3 A) Control sin células positivas a defensina humana en los tejidos sanos. B, C y D) Se detectaron neutrófilos positivos a defensina (flechas) en lámina propia y submucosa de intestinos con lesiones amibianas (Inmunoperoxidasa anti-defensina humana; A y B 400X; C y D 1000X).

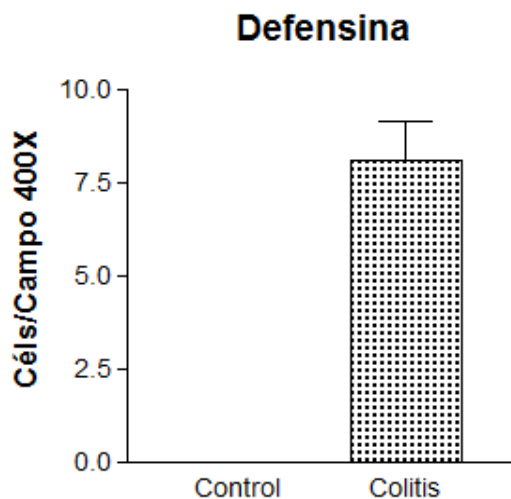


Figura 18.- Conteo de células positivas a Defensina Humana-3.- Únicamente los PMNs, de lámina propia de intestinos con colitis fueron positivos a esta proteína (figs 17B, 17C and 17D).

CD 59.- Las amibas de las muestras de colon con colitis ambiana fueron positivas a CD59, la intensidad de la reacción fue variable, como se observa en la figura 19A (flecha superior) hasta un poco baja como el de la parte inferior derecha de la misma figura; otras zonas de intestino presentaron trofozoítos solitarios con reactividad intermedia en una amplia zona de necrosis con detritus celulares de la mucosa como de células inflamatorias (fig. 19B); también se observaron trofozoítos de mediana reactividad en zonas de necrosis con escaso infiltrado inflamatorio (fig. 19C); finalmente, en otras áreas de las lesiones intestinales se identificaron trofozoítos con muy baja reactividad localizados en áreas de necrosis compuesta por células de la mucosa-submucosa dañada sin infiltrado inflamatorio (fig. 19D).

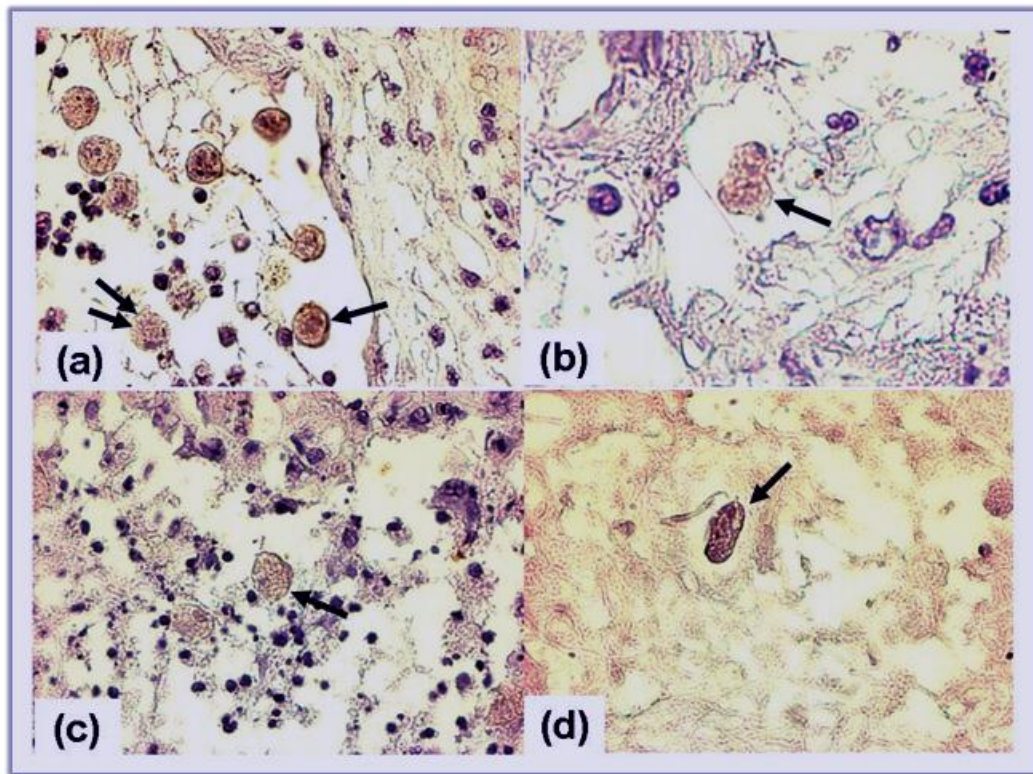


Fig 19.- Detección de CD59. (Inmunoperoxidasa 400X). Amibas localizadas en los diferentes zonas de las lesiones amibianas presentaron reactividad a la proteína CD59.

C3b.- Las muestras de colon sano no fueron positivas a C3b (fig. 20A) Sin embargo en las muestras de colon con lesiones amibianas hubo positividad al parecer en neutrófilos y macrófagos de submucosa en áreas alejadas de las amibas (flechas en figs 20B, C y D).

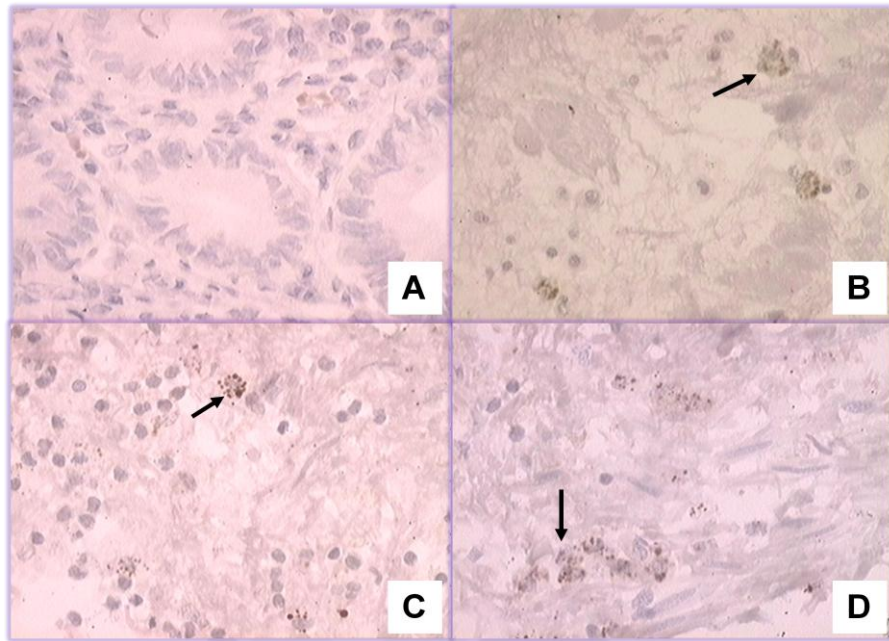


Fig 20.- Detección de C3b. (Inmunoperoxidasa 400X) A) Las muestras de colon sano sin positividad. B, C y D) Intestino con colitis fulminante células positivas en submucosa en áreas alejadas de las amibas (flechas).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

V. Discusión.

En este trabajo se reporta por primera vez la expresión de algunas citocinas por células de la mucosa intestinal humana en lesiones provocadas por *E. histolytica*, para poder discernir algunos de los mecanismos de regulación en la interfase huésped parásito. Algunas de esas citocinas se cree que están involucradas en la patogénesis de la colitis amibiana¹⁰⁸⁻¹¹¹. Además, en modelos experimentales donde tejidos intestinales humanos fueron infectados con cepas virulentas de trofozoítos de *E. histolytica*, IL-8 fue producida por células epiteliales intestinales en regiones morfológicamente normales distantes de las áreas de tejido dañado¹¹². Al parecer IL-8 induce la migración rápida de neutrófilos en el sitio de infección aguda por *E. histolytica*^{112,24,109}. En un estudio previo Ventura *et al.*, (2007)¹⁰⁷ demostraron también que los neutrófilos son abundantes en áreas de tejido sin alteraciones morfológicas cercanas a las úlceras. Los resultados obtenidos en este estudio apoyan la hipótesis de que la producción de citocinas como IL-1 e IL-8 por las células epiteliales intestinales puede jugar un papel central en la patogénesis de la infección amibiana. Al parecer la atracción de los neutrófilos incrementa la inflamación y el daño al tejido²⁴.

IL-4 fue expresada por numerosos linfocitos del infiltrado inflamatorio cerca de las áreas de tejido dañado, pero no en los linfocitos cercanos a las amibas. De acuerdo a un estudio de Sánchez *et al.*, (2002)¹¹³ en los individuos infectados con *E. histolytica* la expresión de IL-4 por los linfocitos de sangre periférica es más alta comparada con los controles sanos; y de igual manera los linfocitos

del torrente sanguíneo de individuos infectados con cepas patógenas de *E. histolytica* expresan altos niveles de IL-4. Además, los estudios en roedores indican que IL-4 juega un papel en la patogénesis de la amibiasis. Por ejemplo, un estudio muestra que la infección amibiana intra cecal en ratones CBA (una cepa muy susceptible) permite un aumento en la producción rápida y sostenida de interleucinas por los linfocitos Th2 (IL-4+, IL-5+, IL-13+), lo cual inhibe la producción de INF- γ e impide la eliminación de la infección ¹¹⁴. Consecuentemente, en gerbos la resistencia a la reinfección se asocia con baja producción de IL-4 ¹¹⁵.

IL-4 la citocina típica de Th2 ^{116,117}, estimula el desarrollo de células Th2 de linfocitos TCD4+ vírgenes y funciona como un factor de crecimiento autócrino para células Th2 diferenciadas ^{117,118}. IL-4 e IL-10 vistas como inhibidoras de la diferenciación de Th1 ^{119,120}, pueden suprimir la inmunidad mediada por células en el colon humano invadido por *E. histolytica* y de esta manera contribuir a la supervivencia del parásito.

IL-10 se expresó intensamente en células epiteliales aisladas pero no en lámina propia de mucosa infectada por *E. histolytica*. Esta es la primera vez que se reporta que IL-10 es expresada en la mucosa del colon con colitis amibiana ¹⁴⁰. En un estudio previo se reportó mayor expresión de IL-10 en los linfocitos de sangre periférica en los pacientes con amibiasis invasiva (colitis y absceso hepático) que las células de los controles sanos ⁶⁵. Además, evidencias recientes sugieren que IL-10 tiene un importante papel en la inmunidad innata en modelos murinos de colitis amibiana ¹²¹. Sin embargo, el mecanismo por el cual IL-10 contribuye a la inmunidad innata aún no se conoce. Se ha reportado

un mecanismo que involucra la participación de IL-10 estimulando la producción de mucina por las células caliciformes del epitelio^{122,123} para mantener la barrera protectora. Otro mecanismo propuesto se basa en los efectos anti-inflamatorios de IL-10 en las células epiteliales y los leucocitos¹²⁴ pero al parecer no es relevante porque hay un proceso inflamatorio importante en el colon invadido por *E. histolytica*. En resumen, la síntesis de IL-10 en la colitis amibiana sugiere que su actividad es insuficiente para controlar la inflamación intestinal¹²⁵. Es evidente la producción de IL-10 por células de la mucosa intestinal de colon en infecciones por *E. histolytica*. Este hecho no se había descrito anteriormente, lo que se había mencionado es la modulación en la expresión de esta citocina por linfocitos de sangre periférica en amibiasis^{126,65,66}, y se había vislumbrado su participación en modelos animales^{23, 115}. Además se ha descrito que la IL-27 producida por las células de la respuesta inmune innata inducen a las células T a producir IL-10⁶⁹. La producción y expresión de IL-10 por células epiteliales intestinales puede ser una manera de modulación de la respuesta inmune inducida por el agresor. Se sabe que las células del epitelio intestinal producen una serie de citocinas proinflamatorias ante *E. histolytica* en modelos animales¹¹², pero no se ha descrito la producción intestinal de IL-10 *in situ* como se ha reportado en este estudio; el origen de la IL-10 aún no es preciso, Ventura *et al.*, (2003)¹⁰⁴ describieron con anterioridad en humanos la presencia de mayor cantidad de células CD8+ en lesiones hepáticas amibianas que se sabe son productoras de IL-10, pero no en intestino donde no se detectó variación alguna de este tipo celular con respecto a las personas sanas¹⁰⁷, de tal manera que la fuente de

IL-10 puede ser de origen del epitelio intestinal. A la amplia lista de células que producen IL-10⁶⁷; agrego las células del epitelio intestinal humano sobre todo ante la agresión por *E. histolytica*. La producción de IL-10 apoyaría la tesis de que *E. histolytica* induce un estado de inmunosupresión local, pero ahora con la respuesta innata del epitelio intestinal que establecería una respuesta de resistencia al patógeno como lo sugiere Ivory et al., (2007)¹²² y Hamano et al., (2006)¹²¹. Por otra parte, la función de las células epiteliales del colon ante la presencia de *E. histolytica* sería similar a la función de las células de Paneth de las criptas de Lieberkühn en intestino delgado, pues ellas producen defensinas antibacterianas específicas de intestino que participan también en establecer una respuesta de resistencia a la invasión bacteriana⁹⁴ o ciertas células metaplásicas en intestino grueso en enfermedad inflamatoria intestinal⁹⁵. Para corroborar la presencia de RNAm de IL-10 se hizo **hibridación *in situ*** encontrándose positividad en las células epiteliales del fondo de las criptas de Lieberkühn en un patrón de distribución semejante a la que se observó con inmunohistoquímica.

TGF- β .- El número de células en lámina propia que expresaron TGF- β fue significativamente más alto en la mucosa del colon de pacientes infectados con colitis amibiana que en los controles sanos. De acuerdo con nuestro resultado, en otro estudio se han comparado controles sanos asintomáticos con pacientes con amibiasis invasiva (colitis y absceso hepático). Los linfocitos estimulados con antígenos amibianos tienen mayor expresión de TGF- β ⁶⁵. La expresión aumentada de TGF- β , una citocina con propiedades antiinflamatorias, puede reducir el intenso infiltrado inflamatorio observado en la colitis amibiana

fulminante⁴. Además, TGF- β es el principal estimulante de los macrófagos para que expresen el gen de sintetasa de NO citotóxico para *E. histolytica*¹²⁶. De este modo, una producción aumentada de TGF- β pudiera contribuir a aumentar la activación de los macrófagos e impedir la invasión del colón por el parásito. Sin embargo, esos eventos aparentemente no están ocurriendo en la mucosa del colon infectado por *E. histolytica*. En resumen, los mecanismos por los que TGF- β puede participar en la patogénesis de la colitis amibiana permanece incierto.

Cabe mencionar que **INF- γ** no se expresó en ninguna de las células inflamatorias, cercanas o distantes a las amibas pero fue detectado en la mayoría de los trofozoítos de *E. histolytica*; en relación a la positividad de los trofozoítos a el anticuerpo monoclonal anti-INF- γ , probablemente se deba a una reacción cruzada con alguna molécula amibiana desconocida. Se ha reportado que los trofozoítos expresan moléculas que son reconocidas por anticuerpos o proteínas del huésped, tales como sintasa del óxido nítrico¹⁰⁴, COX^{127,128} y TNF- α ¹²⁹.

Los datos obtenidos de pacientes, modelos de amibiasis en roedores, y experimentos *in vitro* sugieren un papel del INF- γ en la patogénesis de esta enfermedad. Generalmente en los humanos, la producción de altos niveles de INF- γ se asocia con mayor resistencia a la infección^{113,65,130} al igual que en los modelos animales⁸⁶, mientras que los niveles bajos se asocian con mayor susceptibilidad a amibiasis intestinal y hepática¹¹⁴. El mecanismo por el cual la producción de INF- γ es inhibida en el colon no se conoce pero al parecer está

relacionado con la producción de IL-4 e IL-10, lo cual inhibe a las células Th1, que son el principal tipo de células productoras de INF- γ .

COX-2.- enzima importante en el metabolismo del ácido araquidónico para producir PGE2 entre otras⁷⁰. La inmunolocalizamos en células del fondo de las criptas de Lieberkühn y en el borde apical de algunas células epiteliales de colon de pacientes con lesiones amibianas. Wang y Chadee (1995)⁷⁶ describieron que los macrófagos producen PGE2 como respuesta al contacto con trofozoítos de *E. histolytica* y en consecuencia inducen un estado de inmunosupresión local por esta vía, ya que la PGE2 se asocia fuertemente a la disminución de la respuesta inmune al actuar como inmunosupresor sobre linfocitos B, Th1, Th2 y macrófagos⁷⁰. Aún más, Sánchez, et al., (2004)¹³¹ han descrito que *E. histolytica* induce la producción de PGE2 en un modelo de absceso hepático en hámster. Más adelante, Gutiérrez-Alarcón et al., (2006)¹²⁸ describieron que COX-2 está fuertemente relacionada con trofozoítos de *E. histolytica* y macrófagos en las lesiones de hígado en hámsters. Lo anteriormente descrito refuerza nuestro hallazgo inédito de que las células del epitelio de intestino grueso humano expresan COX-2 y que está probablemente asociado a la influencia de las moléculas amibianas. *E. histolytica* también induce al epitelio humano a colaborar en la inmunosupresión local con la producción de PGE2 mediante COX-2, siendo esto una vía más de expresión de la respuesta innata intestinal en amibiasis.

iNOS.- enzima que genera radicales libres de nitrógeno (óxido nítrico) cuya función es muy importante en varios procesos celulares como la inflamación y en respuestas antiparasitarias como en *Leshmania* y *E. histolytica*¹³², sobre

todo. En modelos animales estudiados, destaca la función de los macrófagos que estimulados por diversos mecanismos aumentan su producción de NO y así son efectivos en destruir a trofozoítos de *E. histolytica*^{42,86}, o modelos resistentes como en amibiasis hepática en ratón, donde aparecen tempranamente PMNs y macrófagos productores de NO y, probablemente sean los actores principales de la eliminación de trofozoítos¹³³; en otros estudios se ha detectado que los trofozoítos de *E. histolytica* en hígado humano expresan la enzima iNOS¹⁰⁴ y probablemente represente uno más de los mecanismos de agresión del parásito ante las defensas del huésped, esto último se explica por qué *E. histolytica* es consumidora de L-arginina del medio de cultivo¹³⁴.

Defensinas.- péptidos antimicrobianos que se encuentran en neutrófilos y en células epiteliales del tracto gastrointestinal. Forman parte importante de las defensas inmunes innatas del organismo. Hay 6 tipos de defensinas dependiendo de la célula donde se encuentren^{94,95}, nosotros localizamos β -defensina-3 por Inmunohistoquímica en neutrófilos de mucosa de colon con amibiasis. No la detectamos en colon de personas sanas como lo ha reportado anteriormente Ventura *et al.*, (2007)¹⁰⁷; se sabe que las defensinas se producen normalmente en las células de Paneth del intestino delgado y esta aumentada su producción en la enfermedad inflamatoria intestinal^{96,97}, pero disminuida en la enfermedad de Crohn⁹⁸. En estudios de colitis amibiana, Ventura *et al* (2003;2007)^{104,107} han analizado previamente el hecho de que se establezca un panorama de inmunosupresión, lo que nos permite deducir que en el caso de la producción de defensinas está inhibida o suprimida por

influencia de *E. histolytica* y solamente la podemos inmunolocalizar en los gránulos de los polimorfonucleares de la mucosa intestinal de los enfermos. En los casos de colon sano los PMN no son abundantes, los datos obtenidos coinciden con lo reportado por Ventura *et al*, (2007)¹⁰⁷.

Los trofozoítos de *E. histolytica* encontrados en la mucosa del intestino grueso en humanos presentan en su membrana una proteína antigénicamente similar a la proteína **CD59** ó protectina humana. Esto podría indicar que las amibas sintetizan esta molécula o que fue captada del líquido tisular¹³⁶. Es también probable que corresponda a la lectina de 170 kD de *E. histolytica* la cual tiene similitud molecular y funcional con la protectina CD59^{137,138}, así que, mediante este mecanismo, dicha lectina participaría en la protección de las amibas contra la acción del complemento¹³⁹. Aunque los experimentos *in vitro* indican que el complemento puede destruir a *E. histolytica*^{43,44} no se conocen los mecanismos por los que el parásito escapa de la destrucción *in vivo*. Los estudios de Ventura *et al.*, (2008)¹³⁹ demostraron que los trofozoítos expresan una molécula antigénicamente similar a la protectina humana CD59.

En los resultados obtenidos por inmunohistoquímica anti **C3b** no encontramos inmunorreacción en los trofozoítos pero sí en neutrófilos y macrófagos de submucosa en áreas alejadas de las amibas, lo cual es normal sobre todo en un proceso inflamatorio.

VI. Conclusiones

En forma general podemos establecer con los resultados hasta ahora obtenidos que en la colitis amibiana los trofozoítos de *E. histolytica* inducen una respuesta innata que coadyuva a establecer un panorama de inmunosupresión y que estimula los canales necesarios para ello. Los hechos son la producción de IL-10 y TGF- β por las células epiteliales de colon y por las células linfoides de lámina propia respectivamente; La capacidad de *E. histolytica* de consumir L-arginina probablemente le quitaría el sustrato a los escasos macrófagos inmunosuprimidos para no producir NO en el medio que rodea a las amibas, aún mas, la expresión de COX-2 que produciría PG2 que es un fuerte inmunomodulador de las células linfoides y la disminución o ausencia de defensinas como proteínas bactericidas. La presencia de CD59 en la superficie de las amibas puede ser un mecanismo importante de protección contra la acción del complejo de ataque de membrana y por lo tanto un mecanismo de patogenicidad. De tal manera que la amiba ejerce varias funciones de control del sistema inmune innato para perpetuarse en los tejidos.

VII. Anexos

VIII.1 Personal Participante:

Dr. Javier Ventura Juárez. Depto. De Morfología, Centro de Ciencias Básicas, UAA.

Dr. Rubén González Romo, Depto. Patología, Clínica Hospital No.2 IMSS-Aguascalientes.

Dr. Luis Muñoz Fernández. Profesor de asignatura, Dept de Morfología y Subdirector Médico del Hospital Hidalgo, Ags.

Dr. Joaquín Alvaro Victoria Hernández, Médico Anatomopatólogo, Jefe del Departamento de Patología del Hospital Hidalgo, Ags.

Dr. Sixto Javier Sosa, Hospital General, Zacatecas, Zac.

Dr. Rafael Campos Rodríguez, Departamento de Bioquímica de la Escuela Superior de Medicina, IPN.

Dra. Eva María Salinas Miralles. Depto. Microbiología. UAA

VIII.2 Consentimiento informado para participar en un Proyecto de Investigación.

Título del proyecto: **Amibiasis Intestinal: Respuesta Innata**

Investigador: Dr. Javier Ventura Juárez. Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, teléfono: (449) 910 8425. TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Objeto y Antecedentes: Este es un estudio acerca de los mecanismos de respuesta del sistema inmunológico de personas que padecen amibiasis intestinal. Esta enfermedad es causada por el parásito llamado *Entamoeba histolytica* (amiba) y provoca gran destrucción en el intestino grueso, así como en el hígado cuando viaja por la sangre; esta enfermedad se ha estudiado mucho en animales de laboratorio por eso es necesario conocer más de la respuesta inmunológica en los enfermos.

Procedimientos.

Si consiento en participar sucederá lo siguiente:

1. Responderé a preguntas sobre mi historia médica.
2. Me someterán a una exploración física y análisis de laboratorio necesarios para confirmar que padezco de amibiasis intestinal. TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
3. Me extraerán sangre del brazo con una jeringa para poder obtener el suero y las células que se van a estudiar. La aguja a veces produce una molestia que dura menos de un minuto; en ocasiones se produce un hematoma, pero esto ocurre con muy poca frecuencia.

4. Se me harán estudio de rayos X, ultrasonido y si es necesario, se me tomará una muestra de biopsia de intestino grueso para confirmar el diagnóstico, estos no son dolorosos ni peligrosos, mediante estos estudios se detectará el grado de daño en el intestino grueso.
5. Me harán un seguimiento continuo del curso de mi enfermedad con el tratamiento médico indicado y, a un mes después de haberme tomado la primera muestra de sangre se me hará una segunda toma para realizar un segundo estudio de mis células de la sangre.

Beneficios:

Es posible que no se produzca un beneficio directo alguno para mí por participar en el estudio. Sin embargo, es posible que se conozca más acerca de la amibiasis en humanos.

Riesgos:

Durante la estancia en el hospital y bajo el tratamiento médico indicado que se lleve adecuadamente, es raro que se puedan presentar complicaciones.

Confidencialidad:

Los resultados de todas las pruebas del estudio se discutirán conmigo. Toda la información obtenida en este estudio será considerada confidencial y será usada sólo a efectos de investigación. Mi identidad será mantenida confidencial en la medida en que la ley lo permita.

Preguntas:

El asistente de investigación ha discutido esta información conmigo y se ha ofrecido a responder a mis preguntas, puedo ponerme en contacto con el Dr Javier Ventura Juárez al Teléfono 01 (449) 910 84 25 para aclarar mis dudas.

Derecho a rehusar o abandonar.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
Mi participación en el estudio es enteramente voluntaria y soy libre de rehusar a tomar parte o a abandonar en cualquier momento, sin afectar ni poner en peligro mi atención médica futura.

CONSENTIMIENTO:

Consiento en participar en este estudio, he recibido una copia de este impreso y he tenido la oportunidad de leerlo.

FIRMA: _____ FECHA: ____/____/____

FIRMA DEL CLINICO: _____

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

VIII.3 Diagnóstico quirúrgico de los pacientes

Tabla 1 **Características principales del diagnóstico quirúrgico de los pacientes en estudio.**

Origen	Edad/Sexo	Resumen diagnóstico quirúrgico	Co-morbilidad	Falleció
HHAgS	73/M	Ileostomía, con apendectomía y colectomía	No	Si
HGZ	48/F	Colectomía total por abscesos y necrosis	HTA	No
HGZ	68/F	Hemicolectomía derecha y de colon transverso	HTA	No
HGZ	75/M	Hemicolectomía con ileostomía término terminal	Alcoholismo	No
HGZ	45/F	Ileosotomía y colectomía	D M II	No
HGZ	3/F	Colectomía	DPC	Si
HGZ	23/F	Colectomía del segmento transverso por numerosas perforaciones con peritonitis aguda	IVU	Si
IMSS-2 Ags.	70/M	Colectomía de porción ascendente	No	Si
HH Ags	85/M	Ileosotomía total con colectomía	No	SI
HGZ	24/M	Hemicolectomía derecha por colitis aguda		
		Amibiana necroabscesada y perforada	No	No

Un rasgo en común de todos los pacientes del estudio es que ingresaron al hospital con un cuadro de abdomen agudo posteriormente, al obtener la historia clínica y una exploración cuidadosa los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente y se llegó al diagnóstico definitivo.

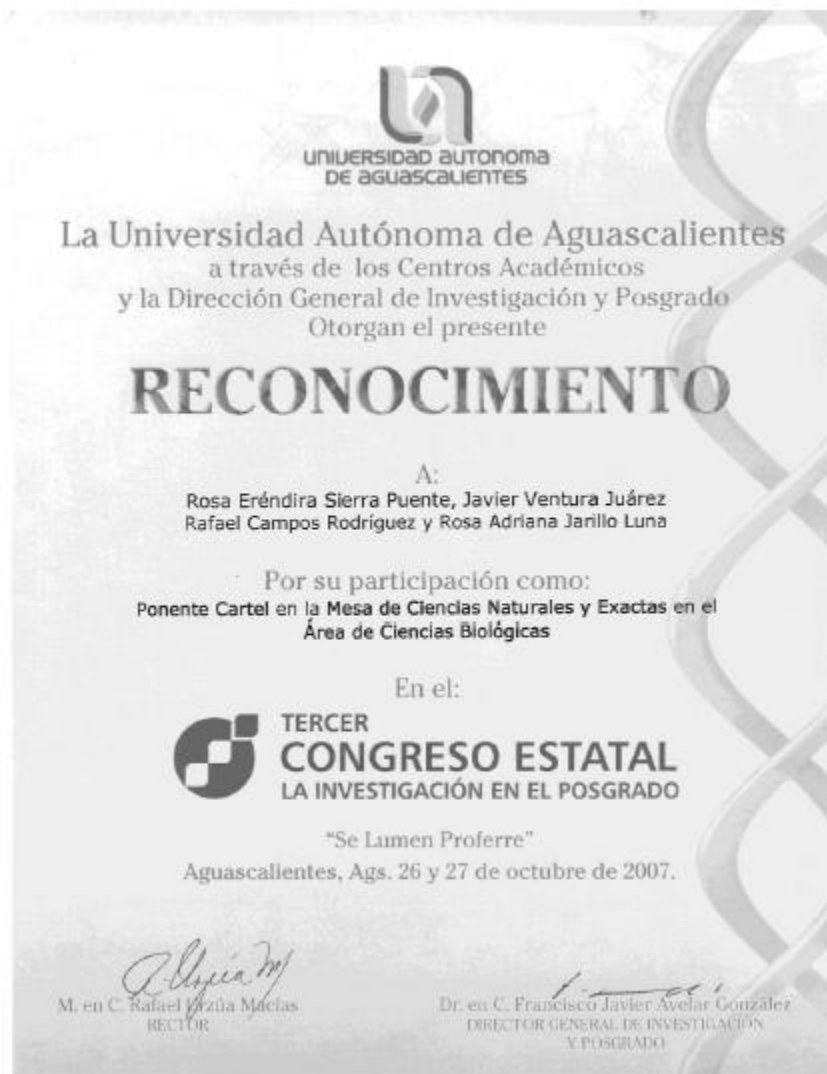
VIII.4 Productos del Proyecto.

Ponente de Cartel en las "JORNADAS ACADÉMICAS DE FISIOLÓGÍA SEMESTRE "B" 2006". En la Facultad de Medicina de la Universidad Juárez del Estado de Durango. En Noviembre del 2006.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



Ponente de Cartel en el TERCER CONGRESO ESTATAL LA INVESTIGACIÓN EN EL POSGRADO. De la Universidad Autónoma de Aguascalientes. En Octubre del 2007.



Participación en el Simposio: "AMIBIASIS" durante el XXXI Congreso Nacional de Histología, en la Escuela Superior de Medicina del IPN. Octubre del 2008.



Publicación: "EXPRESSION OF IMMUNE MODULATOR CYTOKINES IN

HUMAN FULMINANT AMOEBIC COLITIS". *Parasite Immunology*, 2009.
31,384-391.

Parasite Immunology, 2009, 31, 384-391

DOI: 10.1111/j.1365-3024.2009.01118.x

Expression of immune modulator cytokines in human fulminant amoebic colitis

R. E. SIERRA-PUENTE,¹ R. CAMPOS-RODRÍGUEZ,² R. A. JARILLO-LUNA,³ L. MUÑOZ-FERNÁNDEZ,⁴ M. G. RODRÍGUEZ,⁵ M. H. MUÑOZ-ORTEGA⁶ & J. VENTURA-JUÁREZ⁷

¹Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Juárez del Estado de Durango, Durango, México, ²Departamento de Bioquímica, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Distrito Federal, México, ³Departamento de Morfología, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Distrito Federal, México, ⁴Departamento de Patología, Hospital Hidalgo, Aguascalientes, Ags. México, ⁵Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México, ⁶Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México, ⁷Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México

SUMMARY

Human fulminant amoebic colitis (FAC) is characterized by ulceration and inflammation of the colon. The specific mixture of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines may participate in either the host defense or in the pathogenesis of amoebic colitis. Therefore, we studied the expression of IL-8, IL-10, IL-4, TGF- β and IFN- γ in human FAC patients and controls through immunohistochemistry analysis. The number of cells expressing IL-8, IL-4 and IL-10 was significantly enhanced in all FAC samples compared to the control samples. However, the expression of TGF- β in patients was low in the colonic mucosa and high in the lamina propria compared with the control. No expression of IFN- γ was found in the controls or FAC samples. The production of IL-8 by intestinal epithelial cells may play a role in the pathogenesis of amoebic infection, because this cytokine attracts neutrophils, which lead to an inflammatory reaction that results in tissue damage. The predominant expression of the macrophage down-regulating cytokines, IL-4, IL-10 and TGF- β , or the Th2-type immune response could inhibit a cell-mediated immune response, which in turn would facilitate parasite invasion in these tissues.

Keywords cytokines, *Entamoeba histolytica*, human fulminant amoebic colitis

INTRODUCTION

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) causes two major clinical syndromes which present as amoebic colitis and amoebic liver abscess. These infections result in 40–100 thousand deaths worldwide each year (1–3). The clinical syndromes associated with intestinal infection by *E. histolytica* include fulminant amoebic colitis (FAC), an infrequent presentation of amoebic infection that has a very high mortality rate (4). FAC is characterized by inflammation and necrotic ulcerous lesions which extend over large areas. Occasionally these lesions may extend to encompass the entire colon (5,6).

It has been proposed that inflammation, prolonged by an inappropriate immune response, may play a key role in the tissue damage seen in intestinal amoebiasis (7–10). If this is the case, the specific set and proportions of cytokines produced by colonic epithelial cells in response to amoebic infection (9,11–13) are probably important factors that determine whether the inflammatory response eliminates the trophozoites or participates in the pathogenesis of amoebic colitis (7,12). The role of cell-mediated immunity in protection from intestinal amoebiasis has not been well defined (14,15). It is still unresolved whether a type 1 (Th1) or type 2 (Th2) immune response dominates in amoebic colitis. Furthermore, there is a lack of immunohistochemical data in the literature regarding the expression of cytokines in colonic mucosa of patients with amoebic colitis. For these reasons, the aim of this study was to determine the expression of IL-8, a pro-inflammatory cytokine, and various cytokines produced by regulatory T cells (IL-4, IL-10, TGF- β and IFN- γ) in the colons of patients with FAC. Our goal was to gain insights into their role in the pathogenesis of amoebic colitis. Accordingly, the number and distribution of cells that stained positive for

Correspondence: J. Ventura-Juárez, Avenida Universidad 940, Colonia Ciudad Universitaria, Aguascalientes, CP: 20100, Aguascalientes, Mexico (e-mail: jventur@correo.uaa.mx).
Disclosures: None of the authors has potential conflicts of interest, including relevant financial interests in any company or institution that might benefit from this publication.

Received: 21 September 2008

Accepted for publication: 10 March 2009

these cytokines were studied using immunohistochemistry in the colonic mucosa from patients with FAC.

MATERIALS AND METHODS

Tissue samples

Eleven tissue specimens were obtained from patients undergoing surgical resections of the ileum and colon for amoebic lesions. Six control tissue specimens were obtained from individuals undergoing resection of the colon for benign polyps (14). This study was reviewed and approved by the ethical committee of the three hospitals involved as well as by the Universidad Autonoma de Aguascalientes. In addition, the protocol was designed according to the Helsinki Declaration.

Immunohistochemical technique

Specimens were placed in 10% formaldehyde and processed by conventional histological techniques for paraffin sectioning. Six-micron thick slices of normal or infected large intestine specimens were deparaffinized and rehydrated with phosphate-buffered saline (PBS). The activity of endogenous peroxidase was inhibited for 30 min with a 1% H₂O₂ solution in 100% methanol. The specimens were then rehydrated in a graded alcohol series and placed in PBS for 5 min. An antigen-unmasking solution (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) was applied at vapour pressure for 1 min. Next, the samples were washed in PBS for 5 min, incubated in 20% foetal bovine serum (Hydrex Laboratories, Logan, UT, USA) in PBS for 30 min and washed three times PBS with 0.025% for 10 min. The slides of infected and uninfected tissue were then incubated with the primary antibody for 12 h using the following dilutions: 1 : 500 rabbit anti-*E. histolytica* immune serum (developed in our laboratory) (15); 1 : 100 mouse anti-human TGF- β (Chemicon MAB 1032, Chemicon International, Temecula, CA, USA); 1 : 100 mouse anti-human IFN- γ (Pierce M701, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA); 1 : 100 mouse anti-human IL-8 (US Biological 18430-15, US Biological, Swampscott, Massachusetts, USA); 1 : 100 rabbit anti-human IL-10 (Chemicon AB1416); and 1 : 100 Biotin-Rat anti-mouse IL-4 (US Biological Reagent cat: 18426-004). All slides were washed with 0.025% PBS-Tween (PBS-T) for 10 min. Slides were then incubated for 12 h, washed with PBS-T, and incubated with 1 : 100 secondary antibody peroxidase-labelled goat anti-rabbit IgG (Chemicon AP307P); 1 : 100 secondary antibody peroxidase-labelled goat anti-mouse IgG (Hydrex); and Ultra Vision Plus Large Volume Detection System Anti-Polyvalent HRP for 1 h at

room temperature and then for 1 h at 37°C. After incubation, the slides were washed with PBS-T for 10 min, and peroxidase activity was measured with diaminobenzidine for 5 min. Finally, the slides were counterstained for 7 min with 1 : 10 Harris' haematoxylin diluted in distilled water, washed with water, dehydrated in a graded alcohol series, passed twice through xylene and covered with synthetic resin. Control slides were prepared following the same protocol for each antibody, with the exception of the primary antibody being substituted with a nonspecific IgG antibody. Finally, immune-stained cells were counted from five slides for each sample. Five 40x fields were analysed for each slide (viewing each corner and the centre) with the aid of Image Pro-plus imaging software (Image Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), taking into consideration the following parameters: cell size, roundness and reaction colour (+, ++, +++, +++++, progressive reactivity).

Statistical analysis

The count of stained cells for each cytokine from controls and patients samples were expressed as mean $\pm$ SD, and the statistical differences between two means were analysed using the nonpaired Student's *t*-test. All analyses were performed using the statistical program Sigma Stat for Windows version 2.03 (SPSS Inc., Ashburn, VA, USA).

RESULTS

We observed different patterns of damage in the samples of amoebic colitis studied (Figure 1). These patterns included (i) necrotic areas in contact with many *E. histolytica* trophozoites but not surrounded by inflammatory cells, (ii) necrotic areas in contact with *E. histolytica* trophozoites and surrounded by some inflammatory cells and (iii) necrotic areas in contact with *E. histolytica* trophozoites surrounded by many inflammatory cells. In order to gain more insight into the mechanisms leading to each of these patterns, the number and distribution of cells stained for IL-8, IL-10, TGF- β , IL-4 and IFN- γ were studied by immunohistochemistry in the colonic mucosa from patients with FAC.

IL-8

IL-8 was not expressed in the cells of healthy colonic mucosa (Figure 2a). In the *E. histolytica* affected colonic mucosa, neutrophils in the inflammatory infiltrate of the lamina propria (Figure 2b) and lumen expressed IL-8 (Figure 2c and d). It was remarkable that a group of neutrophils in the inflammatory infiltrate distant from the areas with amoebas expressed IL-8. A significant difference was found in the quantitative assessment of IL-8 cell

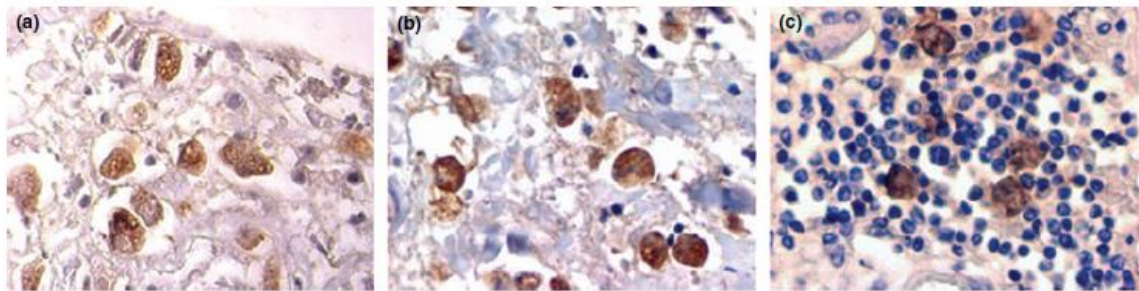


Figure 1 Detection of *Entamoeba histolytica*. All amoebic colitis cases presented *E. histolytica* trophozoites, which were in different aspects: (a) no relation to inflammatory cells, (b) surrounded by a few leukocytes and (c) surrounded by abundant inflammatory cells. Immunoperoxidase reaction, 400X.

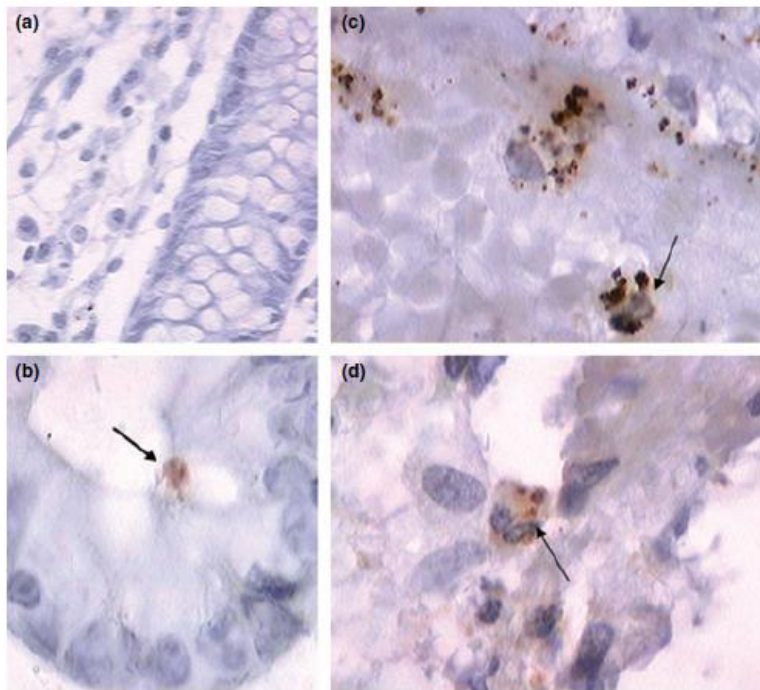


Figure 2 Detection of IL-8. (a) There was no positive reaction in cells of normal colonic mucosa. (b) We observed a positive reaction in scarce number of cells (arrow) in epithelium of the Lieberkühn crypts of the mucosa affected by *E. histolytica*. (c and d) A positive reaction was found in a more abundant number of cells in lamina propria of cases of amoebic colitis (arrows). Immunoperoxidase reaction, 400X.

expression in normal and inflamed colonic mucosa ($P = 0.031$, t -test), as summarized in Figure 3(a).

IL-10

IL-10 was not expressed in one of six samples of healthy colonic mucosa. In the other five samples, the expression of IL-10 was scarce and detected in epithelial cells of the crypts of Lieberkühn (Figure 4a, arrow). IL-10 was intensely expressed in the epithelial cells of colonic mucosa affected by *E. histolytica* (Figure 4b and c). The location and characteristics of the cells that expressed IL-10

indicate they were likely to be endocrine cells. The number of IL-10 positive cells was significantly higher in the mucosa of patients with amoebic colitis than in healthy mucosa ($P = 0.004$, Figure 3b). IL-10⁺ cells were not detected in the lamina propria.

IL-4

While IL-4 was not expressed in the cells of healthy colonic mucosa. The colonic mucosa with amoebic lesions contained numerous cells in the inflammatory infiltrate that were distant from the *E. histolytica* trophozoites. These

Figure 3 Quantifying of cells in normal and amoebic colitis. (a) Only in amoebic colitis cases we found IL-8+ cells. (b) In colonic mucosa affected by *E. histolytica* we detected a high number of epithelial cells hard positive to IL-10 than in epithelial cells in control colon ($P = 0.004$). (c) In lamina propria of samples affected by amoebas we found high number of lymphocytes hard positive to IL-4 than in lamina propria of control colon ($P < 0.001$). (d) We found more epithelial cells (EP) TGF- β + in control colon than in cases of amoebic colitis ($P < 0.001$); however, we detected more lymphocytes TGF- β + in lamina propria from amoebic colitis cases than in lamina propria from control colon ($P = 0.003$).

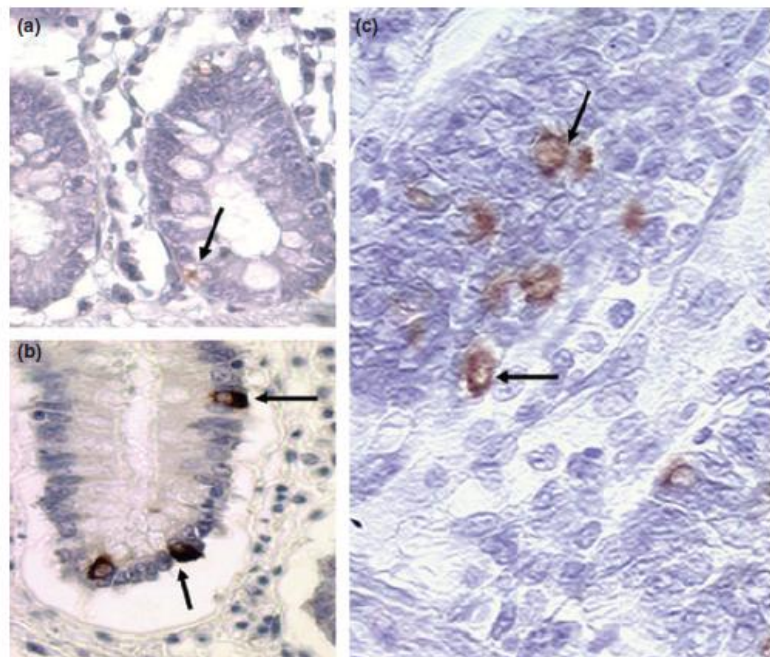
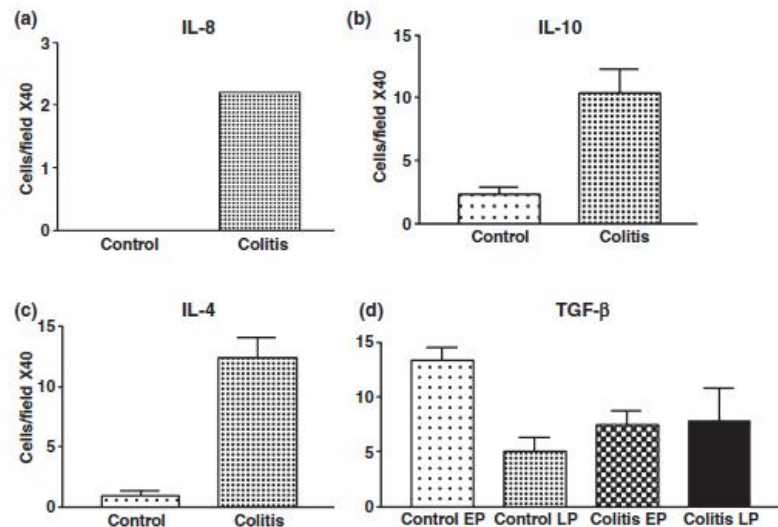


Figure 4 Detection of IL-10. (a) There was a weak reaction (arrow) in some cells of normal colonic mucosa. (b and c) An intensive reaction in epithelial cells of Lieberkühn crypts (arrows) from amoebic colitis samples can be observed. Immunoperoxidase reaction, 400X.

samples were positive for IL-4 (arrows in Figure 5b and c). However, lymphocytes near the amoebas did not express IL-4 (white arrows in Figure 5a). A significant difference was found in the quantitative evaluation of IL-4 positive cells in healthy and inflamed colonic mucosa ($P < 0.001$, Figure 3c).

TGF- β

In the healthy colon samples, TGF- β was expressed in a portion of the epithelial cells (arrow in Figure 6a). In samples from the amoebic colitis patients we observed a significantly higher proportion of epithelial cells positive

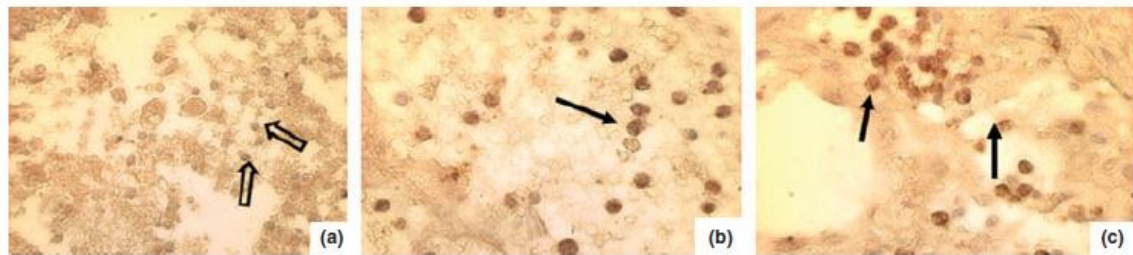


Figure 5 Detection of IL-4. (a) There was no positive reaction for IL-4 on leukocytes near (clear arrows) *E. histolytica* trophozoites. (b) The reaction was positive in leukocytes localized distant from the amoebas (arrow) or (c) in leukocytes (arrows) in inflammatory infiltrate of the amoebic lesions. Immunoperoxidase reaction, 400X.

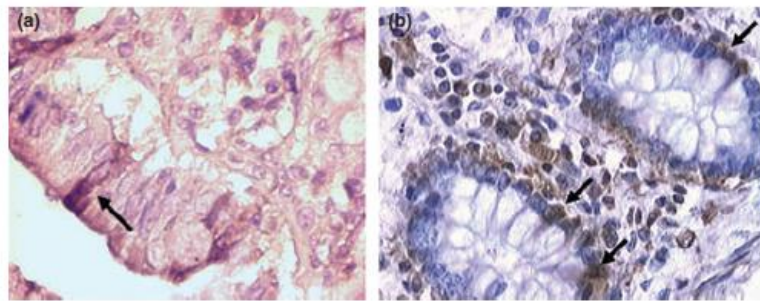


Figure 6 Detection of TGF- β . (a) There were a few epithelial cells with a positive reaction for TGF- β (arrow) in normal colonic mucosa. (b) There were more positive cells for TGF- β (arrows) in the epithelium, as well as abundant positive leukocytes in lamina propria of amoebic colitis samples. Immunoperoxidase reaction, 400X.

for TGF- β (arrows in Figure 6b) than in healthy mucosa samples ($P < 0.001$, t -test). At the same time, we observed an abundance of cells positive for TGF β in the lamina propria (head arrows in Figure 6b), a significantly higher proportion than in the healthy mucosa ($P = 0.003$, t -test).

IFN- γ

IFN- γ was not expressed in any inflammatory cells, whether close to (Figure 7a) or distant from amoebas, although occasionally a positive lymphocyte was observed (arrow in Figure 7c). It is a noteworthy finding that the

vast majority of *E. histolytica* trophozoites cells located in the damaged areas of the colonic mucosa were positively labelled by the IFN- γ antibody (Figure 7a and b). In summary, cells in colonic mucosa from patients with FAC expressed IL-8, IL-10, IL-4 and TGF- β but not IFN- γ .

DISCUSSION

The current study is the first of this type to identify several cytokines of the innate and adaptive immune response that were expressed in the colonic mucosa of patients with FAC. These cytokines are believed to be involved in the pathogenesis of amoebic colitis.

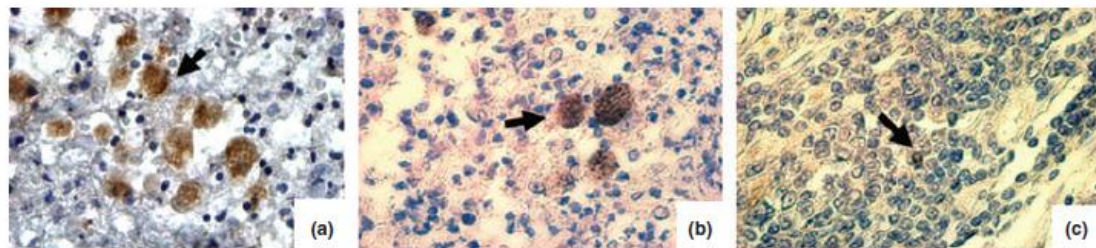


Figure 7 Detection of IFN- γ . (a and b) *E. histolytica* trophozoites were positive for IFN- γ in most amoebic colitis samples. (c) A scarce number of leukocytes were positive to IFN- γ in the inflammatory infiltrate of amoebic lesions. Immunoperoxidase reaction, 400X.

In vitro studies have shown that *E. histolytica* stimulates the production of IL-8 by epithelial cells, a pro-inflammatory cytokine (11,13,16,17). In addition, in a model of disease where human intestinal xenografts were infected with virulent *E. histolytica* trophozoites, IL-8 was produced by intestinal epithelial cells in morphologically normal regions distal to the areas of damage (9). IL-8 likely causes neutrophils to rapidly accumulate at the site of acute *E. histolytica* infection (7,9,13). In a previous study, we showed that neutrophils were abundant in undamaged tissue close to the amoebic ulcer (14). Our current results support the hypothesis that the production of cytokines, such as IL-1 and IL-8, by intestinal epithelial cells could play a central role in the pathogenesis of amoebic infection. It is likely that this occurs by attracting neutrophils that increase inflammation and tissue damage (9).

IL-4 was expressed by numerous lymphocytes in the inflammatory infiltrate near the area of injury, but in none of the lymphocytes that were in the vicinity of the amoebas. According to one report, in individuals infected with *E. histolytica* the expression of IL-4 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was higher when compared to healthy controls (18). In another study, high levels of IL-4 were found in unstimulated blood lymphocytes of individuals infected with a pathogenic species of *E. histolytica* (18). Furthermore, experimental studies in rodents indicate that IL-4 plays a role in the pathogenesis of amoebiasis. For instance, one study shows that intra-caecal amoebic infection in Cross of a Bagg Albino (CBA) mice (a highly susceptible strain) leads to a rapid and sustained upregulation of the Th2 (IL-4+, IL-5+, IL-13+) cytokine response, which inhibits the production of IFN- γ and impairs the elimination of the infection (19). Accordingly, in gerbils the resistance to reinfection is associated with low IL-4 production (20).

IL-4, the canonical Th2 cytokine (21,22), stimulates the development of Th2 cells from naïve CD4+ T cells and functions as an autocrine growth factor for differentiated Th2 cells (22,23). Seeing as IL-4 and IL-10 inhibit Th1 cell differentiation (24,25), they might have the potential to suppress the cell-mediated immunity in human colon invaded by *E. histolytica* to contribute to the survival of the parasite.

IL-10 was intensely expressed in epithelial cells scattered through the epithelium, but not in the lamina propria of colonic mucosa infected by *E. histolytica*. This is the first time that IL-10 has been reported to be expressed in the colonic mucosa of patients with amoebic colitis. A previous report indicates that compared to healthy controls, patients with invasive amoebiasis (colitis and liver abscess) have a higher expression of IL-10 by PBMCs stimulated with amoebic antigens (26). In addition, recent evidence suggests an important role for IL-10 in the innate resis-

tance to *E. histolytica* infection in a murine model of amoebic colitis (27). However, the mechanism by which IL-10 contributes to innate resistance is still unknown. One mechanism has been reported to involve the participation of IL-10 in the stimulation of mucin production by goblet cells in the epithelium (28,29), thus maintaining the protective mucus barrier. Another proposed mechanism is based on the anti-inflammatory effects of IL-10 on epithelial cells and leukocytes (30), but is not likely relevant because there is an intense inflammatory process in the colon invaded by *E. histolytica*. In summary, the synthesis of IL-10 in amoebic ulcers suggests that its activity is insufficient to control intestinal inflammation (31).

The number of cells in the lamina propria that expressed TGF- β was significantly higher in the colonic mucosa from infected patients than in the healthy colonic mucosa. In agreement with our results, another study reported that compared against asymptomatic healthy controls, infected patients with invasive amoebiasis (colitis and liver abscess) have higher expressions of TGF- β in PBMCs stimulated with amoebic antigens (26).

The increased expression of TGF- β , a cytokine with anti-inflammatory properties, could reduce the intense inflammatory process observed in FAC (32). In addition, TGF- β primes macrophages for enhanced expression of the nitric oxide synthase gene for nitric oxide-dependent cytotoxicity against *E. histolytica* (33). Thus, an increased production of TGF- β could contribute to an augmented activation of macrophages that would impede the colonic invasion by the parasite. However, these events apparently did not occur in the colonic mucosa infected by *E. histolytica*. In summary, the mechanisms by which TGF- β could participate in the pathogenesis of amoebic colitis remain uncertain.

It is noteworthy to mention that IFN- γ was not expressed in any inflammatory cells, whether close to or distant from amoebas, but was detected in the majority of the *E. histolytica* trophozoites; in relation to positiveness of trophozoites to monoclonal antibody anti-INF- γ , probably is due to cross-reaction with unknown amoebic molecules, since the monoclonal antibody recognizes amoebic antigens in cell lysate by ELISA and western blot analysis (data not show). Similarly, it has been reported that trophozoites express molecules that are recognized by antibodies to host proteins, such as nitric oxide synthase (34), COX (35,36) and TNF- α (37).

Data obtained from patients, rodent models of amoebiasis, and *in vitro* experiments suggest a role of IFN- γ in the pathogenesis of this disease. Generally in humans, the production of high levels of IFN- γ is associated with resistance to infection (18,26,38). In animal models high levels of IFN- γ are also related to infection resistance (39), while

low levels are associated with a greater susceptibility for intestinal and hepatic amoebiasis (19,40). However, mice genetically deficient for IFN- γ (knockout animals) remain resistant to the infection (32). Evidence from *in vitro* studies supports the important role of IFN- γ in the activation of neutrophils and macrophages for elimination of the parasites (41–45). Hence, it is considered highly probable that IFN- γ provides protection against invasive amoebiasis by activating neutrophils and/or macrophages for amoebicidal activity (26,38–40).

In colonic mucosa of patients with amoebic colitis we did not find the expression of IFN- γ by inflammatory cells, and we previously demonstrated that macrophages are scarce in ulcers (14). Therefore, an important amoebicidal mechanism mediated by activated macrophages is absent in the colonic mucosa of patients with FAC. The mechanism by which the production of IFN- γ is inhibited in the colon is currently unknown but it is likely related to the production of IL-4 and IL-10, which inhibit Th1 cells, the main type of cells that produce IFN- γ .

The predominant expression of IL-10, a macrophage down-regulating cytokine, suggests that cell-mediated immune responses to *E. histolytica* in the colon are inhibited, thus facilitating invasion by the parasites (26). We have reported that in specimens of FAC, the most important effector cells (macrophages) in host defense against *E. histolytica* are scarce (14). It is therefore probable that the low levels of locally produced IFN- γ do not adequately activate the limited macrophages in amoebic lesions.

In conclusion, our current opinion is that immunity to infection is dependent on type 1 cytokine responses characterized by production of IFN- γ (18,20,26,31,46,47), whereas susceptibility to tissue damage by *E. histolytica* is critically dependent on a type 2 cytokine response (controlled by CD4⁺ T-helper type 2 cells that secrete IL-4). Our results support this view, as we found a type 2 cytokine response associated with severe inflammation and extensive tissue damage.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to TLQ Rosa Isela Sandoval-Lozano; Biol. Fabiola del Rocío Villalobos-Gómez and Sandra Luz Martínez-Hernández, for their skilful technical assistant. The authors thank to CONACYT for the grant V49749-M, also to Universidad Autónoma de Aguascalientes, grant Number PIBB07-6N, and to SIP-IPN.

CONFLICT OF INTEREST

No conflicts of interest have been declared.

REFERENCES

- Petri WA Jr & Singh U. Diagnosis and management of amebiasis. *Clin Infect Dis* 1999; **29**: 1117–1125.
- Health Section of the Secretariat of the League of Nations. Amoebiasis. *Wkly Epidemiol Rec* 1997; **72**: 97–99.
- Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 1986; **8**: 228–238.
- Ravdin JI. Amebiasis: human infection by *Entamoeba histolytica*. In Ravdin JI (ed.). *Amebiasis*. New York, Churchill Livingstone, 1988: 495–510.
- Natarajan A, Souza RE, Lahoti NG & Candrakala SR. Ruptured liver abscess with fulminant amoebic colitis: case report with review. *Trop Gastroenterol* 2000; **21**: 201–203.
- Chun D, Chandrasoma P & Kiyabu M. Fulminant amoebic colitis. A morphologic study of four cases. *Dis Colon Rectum* 1994; **37**: 535–539.
- Seydel KB, Li E, Zhang Z & Stanley SL Jr. Epithelial cell-initiated inflammation plays a crucial role in early tissue damage in amoebic infection of human intestine. *Gastroenterology* 1998; **115**: 1446–1453.
- Stanley SL. Pathophysiology of amoebiasis. *Trends Parasitol* 2001; **17**: 280–285.
- Seydel KB, Li E, Swanson PE & Stanley SL Jr. Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infect Immun* 1997; **65**: 1631–1639.
- Seydel KB, Zhang T & Stanley SL Jr. Neutrophils play a critical role in early resistance to amoebic liver abscesses in severe combined immunodeficient mice. *Infect Immun* 1997; **65**: 3951–3953.
- Yu Y & Chadee K. *Entamoeba histolytica* stimulates interleukin 8 from human colonic epithelial cells without parasite-enterocyte contact. *Gastroenterology* 1997; **112**: 1536–1547.
- Kammanadiminti SJ, Dey I & Chadee K. Induction of monocyte chemotactic protein 1 in colonic epithelial cells by *Entamoeba histolytica* is mediated via the phosphatidylinositol 3-kinase/p65 pathway. *Infect Immun* 2007; **75**: 1765–1770.
- Eckmann L, Reed SL, Smith JR & Kagnoff MF. *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. *J Clin Invest* 1995; **96**: 1269–1279.
- Ventura-Juarez J, Barba-Gallardo LF, Munoz-Fernandez L, et al. Immunohistochemical characterization of human fulminant amoebic colitis. *Parasite Immunol* 2007; **29**: 201–209.
- Ventura-Juarez J, Campos-Rodriguez R & Tsutsumi V. Early interactions of *Entamoeba histolytica* trophozoites with parenchymal and inflammatory cells in the hamster liver: an immunocytochemical study. *Can J Microbiol* 2002; **48**: 123–131.
- Kim JM, Jung HC, Im K, Cho YJ & Kim CY. Interleukin-8 gene expression in the human colon epithelial cell line, HT-29, exposed to *Entamoeba histolytica*. *Korean J Parasitol* 1995; **33**: 357–364.
- Sharma M, Vohra H & Bhasin D. Enhanced pro-inflammatory chemokine/cytokine response triggered by pathogenic *Entamoeba histolytica*: basis of invasive disease. *Parasitology* 2005; **131**: 783–796.
- Sanchez-Guillen Mdel C, Perez-Fuentes R, Salgado-Rosas H, et al. Differentiation of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular

- immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 2002; **66**: 731–737.
- 19 Guo X, Stroup S & Houghton E. Persistence of *Entamoeba histolytica* infection in CBA mice owes to intestinal IL-4 production and inhibition of protective IFN- γ . *Mucosal Immunol* 2008; **1**: 139–146.
 - 20 Campbell D & Chadee K. Interleukin (IL)-2, IL-4, and tumor necrosis factor- α responses during *Entamoeba histolytica* liver abscess development in gerbils. *J Infect Dis* 1997; **175**: 1176–1183.
 - 21 Mosmann TR & Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; **7**: 145–173.
 - 22 Lohning M, Richter A & Radbruch A. Cytokine memory of T helper lymphocytes. *Adv Immunol* 2002; **80**: 115–181.
 - 23 Stetson DB, Voehringer D, Grogan JL, et al. Th2 cells: orchestrating barrier immunity. *Adv Immunol* 2004; **83**: 163–189.
 - 24 Jiang H & Chess L. An integrated model of immunoregulation mediated by regulatory T cell subsets. *Adv Immunol* 2004; **83**: 253–288.
 - 25 Fitch FW, McKisic MD, Lancki DW & Gajewski TF. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu Rev Immunol* 1993; **11**: 29–48.
 - 26 Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Malla N & Mahajan RC. Cytokine mRNA expressions in symptomatic vs. asymptomatic amoebiasis patients. *Parasite Immunol* 2005; **27**: 37–43.
 - 27 Hamano S, Asgharpour A, Stroup SE, Wynn TA, Leiter EH & Houghton E. Resistance of C57BL/6 mice to amoebiasis is mediated by nonhemopoietic cells but requires hemopoietic IL-10 production. *J Immunol* 2006; **177**: 1208–1213.
 - 28 Ivory C, Kammanadiminti S & Chadee K. Innate resistance to *Entamoeba histolytica* in murine models. *Trends Parasitol* 2007; **23**: 46–48.
 - 29 Schwerbrock NM, Makkink MK, Van der Sluis M, et al. Interleukin 10-deficient mice exhibit defective colonic Muc2 synthesis before and after induction of colitis by commensal bacteria. *Inflamm Bowel Dis* 2004; **10**: 811–823.
 - 30 Moore KW, De Waal Malefyt R, Coffman RL & O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 683–765.
 - 31 Guo X, Houghton E & Petri WA Jr. Crosstalk at the initial encounter: interplay between host defense and amoeba survival strategies. *Curr Opin Immunol* 2007; **19**: 376–384.
 - 32 Houghton ER, Glembocki DJ, Obrig TG, et al. The mouse model of amoebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2002; **169**: 4496–4503.
 - 33 Lin JY, Seguin R, Keller K & Chadee K. Transforming growth factor- β 1 primes macrophages for enhanced expression of the nitric oxide synthase gene for nitric oxide-dependent cytotoxicity against *Entamoeba histolytica*. *Immunology* 1995; **85**: 400–407.
 - 34 Ventura-Juarez J, Jarillo-Luna RA, Fuentes-Aguilar E, et al. Human amoebic hepatic abscess: in situ interactions between trophozoites, macrophages, neutrophils and T cells. *Parasite Immunol* 2003; **25**: 503–511.
 - 35 Dey I, Keller K, Belley A & Chadee K. Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 13561–13566.
 - 36 Gutierrez-Alarcon A, Moguel-Torres M, Mata-Leyva O, et al. *Entamoeba histolytica*: inflammatory process during amoebic liver abscess formation involves cyclooxygenase-2 expression in macrophages and trophozoites. *Exp Parasitol* 2006; **114**: 154–159.
 - 37 Acevedo JA, Pacheco-Yepes J, Serrano-Luna J, Espinosa-Cantellano M, Tsutsumi V & Shibayama M. Experimental amoebic liver abscess: in vivo localization of TNF- α . *Arch Med Res* 2000; **31**: S98–S100.
 - 38 Haque R, Mondal D, Shu J, et al. Correlation of interferon- γ production by peripheral blood mononuclear cells with childhood malnutrition and susceptibility to amoebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 2007; **76**: 340–344.
 - 39 Seydel KB, Smith SJ & Stanley SL Jr. Innate immunity to amoebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infect Immun* 2000; **68**: 400–402.
 - 40 Lotter H, Jacobs T, Gaworski I & Tannich E. Sexual dimorphism in the control of amoebic liver abscess in a mouse model of disease. *Infect Immun* 2006; **74**: 118–124.
 - 41 Denis M & Chadee K. Human neutrophils activated by interferon- γ and tumor necrosis factor- α kill *Entamoeba histolytica* trophozoites in vitro. *J Leukoc Biol* 1989; **46**: 270–274.
 - 42 Salata RA, Murray HW, Rubin BY & Ravdin JI. The role of gamma interferon in the generation of human macrophages cytotoxic for *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Am J Trop Med Hyg* 1987; **37**: 72–78.
 - 43 Ghadirian E & Kongshavn PA. Activation of macrophages by *Entamoeba histolytica* extracts in mice. *Microb Pathog* 1988; **5**: 63–70.
 - 44 Denis M & Chadee K. Cytokine activation of murine macrophages for in vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect Immun* 1989; **57**: 1750–1756.
 - 45 Ghadirian E & Denis M. In vivo activation of macrophages by IFN- γ to kill *Entamoeba histolytica* trophozoites in vitro. *Parasite Immunol* 1992; **14**: 397–404.
 - 46 Garcia-Zepeda EA, Rojas-Lopez A, Esquivel-Velazquez M & Ostoa-Saloma P. Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis. *Parasite Immunol* 2007; **29**: 679–684.
 - 47 Ivory CP & Chadee K. Activation of dendritic cells by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica* drives Th1 responses in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 2007; **37**: 385–394.

VIII. Glosario

Amibiasis: Enfermedad parasitaria causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. La infección generalmente compromete al colon, pero puede extenderse a otros órganos por vía hematológica, como el hígado, los pulmones y el cerebro.

CD59: también conocido como Inhibidor de membrana de lisis reactiva (MIRL), se une a C9; inhibe la formación del complejo de ataque a la membrana del complemento.

Ciclooxigenasa-2 (COX-2): enzima importante en el metabolismo del ácido araquidónico para producir Prostaglandina E2 entre otras. Se encuentra de manera constitutiva en pulmones de ratas, predominantemente en células musculares lisas de la túnica media de los vasos, en ovario y en útero; no se detecta en la mayoría de los tejidos, pero se puede inducir sus síntesis en altos niveles después de algunas horas de haber sido estimulado el tejido con sustancias proinflamatorias.

Citocinas: Proteínas sintetizadas por muchos tipos de células distintas que intervienen en las reacciones inflamatorias e inmunitarias. Las citocinas son los principales mediadores de la comunicación entre las células del sistema inmunitario.

Complemento: Sistema de proteínas séricas y de la superficie celular que interactúan entre ellas y con otras moléculas del sistema inmunitario para producir efectores importantes de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativa. La vía clásica del complemento se activa por la acción de complejos antígeno-anticuerpo, mientras que las superficies microbianas activan la vía alternativa; ambas consisten en una cascada de enzimas proteolíticas que generan mediadores de la inflamación y opsoninas. Las dos vías conducen a la formación de un complejo terminal común (MAC) que se inserta en la membrana celular y provoca la lisis de la célula. Hay otra vía de activación del complemento, es la vía de lectina que une manosa y en ausencia de anticuerpo, se desencadena por la unión de polisacáridos microbianos con lectinas circulantes.

Defensinas: Péptidos ricos en cisteína que se encuentran en la piel y en los gránulos de los neutrófilos y que actúan como antibióticos de amplio espectro, eliminando una amplia variedad de bacterias y hongos. La síntesis de defensinas aumenta en respuesta a citocinas inflamatorias con IL-1 y TNF.

Factor de crecimiento transformador beta (TGF- β): Citosina producida por los linfocitos T activados, los fagocitos mononucleares y otras células; sus acciones más importantes consisten en inhibir la proliferación y diferenciación de los linfocitos T, inhibir la activación de los macrófagos y contrarrestar los efectos de las citocinas pro-inflamatorias.

Fagocitosis: Proceso por el que determinadas células del sistema inmunitario innato, como los macrófagos y los neutrófilos, ingieren partículas grandes ($>0.5\mu\text{m}$ de diámetro) e incluso microorganismos intactos. La célula rodea la partícula con extensiones de su membrana citoplásmica en un proceso dependiente de la energía y del citoesqueleto; este proceso da lugar a la formación de una vesícula intracelular denominada fagosoma que contiene la partícula ingerida.

Granzima: Enzima serina proteasa que se encuentra en los gránulos de los LTC y los linfocitos NK y que se libera por exocitosis, penetra en las células diana a través de "agujeros" creados por perforinas y escinde proteolíticamente y activa a caspasas que, a su vez, degradan varios sustratos e inducen la apoptosis de la célula diana.

Inmunidad: Protección frente a las enfermedades, en general infecciosas, en la que interviene un conjunto de moléculas, células y tejidos que reciben el nombre de sistema inmunitario. En un sentido más amplio, la inmunidad se refiere a la capacidad para responder a las sustancias extrañas, incluidos microorganismos y moléculas.

Inmunidad Innata: Protección frente a la infección que se basa en mecanismos que existen antes de que aquélla se produzca y que son capaces de responder con rapidez a los microorganismos y de reaccionar de una forma esencialmente igual a distintas infecciones⁹⁹. En realidad son barreras

mecánicas (piel), químicas (sistema del complemento, citocinas) y celulares (neutrófilos y macrófagos, linfocitos NK) para resistir la infección¹².

Inmunohistoquímica: Técnica empleada para detectar la presencia de un antígeno en preparaciones histológicas de tejidos, usando un anticuerpo específico para el antígeno unido a una enzima. La enzima convierte una sustancia incolora en otra insoluble y coloreada que precipita en el lugar donde se encuentra localizado el anticuerpo y, por tanto, el antígeno. La posición del precipitado coloreado, y por lo tanto la del antígeno, en la preparación se observa con un microscopio óptico convencional. La inmunohistoquímica es una técnica habitual en el diagnóstico anatomopatológico y en varios campos de investigación.

Interleucina (IL). Otro nombre para una citocina que se utilizó en un principio para referirse a una citocina elaborada por los leucocitos y que actúa sobre ellos mismos. En la actualidad, el término se ha generalizado acompañado de un sufijo numérico para designar a sustancias definidas estructuralmente como citocinas, con independencia de su origen o lugar de acción.

Interleucina 4 (IL-4): Citocina producida principalmente por el subconjunto T_H2 de linfocitos $CD4^+$ cooperadores, cuyas funciones incluyen la inducción de la diferenciación de las células T_H2 a partir de precursores $CD4^+$ vírgenes, la

estimulación de la síntesis de IgE por los linfocitos B y la inhibición de las funciones de los macrófagos dependientes de IFN- γ .

Interleucina 8 (IL-8): Quimiocina que participa en las reacciones inflamatorias se sintetiza de forma constitutiva en diferentes células en los tejidos. IL-8 atrae neutrófilos. Los neutrófilos y los macrófagos expresan receptores para IL-8 entre otras quimiocinas.

Interleucina 10 (IL-10): Citocina producida por los macrófagos activados y por algunos linfocitos T cooperadores cuya función más importante consiste en inhibir a los macrófagos activados y, por tanto, en mantener el control homeostático de las reacciones inmunitarias innatas y celulares.

Intermediarios reactivos del oxígeno (IRO): Metabolitos muy reactivos del oxígeno, tales como el anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno, producidos por los fagocitos activados. Los fagocitos utilizan los IRO para formar oxihalogenados que dañan las bacterias ingeridas. Los IRO pueden ser liberados por las células y producir una reacción inflamatoria o una lesión del tejido.

Linfocitos citolíticos naturales (NK): Subpoblación de linfocitos derivados de la médula ósea, distintos de los B y T, que intervienen en las respuestas inmunitarias innatas. Destruyen las células infectadas por microorganismos mediante mecanismos líticos directos y a través de la secreción de IFN-

gamma. Los linfocitos NK no expresan receptores de antígenos de distribución clonal como los receptores de Inmunoglobulina G o los Receptores de células T y su activación está regulada por una combinación de receptores de la superficie celular que son estimuladores e inhibidores; estos últimos reconocen a las moléculas del CPH propio.

Linfocitos T intraepiteliales: Linfocitos T que se encuentran en la epidermis de la piel y en los epitelios mucosos y que expresan una diversidad limitada de receptores de antígenos. Algunos de estos linfocitos pueden reconocer productos microbianos, como glucolípidos, asociados a moléculas similares al CPH de clase I no polimorfas. Puede considerarse que los linfocitos T intraepiteliales son células efectoras de la inmunidad innata y su función en la defensa del huésped consiste en secretar citocinas, activar a los fagocitos y eliminar las células infectadas.

Lectina fijadora de manosa (MBL): Proteína plasmática que se une a residuos de manosa de las paredes celulares bacterianas y actúa como una opsonina, favoreciendo la fagocitosis de las bacterias por los macrófagos. Los macrófagos expresan un receptor de superficie para C1q que también puede unirse a MBL e intervenir en la captación de los microorganismo opsonizados.

Macrófago: Célula fagocítica que se encuentra en los tejidos y que procede de los monocitos sanguíneos; tiene funciones importantes en las respuestas inmunitarias innatas y adquiridas. Los macrófagos se activan cuando quedan

expuestos a productos microbianos, como endotoxinas, o a las citocinas de los linfocitos T, como IFN-gamma. Los macrófagos activados fagocitan y destruyen los microorganismos, secretan citocinas proinflamatorias y presentan los antígenos a los linfocitos T cooperadores. Los macrófagos pueden adoptar distintas formas en los diferentes tejidos, entre ellas la microglía del sistema nervioso central, las células de Kupffer del hígado, los macrófagos alveolares del pulmón o los osteoclastos del hueso.

Óxido nítrico: Molécula efectora biológica con una amplia gama de actividades que en los macrófagos actúa como un potente microbicida para destruir los microorganismos ingeridos.

Óxido nítrico sintetasa: Miembro de una familia de enzimas que sintetiza el compuesto vasoactivo y microbicida óxido nítrico a partir de la L-arginina. Los macrófagos expresan una forma inducible de esta enzima cuando se activan por acción de diversos estímulos microbianos o de citocinas.

Perforina: Proteína formadora de poros, homóloga a la proteína C9 del complemento, que se encuentra en forma de monómero en los gránulos de los LTC o los linfocitos NK activados. Los monómeros de perforina se polimerizan en la bicapa de lípidos de la membrana de la célula diana y forman un gran canal acuoso. Este canal puede provocar la lisis osmótica de la célula diana y permite la entrada de enzimas procedentes de los gránulos de los LTC.

Receptor de manosa: Receptor de unión a hidratos de carbono (lectina) que se expresa en los macrófagos y que se fija a residuos de manosa y fructosa de la pared celular de los microorganismos, por lo que interviene en su fagocitosis.

Respuesta inmunitaria: Respuesta colectiva y coordinada a la introducción de sustancias extrañas en el individuo y en la que intervienen células y moléculas del sistema inmunitario.

Técnica de inmunoperoxidasa: Técnica inmunohistoquímica habitual en la que el compuesto utilizado para identificar la presencia de un antígeno en una preparación de tejido es un anticuerpo unido a peroxidasa de rábano. La enzima peroxidasa convierte un sustrato incoloro en un producto marrón insoluble visible con el microscopio óptico.

Trofozoíto: Forma vegetativa de un protozoario capaz de ingerir su alimento y moverse; el término es válido para sarcodinos, flagelados y ciliados; en caso de esporozoarios, es también válido, pero solo cuando el parásito se encuentra dentro del eritrocito y antes de dividir su núcleo.

Vía alternativa de activación del complemento: Vía de activación del sistema del complemento independiente de los anticuerpos que ocurre cuando la proteína C3b se une a la superficie de las células microbianas. La vía alternativa es un componente del sistema inmunitario innato e interviene en

las respuestas inflamatorias a la infección y en la lisis directa de los microorganismos

Vía de la lectina en la activación del complemento: Vía de activación del complemento que, en ausencia de anticuerpo, se desencadena por la unión de polisacáridos microbianos con lectinas circulantes, como MBL. Desde el punto de vista estructural, MBL es similar a C1q y activa al complejo enzimático C1r-C1s (como C1q) o activa a otra serina esterasa denominada serina esterasa asociada a proteína fijadora de manosa. Los restantes pasos de la vía de la lectina, comenzando por la escisión de C4, son iguales a los de la vía clásica.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

IX. Bibliografía

1. Espinosa-Cantellano M, Martinez-Palomo A. (2000). Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev.* 13: 318-331.
2. Walsh, J.A. (1988). Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. P 93-105. In J.I. Ravdin (ed.), *Amebiasis, Human infection by Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y.
3. World Health Organization (1997). Amoebiasis. *Wkly. Epidemiol. Red* 72,97-99
4. Houpt E.R., Glembocki DJ, Obrig TG, Moskaluk CA, Lockhart LA, Wright RL, Seaner RM, Keepers TR, Wilkins TD, Petri WA Jr (2002). The mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4+ T cells. *J Immunol.* 169(8):4496-503.
5. Tsutsumi V., Mena López R., Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A (1984). Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol* 117:81.
6. Cox F.E.G. (2002) History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Reviews.* 15(4);595-612.
7. Chester P, Rodney B, Jung C, Wayne E *Parasitología Clínica de Craig Faust.* 3ª. Edición revisada (2003). Ed Masson Doyma México.
8. Carrada Bravo T. (1989) Invasive amebiasis as a public health problem. *Bol. Med. Hosp Infant Mex.* 46(2):139-48.
9. Escandón [Romero C, García Manzo NT, Escobedo de la Peña J, Hernández Ramos JM, Olvera Álvarez J, Cabral Soto J.](#) (1996) Amebiasis and amebic liver abscess in Mexico: a present-day public health problem. *Rev Gastroenterol Mex.* Oct-Dec;61(4):378-86
10. Ramos_F, Morán P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, DE León Medel C, Melendro EI, Valadez A, Ximénez C. (2005) High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. *Am J Trop Med Hyg.* Jul;73(1):87-91.

11. Instituto de Salud de Aguascalientes. (2007) (<http://www.isea.gob.mx/>).
12. Romero Cabello Raúl (2007). Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas parasitarias. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. 1309-1325. pp 1723
13. Brown H W, Neva F A (1985) Parasitología Clínica. 5ª.edición. Ed. Interamericana.; 32-42. pp 359
14. Ramakrishnan G., Lee, S., Mann, B. J., and Petri, W. A. Jr. (2000). *Entamoeba histolytica*: Deletion of the GPI anchor signal sequence on the Gal/GalNAc lectin light subunit prevents its assembly into the lectin heterodimer. *Experimental Parasitology*. 96, 57–60.
15. Haque R, Mondal D, Duggal P, Kabir M, Roy S, Farr BM, Sack RV, William A. Petri Jr. (2006) *Entamoeba histolytica* infection in children and protection from subsequent amebiasis. *Infect Immun.* Feb;74(2):904-9.
16. McCoy JJ, Mann BJ, Petri WA (1994). Adherence and Cytotoxicity of *Entamoeba Histolytica* or How Lectins Let Parasites Stick Around. *Infection and Immunity*; 62,8:3045-3050.
17. Talamás-Rohana P, Meza I (1988). Interaction between Pathogenic Amebas and Fibronectin: Substrate Degradation and Changes In Cytoskeleton Organization. *The Journal of Cell Biology*. **106**:1787-1794.
18. Tachibana H, Seiji Ihara, Seiki Kobayashi, Yoshimasa Kaneda, Tsutomu Takeuchi, And Yasushi Watanabe(1991). Differences in Genomic DNA Sequences between Pathogenic and Nonpathogenic Isolates of *Entamoeba histolytica* Identified by Polymerase Chain Reaction. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Oct., p. 2234-2239
19. Reed SL, Flores BM, Batzer MA, Stein MA, Stroeheer VL, Carlton JE, Diedrich DL And Torian BE. (1992) Molecular and Cellular Characterization of the 29-Kilodalton Peripheral membrane Protein of *Entamoeba histolytica*: Differentiation between Pathogenic and Nonpathogenic Isolates. *INFECTION AND IMMUNITY*., p. 542-549
20. Que S, Kim SH, Sajid M, Eckmann L, Dinarllo C A, McKerrow JH, Reed S L. (2003) A Surface Amebic Cysteine Proteinase Inactivates Interleukin-18. *Infection and Immunity*; 71(3):1274-1280.

21. 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. and Isibias A.. (2005), The innate immune response to *E. histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. *Parasite Immunology*, 27,127-137.
22. Hetch O., Van Nuland N., Schleinkofer K., Dingley A.,J., (2004). Solution Structure of the Pore-forming Protein of *E. histolytica*. *J. Biol Chem.*, 279(17):17834-17841).
23. Talamás-Rohana P, Schlie-Guzmán MA, Hernández-Ramírez VI, Rosales-Encina JL. (1995). T-cell suppression and selective in vivo activation of TH2 subpopulation by the *E. histolytica* 220-kilodalton lectin. *Infect immune* 63(10):3953-8.
24. Seydel KB, Li E, Swanson PE, Stanley SL Jr (1997). Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infect Immun.* 65(5):1631-9.
25. Rico G, Leandro E, Rojas S, Gimenez JA, Kretschmer RR (2003). The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Parasitol Res.* 90(4):264-7. Epub 2003 Mar 25.
26. Sanchez-Ramirez B, Ramirez-Gil M, Vazquez-Moctezuma I, Ramos-Martinez E, Talamas-Rohana P (2004). *Entamoeba histolytica*: induction of cyclooxygenase-2 expression during amoebic liver abscess formation in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Exp Parasitol.* 106(3-4):119-25.
27. Welsch E. Intestino grueso. Histología / Sobota Welsch. Segunda edición 2008, editorial Médica Panamericana. Pp:380-381.
28. Ouellette AJ., Selsted ME. (1996) Paneth Cell Defensins: Endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J.* 10, 1280-1289.
29. Cunliffe RN., Rose FRAJ, Keyte J., Abberley L, Chan WC., Mahida YR. (2001). Human Defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease. *Gut* 48:176-185.

30. Sepúlveda B, Martínez Palomo A (1984) Amoebiasis in Tropical Geographical Medicine. Warren KS, Mahomoud AAS ed. Mc. Graw-Hill N.Y. pp 305-318.
31. Prathap and Gilman R (1970). The histopathology of acute intestinal amebiasis. A rectal biopsy study. Am. J Pathol. 60: 229-245.
32. Brant H y Pérez-Tamayo R (1970). Amibiasis, La Prensa Medica Mexicana, México, pp 3-7.
33. Eliézer Masliah, Ruy Pérez Tamayo (1984). Nota sobre la histopatología de la amibiasis invasora del intestino grueso. Patología Vol. 22 (3): 233-245.
34. Martínez-Palomo A (1987). The pathogenesis of amoebiasis. Parasitol Today 3(4):111-118.
35. Houpt ER, Glembocki DJ, Obring TG, Moskaluk CA, Lockhart LA, Wright RL., Seaner RM, Beepers TR, Wilkins TD, Petri WA Jr. (2002). The mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4+T cells. *J Immunology*. 169(8):4496-4503.
36. Tsutsumi V, Mena López R. Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A (1984). Cellular basis of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathology* 117:81.
37. Leroy A, Lauwaet T, De Bruyne G, Mareel M (2000). *Entamoeba histolytica* disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers. *Faseb J*, 14:1139-1146.
38. Chadee K., Petri W.A. Innes DJ., Ravdin JI (1987). Rat and Human Colonic Mucins Bind to and Inhibit adherence Lectin of *Entamoeba histolytica*. *The American Society for Clinical Investigation, Inc.* 80:1245-1254.
39. Douglas S, Levine and Rodger C Haggitt. (1997) Chapter 22 Histology for Pathologist. 2d edition. Edited by Stephen S Sternberg. Lippincott-Rayen Publishers Philadelphia.
40. Ragland BD, Ashley LS, Vaux DL and Petri WA (1994). *Entamoeba histolytica*: target cells killed by trophozoites undergo apoptosis which is not blocked by bcl-2. *Exp Parasitol* 79:460-467.

41. Dennis M and Chadee K (1989). Human neutrophils activated by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha kill *E histolytica* trophozoites in vivo. *J. Leukoc Biol.* 46(3):270-274.
42. Lin JY Chadee K (1992). Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal Immunology.* 148 (12):3999-4005.
43. Calderón J and Schreiber RD (1985). Activation of the alternative and classical complement pathways of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immunology.* 50:467-471.
44. Calderón J and Tovar R (1986). Loss of susceptibility to complement lysis in *Entamoeba histolytica*, HM1 by treatment with human serum. *Immunology* 58:467-471.
45. Olivos-García A, Nequiz-Afendaño M, Tello E, Martínez RD, González-Canto A, López-Vancell R, García de León MC, Montfort I, Pérez-Tamayo R (2004). Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. *Exp Mol Pathol.* 77(1):66-71.
46. Kawakami K, Qureshi MH, Koguchi Y, Zhang T, Okamura H, Kurimoto M, Saito A (1999). Role of TNF-alpha in the induction of fungicidal activity of mouse peritoneal exudates cells against *Cryptococcus neoformans* by IL-12 and IL-18. *Cell Immunol.* 193:9-16.
47. Abe K, Harada M, Tamada K, Ito O, Li T, Nomoto K (1998) Early-appearing tumor-infiltrating natural killer cells play an important role in the nitric oxide production of tumor-associated macrophages through their interferon production. *Cancer Immunol Immunother.* 45:225-233.
48. Kammanadiminiti SJ, Mann BJ, Dutil L, Chadee K (2004). Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica*. *FASEB J.* 18(1):155-157. Epub 2003 Nov 20.
49. Tsutsumi V., Martínez-Palomo A., (1988). Inflammatory Reaction in Experimental Hepatic Amebiasis. An Ultrastructural Study. *Am J. of Pathology.* 120(1):112-119.
50. Allison AC, Clark LA (1977). Specific and non-specific immunity. *International Review of Experimental Pathology.* 18, 303

51. Gadirian E., Meerovitch E. (1982) Macrophage requirement for host defense against experimental hepatic amoebiasis in the hamster. *Parasite Immunology*:4, 219-225.
52. Salata RA., Martínez-Palomo A, Murria HW, Canales L, Trevino N., Segovia E, Murphy CF., Ravdin JI (1986): Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune responses effective in vitro against *Entamoeba histolytica*. *J Immunol.* 136:2633-2639.
53. Vohra H, Kaur U, Sharma AK, Bhalla V, Bhasin D (2003). Effective human defense against *E. histolytica*: high amoebicidal activity of lymphocytes and monocytes in amoebic liver abscess patients until 3 months follow-up. *Parasitol Int.* 52(3):193-202.
54. Canto Solís A, Miranda Feria AJ, Medina Martínez J, Terán Ortiz LA, Suárez Sánchez F (1975). Immunological status of patients with amebic hepatic abscess. *Prensa Med. Mex.* 40(9-10):275-81
55. Mastelos D, Lambris JD (2002) Complement: more than a "guard" against invading pathogens?. *TRENDS in Immunology.* 23(10):485-491.
56. Mollnes TE, Song W-Ch, Lambris JD. (2002). Complement in inflammatory tissue damage and disease. *Trends in Immunology.* 23(2):61-63.
57. Jung HCL, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E and Kagnoff MF. (1995). A distinct array of proinflammatory cytokines expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* 95(1):55-65.
58. Gosselin D, Rivest S. (2007). Role of IL-1 and TNF in the brain: twenty years of progress on a Dr. Jekyll/Mr. Hyde duality of the innate immune system. *Brain Behav Immun*, 21(3):281-289.
59. Berkenbosch F, van Oers J, del Rey A, Tilders F, Besedovsky H. (1987). Corticotropin releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science.* 238(4826):524-526.
60. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal cell carcinoma-medical progress. (1996) *N Engl J Med*; 335:865-875
61. Macías C. (1988) Las Interleucinas. *Rev Cubana Hematol Immunol Hemoter* ;4:50-76.

62. Thompson AA and Lotze MT. The cytokine Handbook, 4th ed. Volume 1, Academic Press, 2003. Pp 227-262
63. Tabú DT., Anver M, Oppenheim JJ, Longo L, Murphy WJ. (1996). T lymphocyte recruitment by interleukin-8. IL-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1996,97_1931-1941.
64. Richman-Eisenstat JK, Jorens PG, Hebert CA, Ieki I, Nadel JA. (1993). Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. *Am J Physiol.* 1993,26:L413-L418.
65. Banzal D., Sehgal R., Chawala Y., Malla N., Mahajan R.C. (2005). Cytokine mRNA expressions in symptomatic vs asymptomatic amoebiasis patients. *Parasite Immunology.* 27, 37-43
66. García-Zepeda A., Rojas-López M., Esquivel-Velazquez M., Ostoa-Saloma P. (2007). Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis. *Parasite Immunology.* 29,679-684
67. R&D Systems (2002). 614 McKinley Place NE, Minneapolis. MN 55413, Tel: 1-800-343-7475, (612) 379-2956. Fax (612) 379-6580.
68. Prunier C., Pessah M, Ferrand N, Seo SR, Howe P., Atfi A. (2003) The Oncoprotein Ski Acts as an Antagonist of Transforming Growth Factor-beta Signaling by Suppressing Smad2 Phosphorylation. *J Biol. Chem.*, 278; 28:26249-26257
69. Li MO, Flavell RA (2008) Review. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity.* 28(4):468-476.
70. Sánchez-Ramírez B. and Talamás-Rohana P. (2002). Importancia de las prostaglandinas en la amibiasis hepática. *Salud Pública de México.* 44(3):247-257.
71. Enmert L, Ermet M, Althoff A, Merkle M, Grimminger F, Seeger W. (1998) Vasoregulatory prostonoid generation proceed via cyclooxygenase-2 in noninflammed rat lungs. *J Pharmacol Exp Ther;* 286:1309-1314.

72. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L Bupta RA, Simon LS, van de Putte LBA, Pipsky PE. (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*; 12:1063-1073.
73. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.*;30:97-120
74. Sakamoto C. (1998) Roles of COX-1 and COX-2 in gastrointestinal pathophysiology. *J. Gastroenterol*; 33:618-624.
75. Morham SG, Langenbach R, Liftin CD, Tiano HF, (1995). Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell*; 1995;83_473-482
76. Wang W, Chadee K.(1995) *E. histolytica* suppresses gamma interferon-induced macrophage class II major histocompatibility complex Ia molecule and I-A beta mRNA expression by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *Infect Immun.* 1995; 63(3):1089-1094.
77. Knowles RG, Moncada S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* ;298:249-258.
78. Moncada S, Higos A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl J Med*; 329:2002-2012.
79. Marletta MA (1993). Nitric oxide syntase structure and mechanism. *J Biol Chem*; 268(17):12231-12234.
80. Nathan CF. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB (Fed Am Soc Exp Biol)*; 6:3051-3064.
81. Masagué J, Attisano L, Wrana JL. (1994) The TGF- β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol.*; 4:172-178.
82. Moncada S, Palmer RMJ, Higos A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology ando pharmacology. *Pharmacol Rev*; 43(2):109-141.
83. Schini VB, Vanhoutte PM. (1993) Role of L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle. *Eur Heart J*; 14(1):16-21.),
84. Lin JY, Chadee K (1992). Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 148(12):3999-4005.

85. Lin JY, Seguin R, Keller K, Chadee K.(1994) Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. [Infect Immun.](#) May;62(5):1534-41.
86. Seydel KB, Smith SJ, Stanley SL Jr.(2000) Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. [Infect Immun.](#) Jan;68(1):400-2.
87. Tozer EC; Carew TE. (1997) Residence time low-density lipoprotein in the normal and atherosclerotic rabbit aorta. *Circulation*; 80:208-218
88. Sessa WC, Pritchard K, Seydi N, Wang J, Hintze TH. (1994) Chronic exercise in dogs increases coronary nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res*; 74:349-353.
89. Scout-Burden T, Schini VB, Elizondo E, Junquera DC, Vanhoutte PM. (1992) Platelet-derived growth factor suppresses and fibroblast growth factor enhances cytokine-induced production of nitric oxide by cultured smooth muscle cells. *Circ Res*; 71:1088-1100.
90. Durante W, Schini VB, Kroll MH, Catovsky S, scout-Burden T, White JG, Vanhoutte PM, Schafer AI(1994). Platelets inhibit the induction of nitric oxide síntesis by interleukin-1 β in vascular smooth muscle cells. *Blood*;83:1831-1838.
91. Cushing SD, Borliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parham F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. (1990). Minimally modified low density lipoprotein induce monocyte chemotactic protein I in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5134-5138.
92. Perrella MA, Yoshinguimi M, Fen A, Tsai JC, HieshCM, Kourembanas S, Lee ME. (1994) Transforming growth factor- β 1 but not dexamethasone, down-regulates nitric oxide synthase mRNA after its induction by interleukin- 1 β in rat smooth muscle cells. *J. Biol Chem*; 269:14595-14600.
93. Von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R., Lewis NP, Zhang L, Nakajima M, Kaneda Y, Cooke JP, Dzau VJ. (1995) Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*; 92:1137-1141.).

94. Oulette, A. J., Selsted, M. E. (1996) Paneth cell defensins: Endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEBJ.* 10, 1280-1289
95. Cunliffe RN. (2003) Alpha-defensins in the gastrointestinal tract. *Mol. Immunol*; 40(7):463-467.
96. Wehkamp J, [Fellermann K](#), [Herrlinger KR](#), [Baxmann S](#), [Schmidt K](#), [Schwind B](#), [Duchrow M](#), [Wohlschläger C](#), [Feller AC](#), [Stange EF](#). (2002) Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. [*Eur J Gastroenterol Hepatol.*](#) Jul;14(7):745-52.
97. Noble CL, [Abbas AR](#), [Cornelius J](#), [Lees CW](#), [Ho GT](#), [Toy K](#), [Modrusan Z](#), [Pal N](#), [Zhong F](#), [Chalasani S](#), [Clark H](#), [Arnott ID](#), [Penman ID](#), [Satsangi J](#), [Diehl L](#). (2008) Regional Variation in Gene Expression in the Healthy Colon is Dysregulated in Ulcerative Colitis. [*Gut.*](#) Jun 3.
98. Wehkamp J, Wang G, Kübler I, Nuding S, Gregorieff A, Schanbel A, Kays RJ, Fellerman K, Burk O, Schwab M, Clevers H, Bevins CL, Stange EF. (2007) The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol*; 179(5):3109-3118.
99. Abbas AK APJ. (2002). *Imunología celular y molecular*. Cuarta edición ed. Madrid: Interamericana McGraw-Hill.
100. MacDonald TT. (1999) Effector and regulatory lymphoid cells and cytokines in mucosal sites. *Curr Top Microbiol Immunol*; 236:113-35
101. Diamantstein, T., Klos, M., Gold, D., and Hahn, H. (1981). Interaction between *Entamoeba histolytica* and the immune system. *Journal Immunol.* 126: 2084-2086.
102. Her-Uz-Zaman, Habibullah, Saleem Y (1993). Decreased adenosine deaminase activity in peripheral lymphocytes of patients suffering from amebic liver abscess. *Arch Med Res* 24: 200-204.
103. Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L (2002). How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.* 18(6):272-8.
104. Ventura-Juárez J, Jarillo-Luna RA, Fuentes-Aguilar E, Pineda-Vázquez A, Muñoz- Fernández L, Madrid-Reyes JI. and Campos-Rodríguez R (2003). Human amoebic hepatic abscess: *in situ* interactions between

trophozoites, macrophages, neutrophils and t cells. *PARASITE IMMUNOLOGY*. 25, 503-511.

105. Méndez, I., Namihira, D., Moreno, L. y Sosa, C. (1990). *El protocolo de investigación*. México, D. F. Ed. Trillas, S. A. de C. V.
106. Ventura-Juárez J, Campos-Rodríguez R, Tsutsumi V. (2002). Early interactions of *Entamoeba histolytica* trophozoites with parenchymal cells in the hamster liver: an immunocytochemical study. *Can J Microbiol* 48:123-131.
107. Ventura-Juárez J, Barba-Gallarado LF, Muñoz-Fernández L, et al. (2007). Immunohistochemical characterization of human fulminant amoebic colitis. *Parasite Immunology*; 29:201-209.
108. Yu Y & Chadee K. (1997) *Entamoeba histolytica* stimulates interleukin 8 from human colonic epithelial cells without parasite entocyte contact. *Gastroenterology*; 112:1536-1547.
109. Eckmann L., Reed SL, Smith JR & Kagnoff MF. (1995) *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. *J Clin Invest*;96:1269-1279.
110. Kim JM, Jung HC, Im K, Cho YJ & Kim CY. (1995) Interleukin-8 gene expression in the human colon epithelial cell line HT-29, exposed to *Entamoeba histolytica*. *Korean J Parasitol*; 33:357-346.
111. Sharma M, Vohra H & Bhasin D. (2005) Enhanced pro-inflammatory chemokine/cytokine response triggered by pathogenic *Entamoeba histolytica*: basis of invasive disease. *Parasitology*; 131:783-796.
112. Seydel KB, Li E, Zhang Z and Stanley SL, Jr. (1998). Epithelial cell-initiated inflammation plays a crucial role in early tissue damage in amebic infection on human intestine. *Gastroenterology*; 115: 1446-1453.
113. Sánchez-Guillen, Mdel C, Pérez-Fuentes R, Salgado-Rosas H, et al. (2002) Differentiation of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. *Am J Trop Med Hyg*; 66: 731-737.

114. Guo X, Stroup S and Houpt E. (2008) Persistence of *Entamoeba histolytica* infection in CBA mice owes to intestinal IL-4 production and inhibition of protective IFN- γ . *Mucosal Immunology*; 1:139-146.
115. Campbell D & Chadee K. (1997) Interleukin(IL)-2, IL-4, and tumor necrosis factor-alpha responses during *Entamoeba histolytica* liver abscess development in gerbils. *J Infect Dis*; 175: 1176–1183.
116. Mosmann TR & Coffman RL. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*; 7: 145–173.
117. Lohning M, Richter A & Radbruch A.(2002) Cytokine memory of T helper lymphocytes. *Adv Immunol*; 80: 115–181.
118. Stetson DB, Voehringer D, Grogan JL, et al. (2004) Th2 cells: orchestrating barrier immunity. *Adv Immunol*; 83: 163–189.
119. Jiang H & Chess L. (2004) An integrated model of immunoregulation mediated by regulatory T cell subsets. *Adv Immunol*; 83:253–288.
120. Fitch FW, McKisic MD, Lancki DW & Gajewski TF. (1993) Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu Rev Immunol*; 11: 29–48.
121. Hamano S, Asgharpour A, Stroup SE, Wynn TA, Leiter EH & Houpt E. (2006) Resistance of C57BL / 6 mice to amoebiasis is mediated by nonhemopoietic cells but requires hemopoietic IL-10 production. *J Immunol*; 177: 1208–1213.
122. Ivory C, Kammanadiminti S & Chadee K. (2007) Innate resistance to *Entamoeba histolytica* in murine models. *Trends Parasitol*; 23: 46–48.
123. Schwerbrock NM, Makkink MK, Van der Sluis M, et al. (2004) Interleukin 10-deficient mice exhibit defective colonic Muc2 synthesis before and after induction of colitis by commensal bacteria. *Inflamm Bowel Dis*; 10: 811–823.

124. Moore KW, De Waal Malefyt R, Coffman RL & O'Garra A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*; 19: 683–765.
125. Guo X, Houpt E & Petri WA Jr. (2007) Crosstalk at the initial encounter: interplay between host defense and ameba survival strategies. *Curr Opin Immunol*; 19: 376–384.
126. Lin JY, Seguin R, Keller K & Chadee K. (1995) Transforming growth factor-beta 1 primes macrophages for enhanced expression of the nitric oxide synthase gene for nitric oxide-dependent cytotoxicity against *Entamoeba histolytica*. *Immunology*; 85:400–407.
127. Dey I, Keller K, Belley A & Chadee K. (2003) Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100: 13561–13566.
128. Gutierrez-Alarcon A, Moguel-Torres M, Mata-Leyva O, et al. (2006) *Entamoeba histolytica*: inflammatory process during amoebic liver abscess formation involves cyclooxygenase-2 expression in macrophages and trophozoites. *Exp Parasitol*; 114: 154–159.
129. Acevedo JA, Pacheco-Yeppez J, Serrano-Luna J, Espinosa-Cantellano M, Tsutsumi V & Shibayama M. (2000) Experimental amebic liver abscess: in vivo localization of TNF-alpha. *Arch Med Res*; 31: S98–S100.
130. Haque R, Mondal D, Shu J, et al. (2007) Correlation of interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells with childhood malnutrition and susceptibility to amebiasis. *Am J Trop Med Hyg*; 76: 340–344.
131. Sánchez-Ramírez, B., M. Ramírez-Gil, et al. (2004). "*Entamoeba histolytica*: inducción of cyclooxygenase-2 expression during amoebic liver abscess formation in hamsters (*Mesocricetus auratus*)."
Exp Parasitol 106 (3-4):119-125.
132. Ramírez-Emiliano E., González-Hernández A., et al., (2005). "Expression of inducible nitric oxide synthase mRNA and nitric oxide production during the development of liver abscess in hamster inoculated with *Entamoeba histolytica*." *Curr Microbiol*; 50(6):299-308.

133. Jarillo-Luna RA, Campos-Rodríguez R., Tsutsumi V. (2002) *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factor of resistance. *Exp Parasito*; 101(1):40-56.
134. Elenkave K, Siman-Tov R, Ankri S. (2003). Consumption of L-arginine by *Entamoeba histolytica* L-arginasa (Eh Arg) inhibits amoebicidal activity and nitric oxide production by activated macrophages. *Parasite Immunology*; 25(11-12):597-608
135. Sánchez-Guillen Mdel C, Perez-Fuentes R, Salgado-Rosas H, et al. Differentiation of *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis.
136. Gutiérrez-Kobeh L, Cabrera N, Pérez-Montfort R. (1997). A mechanism of acquired resistance to complement mediated lysis by *Entamoeba histolytica*. [J Parasitol](#). 83(2):234-41.
137. Braga LL, Ninomiya H, McCoy JJ, et al., (1992). Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest*; 90(3):1131-1137
138. Petri WA JR. (2002). The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol* 56:39-64.
139. Ventura-Juárez J., Campos-Rodríguez R., Jarillo-Luna RA., Muñoz-Fernández L., Escario-G-Trevijano JA., Pérez-Serrano J., Quintanar JL., Salinas E., Villalobos-Gómez FR. (2008) Trophozoites of *Entamoeba histolytica* express a CD59-like molecule in human colon. *Parasitol Res*; 104:821-826.
140. Sierra-Puente RE., Campos-Rodríguez R., Jarillo-Luna RA., Muñoz-Fernández L, Rodríguez MG, Muñoz-Ortega MH, Ventura-Juárez J (2009). Expression of immune modulator cytokines in human fulminant amebic colitis. *Parasite Immunology*; 1-8.