



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**Efecto de las sales biliares en la morfología, proliferación y
virulencia de *Entamoeba histolytica***

TESIS

QUE PRESENTA:

Biol. Daniel Peralta Román

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en
Infectómica y patogénesis molecular**

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi

Ciudad de México

Julio 2017

Agradecimiento al CONACYT

Quiero agradecer por el apoyo brindado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a traes de una beca para la realización de estudios de maestría (becario No. 707946).

AGRADECIMIENTOS

Principalmente le quiero agradecer a mi familia por ser el pilar en mi vida y la razón de mi lucha y esfuerzo a diario, a mi madre que es el motor de mi vida y que gracias a ella he logrado muchas cosas, siempre está alentándome a hacer las cosas correctamente, es la persona que me motiva e inspira, está detrás de mí en cada decisión que tomo y siempre estará ahí en cada derrota de la vida para levantarme. A mi padre quien es mi ejemplo a seguir, me enseñó a tener siempre los pies en la tierra aunque ya no este físicamente con nosotros lo llevamos en el corazón. A mi hermano Roberto por su apoyo y platicas que me recuerdan los mejores momentos de mi vida.

A mis tíos, primos, sobrinos gracias por su apoyo y por su cariño que me han brindado todos estos años, ustedes también forman parte de este logro.

En especial quiero agradecer al Dr. Victor Tsutsumi por ser una persona tan agradable y que me brindo su amistad. gracias por aceptarme en su grupo de trabajo y ser un ejemplo a seguir tanto como investigador como persona, gracias por todos los consejos que me ha dado, admiro mucho su humildad y ganas de ayudar a las demás personas sin importar de donde vengan. También quiero agradecer a Silvia Galindo quien fue como una madre en mi estancia en el laboratorio, gracias por todos los consejos y platicas amenas que tuvimos, por las preocupaciones, que sin su ayuda este trabajo no hubiera salido adelante. A Karla Gil quien de igual manera me ayudo bastante en este trabajo, gracias por todas las risas y pláticas que tuvimos.

A mis compañero de laboratorio Karlita, Luz y Suilma que siempre me aconsejaron y me brindaron su amistad.

A mis amigos que de igual forma han sido una parte muy importante de esto, gracias por nunca dejarme caer en esos momentos difíciles en mi vida, por esos ánimos y esa confianza que no encuentras en otro lado, mis hermanos de otra madre gracias. Me llevaría más de un párrafo escribir sus nombres ustedes saben quiénes son, personas que nunca se marcharon a través del tiempo, a pesar de los desacuerdos y sobre todo a pesar de la distancia siempre estuvieron a mi lado.

A mis asesores el Dr. Adolfo Martínez Palomo y el Dr. Jose Luis Rosales, gracias por formar parte de este proyecto y en especial quiero agradecerle a la Dra. Bibiana Chávez quien le agradezco todo lo que me enseñó y esa amabilidad que no se ve hoy en día. Gracias por tener la paciencia de ayudarme y sin duda un ejemplo a seguir.

Indice	4
Indice de figuras	6
Resumen	8
I. Introducción	10
1.1 <i>Entamoeba histolytica</i>	11
1.2 Epidemiología	13
1.3 Ciclo de vida	14
1.4 Mecanismos de patogenicidad	16
1.4.1 Adhesión	16
1.4.2 Citotoxicidad	17
1.4.2.1 Dependiente de contacto	17
1.4.2.2 Independiente de contacto	18
1.4.2.3 Proteasas de cisteína	18
1.4.2.4 Amebaporo	19
1.4.3 Fagocitosis	20
1.5 Amibiasis intestinal	22
1.6 Amibiasis hepática	22
1.7 Hígado	25
1.8 Vesícula biliar	27
1.9 Bilis	29
1.10 Ácidos biliares	30
1.10.1 Síntesis de ácidos biliares	30
1.10.2 Síntesis de ácidos biliares primario	32
1.10.2.1 Vía clásica	32
1.10.2.2 Vía alterna	33
1.10.3 Ácidos biliares secundarios	33
1.10.4 Circulación enterohepática de las sales biliares	34
II. Antecedentes	36
III. Justificación	41
IV. Hipótesis	42

V. Objetivo general	42
5.1 Objetivos particulares	42
VI. Material y métodos	43
6.1 Parásitos	43
6.2 Sales biliares	43
6.3 Ensayo de proliferación	43
6.4 Microscopia electrónica de transmisión	44
6.5 Microscopia electrónica de barrido	44
6.6 virulencia de <i>E. hitolytica</i>	44
6.6.1 Efecto citopático	45
6.6.2 Producción de AHA en hámster	45
VII. Resultados	46
7.1 Efecto de las sales biliares en la proliferación y viabilidad de <i>E. hitolytica</i>	46
7.2 Efecto de las sales biliares en la morfología y ultraestructura de <i>E. hitolytica</i>	53
7.3 Efecto de las sales bliares en la virulencia de <i>E. hitolytica</i> <i>in vitro e in vivo</i>	57
7.3.1 Efecto citopático	57
7.3.2 Efecto de las sales biliares en la formación de absceso hepático amibiano	61
VIII. Discusión	65
IX. Conclusiones	72
X. Bibliografía	73

Indice de figuras

Figura 1. Estadios del parásito <i>E. histolytica</i> .	12
Figura 2. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .	15
Figura 3. Amibiasis intestinal.	22
Figura 4. Absceso hepático amibiano.	24
Figura 5. Posición anatómica del hígado.	25
Figura 6. Lobulillo hepático.	27
Figura 7. Vesícula biliar.	28
Figura 8. Estructura de los ácidos biliares.	30
Figura 9. Síntesis de ácidos biliares.	31
Figura 10. Diagrama de la circulación enterohepática.	35
Figura 11. Efecto amebicida de las sales biliares y agentes surfactantes en un cultivo axénico de <i>E. histolytica</i> .	36
Figura 12. Influencia de las sales biliares en el tiempo de generación (h) de <i>Giardia</i> en medio TYI-S.	39
Figura 13. Incremento de la invasión de los esporozoitos a las células HCT-8, inducido por las sales biliares	39
Figura 14. Efecto del glicolato de sodio (GC) en la viabilidad de <i>E. histolytica</i> .	47
Figura 15. Efecto del glicolato de sodio (GC) en la proliferación de <i>E. histolytica</i> .	48
Figura 16. Efecto del desoxicolato de sodio (DC) en la viabilidad de <i>E. histolytica</i> .	49
Figura 17. Efecto del desoxicolato de sodio (DC) en la proliferación de <i>E. histolytica</i> .	50
Figura 18. Efecto del litocolato (LC) en la viabilidad de <i>E. histolytica</i> .	51
Figura 19. Efecto del litocolato (LC) en la proliferación de <i>E. histolytica</i> .	52
Figura 20. Efecto de las sales biliares en la morfología de <i>E. histolytica</i> .	54
Figura 21. Efecto de las sales biliares en la ultraestructura de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .	55

Figura 22. Efecto de las sales biliares en la virulencia de <i>E. histolytica in vitro.</i>	58
Figura 23. Efecto citopático de <i>E. histolytica</i> en células CaCo 2.	59
Figura 24. Efecto de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> tratados con sales biliares sobre células CaCo2 durante 30 min.	61
Figura 25. Efecto de las sales biliares en la formación de absceso hepático amibiano.	62
Figura 26. Cortes histológicos de los hígados tratados con las diferentes sales biliares.	64

Resumen

Entamoeba histolytica es el agente etiológico de la amibiasis. Es una enfermedad que afecta el intestino en donde se lleva a cabo el ciclo de vida de la amiba. En el microambiente intestinal existen diferentes moléculas que interactúan con los trofozoítos, favoreciendo o no el desarrollo de la enfermedad. Las sales biliares son moléculas presentes en el intestino y participan en la digestión y absorción de las grasas. También, se ha estudiado los efectos que tienen sobre diferentes tipos celulares e incluso algunos microorganismos. En el caso de *E. histolytica* se conoce poco del el papel de las sales biliares sobre este parásito, por lo que el objetivo de este proyecto fue el analizar los efectos de las sales sobre *E. histolytica*. Se probaron tres sales biliares a diferentes concentraciones: Glicolato de sodio, desoxicolato de sodio y el litocolato. Las concentraciones más altas utilizadas de las tres sales biliares mostraron efecto sobre la viabilidad de los trofozoítos. Se determinó que los trofozoítos incubados con GC 400 μM y LC 100 μM , a las 48 h tenían efecto sobre la proliferación, el CG inhibía el crecimiento y el LC lo estimulaba, La microscopia óptica no mostró cambios significativos en los trofozoítos tratados con las diferentes sales. Sin embargo, a nivel ultraestructural se observaron cambios estructurales de los trofozoítos. El DC (50 μM) produjo vacuolas citoplásmicas grandes con contornos irregulares y con contenido granuloso. *In vitro* las sales biliares afectaron la virulencia de la amiba, DC y el LC aumentaban el efecto citopático sobre la línea celular CaCo2 y GC lo disminuía. En los ensayos *in vivo* en el modelo de absceso hepático amibiano en hámster, se produjo un exceso en las dimensiones de las lesiones macroscópicas, que no permitió determinar las diferencias entre los grupos. Sin embargo, el análisis histológico sugiere la existencia de cambios en las lesiones granulomatosas en el hígado, que requieren de un análisis más detallado. Debido a que estos últimos resultados *in vivo* no han sido concluyentes, sugieren la necesidad de establecer en el futuro un modelo que permita el análisis del daño a tiempos más tempranos. Los resultados de este trabajo sugieren que se siga estudiando el efecto de las sales biliares, ya que podrían ser un factor importante para el desarrollo o no de la enfermedad amibiana.

Abstract

Entamoeba histolytica is the etiologic agent of human amebiasis, it is a disease that affects the intestine where the life cycle of ameba is carried out. The intestinal microenvironment contains different molecules that interact with the trophozoites, producing either a favorable or unfavorable conditions to the parasite to produce amebic disease. Bile salts are molecules present in the intestine and participate in the digestion and absorption of lipids. Additionally, it is known that bile acids has other effects in different cell types, including microorganisms. The role of salt acids in *E. histolytica* is poorly understood and currently there are only few studies; therefore, the main objective of this project was to evaluate the effects of different bile salts on *E. histolytica* trophozoites. We used three different bile salts at various concentrations: glycolate of sodium, desoxicholate of sodium and lithocholic acid. The high concentrations of bile salt showed an effect on the viability of the trophozoites. It was determined that trophozoites incubated with GC 400 μM and LC 100 μM at 48 h, showed an effect on proliferation, while GC inhibited growth, LC stimulated it. Light microscopy analysis did not show significant morphological changes in the trophozoites treated with the different bile salts. However, the electron microscopy studies displayed some structural changes in the trophozoites. DC 50 μM produced large cytoplasmic vacuoles outlined with irregular membranes and containing granular content. In vitro studies using CaCo2 cell line showed changes in the virulence of amebas, so DC and LC increased the cytopathic effect on the cell line, while GC decreased it. In the in vivo test using the amebic liver abscess in hamsters, the different trophozoites produced an extensive macroscopic lesions that did not allow to determine differences in the extension of lesions between the groups. However, preliminary histological analysis suggested the existence of changes on the granulomatous lesions in the liver tissues, further detailed analysis of these lesions will be required to determine the exact role of these inflammatory reactions. The use of an in vivo model that allows the analysis of liver damage at earlier stages may be required. The results of this work constitute the bases for more studies related to determine the exact role of bile salts during the development of amebiasis.

I. Introducción

Entamoeba histolytica es el agente causal de la amibiasis humana, una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en países en vías de desarrollo (Walsh, 1986). Hay estudios en los cuales se reporta que aproximadamente 500 millones de personas en todo el mundo está infectada, de los que un 90% son asintomáticos y 10 % desarrollan manifestaciones clínicas (50 millones de personas) ocasionando aproximadamente 100 000 muertes anuales. Las manifestaciones clínicas (casos sintomáticos) más comunes son la amebiasis intestinal o disentería que se caracteriza por la invasión de la mucosa y destrucción del tejido intestinal. De las formas extraintestinales, se considera que el absceso hepático amibiano es el más frecuente (Walsh, 1986, OMS, 1997, Gilchrist y Petri, 2000)

En México sigue siendo un problema de salud pública y una de las causas principales es el bajo nivel socioeconómico de gran parte de la población, que vive en pobreza y por lo tanto se derivan factores como: altos niveles de desnutrición, falta de infraestructura sanitaria, la diversidad y falta de higiene en el manejo de los alimentos que consumen, los malos diagnósticos e ignorancia sobre el tema. Todo lo anterior forma parte de algunos de los factores que podrían estar influyendo en que la infección por *Entamoeba histolytica* no se haya erradicado en nuestro país (Petri *et. al.*, 2000; Ximénez *et. al.*, 2009).

Para el estudio de la amibiasis existen diferentes aspectos que se deben considerar, tales como: factores del propio parásito, factores del hospedero y factores ambientales. La virulencia de la amiba está generalmente relacionada con la capacidad de destruir tejido a través de la adherencia, muerte de la célula huésped causada por la citotoxicidad y la fagocitosis. Actualmente se ha descrito un proceso similar al de la fagocitosis denominado trogocitosis (Faust y Guillen, 2012; Ralston *et al.*, 2014 fenómeno que difiere poco de los procesos o mecanismos ya descritos hace tiempo. Algunas características del hospedero como respuesta inmune innata y adaptativa, el microambiente intestinal, y estado de nutrición pueden estar influyendo en el proceso de invasión (Faust y Guillen, 2012). Otro de los factores de

riesgo son los ambientales como: la contaminación por aguas negras de los cuerpos de agua y redes de agua potable, el uso de materia fecal como fertilizante y el manejo de alimentos por portadores asintomáticos, quienes eliminan quistes infectivos.

1.1 *Entamoeba histolytica*

E. histolytica es un parásito unicelular eucariota de la clase Rhizopoda y del género *Entamoeba*, el cual es comensal del intestino grueso exclusivo del hombre y de ciertos primates en cautiverio, que en ocasiones invade la mucosa intestinal y diseminarse por vía hemática Fue descubierto por Losch en 1875 en un paciente con un cuadro diarréico crónico (Pumarola, 1991, Pérez-Tamayo, 2006). *E. histolytica* presenta dos formas: trofozoítos y quistes, los cuales representan la forma invasiva e infectante, respectivamente.

Los trofozoítos o forma móvil es extraordinariamente pleomorfo, ya que su aspecto y movilidad están influidos por cambios en el microambiente en el que se encuentra (pH, potencial redox, osmolaridad). El trofozoítos se multiplica por fisión binaria, su habitat comprende la luz y pared del colon y mide aproximadamente 20-40 micrómetros, tiene un núcleo y un exoplasma que forma pseudopodos y contiene pocos organelos, no posee mitocondrias, retículo endoplásmico ni aparato de Golgi (Pumarola, 1991, WHO, 1997, Perez-Tamayo, 2006). Existen formas pequeñas que corresponden probablemente a las no invasivas que algunos autores las refieren como forma minuta o trofozoítos de la luz intestinal, estas formas se encuentran habitualmente en los casos asintomáticos. Los trofozoítos de mayor tamaño son las formas invasivas o trofozoítos tisulares, los cuales poseen en el endoplasma restos celulares y hematíes y son los que causan la amibiasis invasora (Pumarola, 1991).

El quiste es redondo u oval, están rodeados de una gruesa capa de quitina por lo cual lo hace resistente a los jugos gástricos y otros factores del medio ambiente, puede presentar de 1 a 4 núcleos dependiendo la fase de maduración en la que se encuentre, la fase madura presenta 4 núcleos (los cuales son los quistes infecciosos) y tiene un diámetro de 10-16 micrometros (Pumarola, 1991; WHO, 1997; Pérez-Tamayo, 2006).

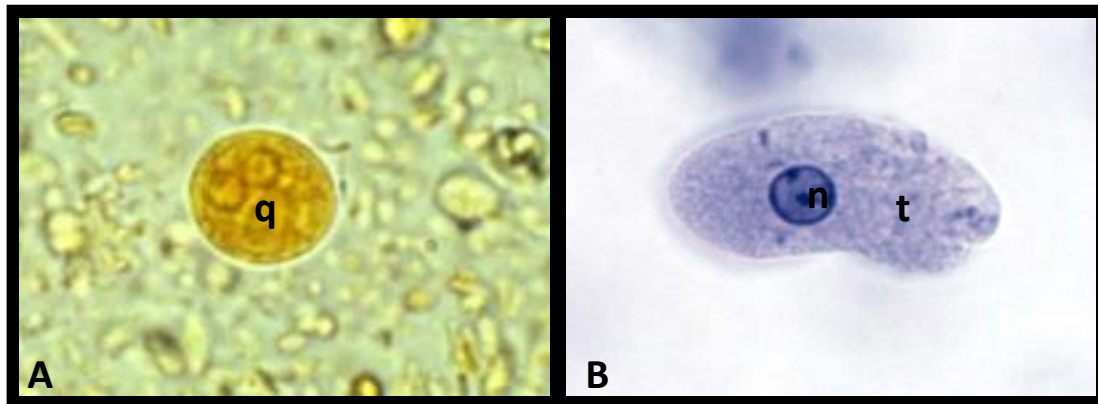


Figura 1. Estadios del parásito *E. histolytica*. El parásito *E. histolytica* presenta 2 estadios A) Quiste en muestra fecal. B) Trofozoíto de *E. histolytica*. Tinción con azul de metileno.

Además de *E. histolytica*, pueden existir varias especies de amibas que habitan en el tracto gastrointestinal del humano, aunque se considera que solo *E. histolytica* es patógena para el ser humano (Zlobl, 2001). *Entamoeba dispar* es otra de las especies que se pueden encontrar en el intestino del humano y por el hecho de compartir características morfológicas similares con *E. histolytica*, se llegó a pensar que eran la misma especie, pero mediante estudios bioquímicos, inmunológicos y genéticos realizados por Diamond y Clark (1993), se confirmó que eran dos especies distintas. *E. histolytica* que causa invasión intestinal y extraintestinal mientras que *E. dispar* no tiene la capacidad de invadir tejido. Sin embargo, en el 2010 se reportó un caso en el cual se aisló una especie de *E. dispar* de un paciente con absceso hepático amibiano (Ximénez, 2010). Otra amiba que morfológicamente es idéntica a *E. histolytica* y que se ha reportado que puede habitar en el intestino del humano es *E. moshkovski* con una alta prevalencia y que se considera como una amiba no patógena (Haque *et al.*, 1998; Ali *et al.*, 2003). En la actualidad hay reportes en los cuales se ha asociado esta amiba con diarrea en infantes (Shimokawa *et. al.*, 2012). Debido a que existen amibas morfológicamente idénticas se ha generado un problema en el momento de hacer el diagnóstico, afectando así los datos epidemiológicos sobre los casos de infecciones por *E. histolytica* (WHO, 1997, Ximénez *et. al.*, 2009). Para poder identificar correctamente las diferentes especies de amibas es necesario realizar pruebas

moleculares sensibles. Específicamente se han desarrollado técnicas de PCR para el diagnóstico diferencial de estas amibas en las cuales fue posible detectar cantidades muy pequeñas de DNA (10-20 pg) en muestras fecales (Hamzah *et al.*, 2006; Rivero *et al.*, 2013) lo cual servirá para mejorar el diagnóstico y epidemiología de la amibiasis.

1.2 Epidemiología

La amibiasis es una infección cosmopolita la cual es causada por el parásito *E. histolytica*, la ingesta de comida y agua contaminadas por quistes, así como el contacto fecal-oral son las formas más comunes de infectarse, en países en vías de desarrollo la transmisión es más común por agua ya que no es tratada adecuadamente. El parásito *E. histolytica* es endémico de áreas tropicales y subtropicales como: México, América central, Sudamérica, Asia, África e islas del pacífico. La amibiasis se ha extendido más allá de las regiones donde es endémica, convirtiéndose en la tercera causa más común de diarrea en viajeros en el mundo (Marie y Petri, 2014). En la actualidad la epidemiología de la amebiasis ha sufrido grandes cambios desde la confirmación de la cepa Laredo como *E. moshkovskii* y la separación de las especies *E. histolytica* y *E. dispar* (Clark y Diamond 1991, 1993), ya que estas tres amibas son morfológicamente idénticas y solamente haciendo estudios muy sensibles se puede hacer un diagnóstico adecuado.

En México la amibiasis es una de las 20 causas de morbilidad más comunes estando en la posición 15 en el 2015, esta morbilidad ha bajado en los últimos años comparándola con la del 2007 en donde la amibiasis ocupaba la 6ª. posición (Ximénez *et. al*, 2009, DGE, 2015). La Dirección General de Epidemiología en México reportó en 2015 que la mayoría de los casos de amibiasis intestinal ocurre en niños menores de 5 años.

1.3 Ciclo de vida

El ciclo biológico de *E. histolytica* inicia cuando el humano ingiere agua o alimentos contaminados con quistes del parásito que provienen de las heces de pacientes infectados. Los quistes tienen la capacidad de permanecer viables hasta 8 días en heces, agua, suelo, también son capaces de resistir la acción de los jugos gástricos y enzimas digestivas e incluso sobreviven a las concentraciones de cloro que se usan para purificar agua; por lo tanto, lavar los alimentos con agua clorada no protege contra la infección por quistes de *E. histolytica*. Una vez que los quistes sobreviven al ácido del estómago, viajan a través del intestino delgado y en el íleon terminal o en el inicio del colon ocurre el desenquistamiento, que es una serie de transformaciones que los convierten en trofozoítos. Cuando los trofozoítos se encuentran en el intestino grueso (colon) comienzan a proliferar y algunos se transforman en quistes, los que al eliminarse con las heces están listos para comenzar de nuevo su ciclo biológico (Pérez-Tamayo 2006; Olivos *et al.*, 2011; Pumarola 1991; Stanley, 2003). Los trofozoítos también pueden eliminarse por las heces pero éstos se destruyen al estar fuera del organismo (hospedero). Esto ocurre en la mayoría de los casos, resultando ser infecciones asintomáticas.

En algunos casos los trofozoítos estando en el lumen del intestino del humano pueden llevar a cabo procesos de adhesión y destrucción del epitelio del colon, iniciando así la invasión del tejido con la posibilidad de invadir otros órganos, principalmente el hígado, esto a través del sistema portal, que conecta el intestino con el hígado, aunque también puede diseminarse hacia otros órganos como pulmones y cerebro. (Haque *et al.*, 2003).

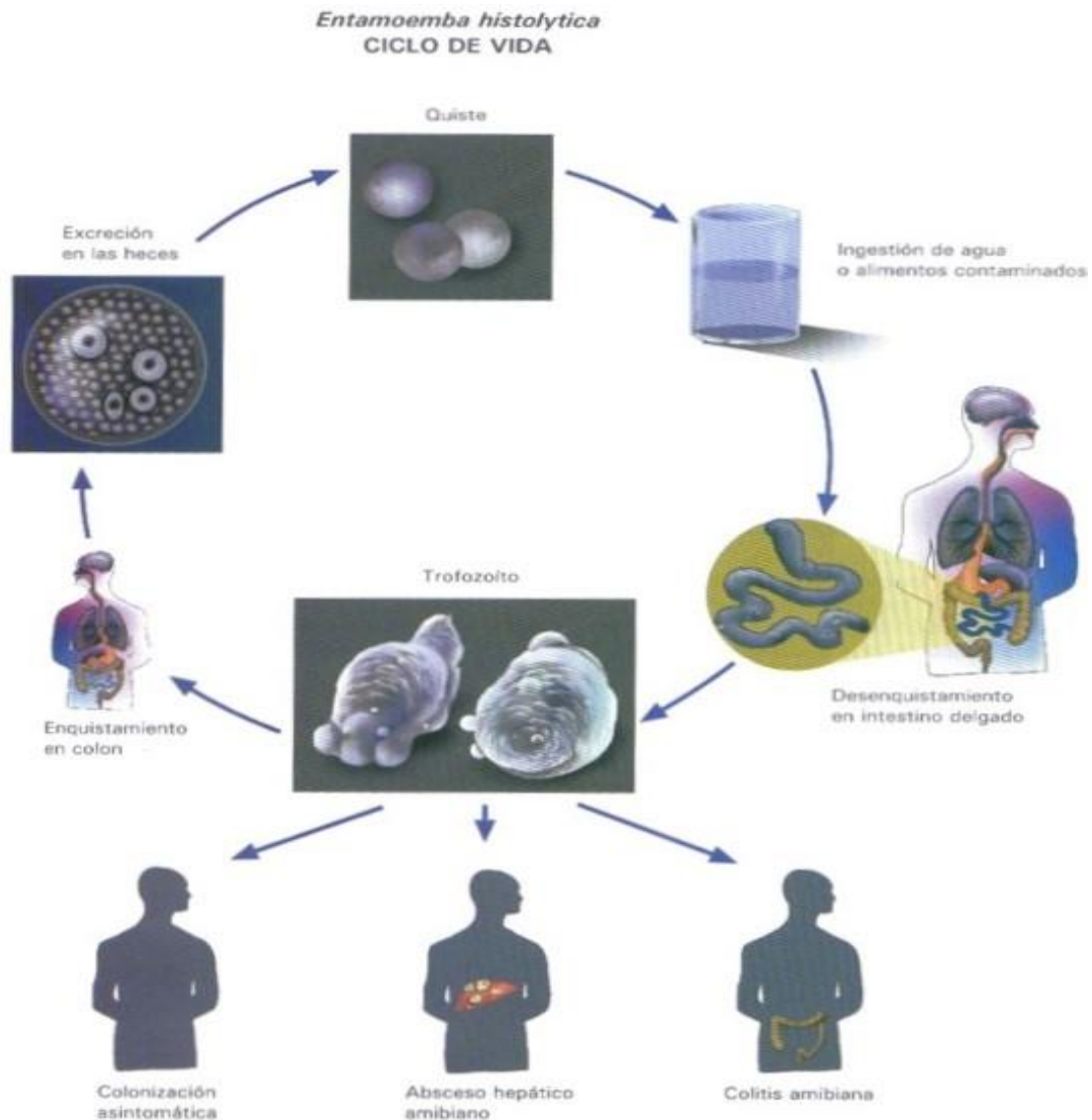


Figura 2. Ciclo de vida de *E. histolytica*. El ciclo comienza con la ingesta de quistes que se encuentran en agua o alimentos. Los quistes viajan por todo el intestino y en la parte terminal del íleon y el inicio del colon comienza a desenquistarse, liberando trofozoítos que se multiplican en el intestino grueso. Los trofozoítos pueden estar en el intestino como comensal causando una colonización asintomática que son el 90 % de los casos. Aproximadamente en el 10 % de las infecciones los trofozoítos son capaces de invadir la mucosa intestinal causando lo que llamamos colitis amibiana o amibiasis intestinal. Los trofozoítos pueden diseminarse vía hematogena hacia otros órganos como el hígado, pulmones, cerebro, siendo el primero el más común de lo que se conoce como amibiasis extraintestinal. Después de que los trofozoítos se hayan multiplicado en el intestino grueso comienzan a enquistarse para así ser liberados al exterior junto con las heces e iniciar de nuevo su ciclo biológico (imagen tomada Perez-Tamayo, 2006).

1.4 Mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica*

La amibiasis es una enfermedad multifactorial en donde la amiba invade la barrera intestinal, resiste y elude la respuesta inmune del hospedero, destruye el tejido y migra a distintos microambientes. Estos procesos no son el resultado de la actividad de un solo factor de virulencia, si no del conjunto de varios. La patogenicidad de la amiba se le atribuye a distintos factores como: la capacidad de adhesión, el daño a las membranas celulares contacto-dependiente, fagocitosis, resistencia al sistema inmune del hospedero y la expresión de moléculas que participan en los diferentes mecanismos, como proteasas de cisteína, amebaporos (péptidos formadores de poros), colagenasas, fosfolipasas. (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000; Trejo y Castano, 2009; Faust y Guillen, 2012).

1.4.1 Adhesión

El primer paso en el proceso de invasión intestinal es la penetración de la mucosa intestinal en donde los trofozoítos usan moléculas de su superficie llamadas adhesinas para adherirse a las mucinas del colon, facilitando así la colonización del intestino grueso. Dentro de las principales adhesinas se encuentra la lectina Gal/GalNac (Petri *et. al.*, 1987) que es el mayor componente de superficie del trofozoítos. Presenta una gran afinidad por la galactosa y la N-acetyl-D-galactosamina, es una proteína heterodimerica compuesta por una subunidad pesada de 170 kDa en la que se encuentran dominios de reconocimiento de carbohidratos, una subunidad intermedia de 150 kDa y una ligera de 35 kDa. Otra función que se le atribuye a la lectina es la de evadir el sistema del complemento, la subunidad pesada de la lectina contiene dominios ricos en cisteína que presentan homología con la proteína CD59, un inhibidor del complemento humano evadiendo así parte de la respuesta inmune. También se ha visto que participa en el efecto citotóxico, ya que al inhibir la lectina se redujo la capacidad de citotoxicidad que tiene la amiba sobre las células (Saffer y Petri, 1991; López *et. al.*, 2000; Haque *et al.*, 2003, Marie y Petri, 2014; Faust y Guillen, 2012).

Otra adhesina que participa en la patogenicidad de la amiba es la EhADH112 de 75 kDa que forma parte del complejo EhCAPDH el cual incluye la proteasa de cisteína EhCP112 de 50 kDa (García-Rivera *et al.*, 1999). La EhADH112 está formada por proteínas heterodiméricas que se encuentran codificadas en 2 genes diferentes, contiene tres dominios transmembranales putativos y un epítipo de adhesión, el cual al ser inhibido por un anticuerpo se afecta la adherencia y la fagocitosis (Arroyo y Orozco, 1987; Garcia-Rivera *et al.*, 1999).

Además de estas moléculas de adhesión, se encuentran dos proteínas altamente inmunogénicas, la proteína de membrana de 220 kDa (L220) y la proteína rica en serina (SREHP) las cuales han sido fuente de estudio como posibles candidatos para preparar vacunas. La proteína 220 kDa tiene actividad de lectina, aglutina eritrocitos y en estudios realizados en modelos de ratón, se encontró que tiene la capacidad de suprimir o activar la proliferación de linfocitos T (Talamás *et al.*, 1995).

1.4.2 Citotoxicidad

La adhesión de los trofozoítos al epitelio intestinal y a otros blancos es fundamental para la patogénesis, la capacidad de los trofozoítos para matar a las células del hospedero se considera como un segundo paso importante y necesario. Después del contacto inicial los trofozoítos ejercen un efecto citotóxico sobre las células del hospedero induciendo una rápida muerte, los mecanismos de citotoxicidad de la amiba se pueden dividir en dos tipos, las dependientes de contacto directo con el parásito y las que son independiente de contacto, en la cual la célula muere después de la exposición con moléculas secretadas por el parásito (Christy y Petri, 2011; Marie y Petri, 2014).

1.4.2.1 Dependientes de contacto

Una vez que la amiba está adherida al epitelio o a la célula del hospedero, se inducen múltiples efectos citotóxicos, hay un incremento en los niveles de Ca⁺, producción de especies reactivas de oxígeno, pérdida de la integridad de la membrana, fragmentación de DNA, exposición de fosfatidilserina y activación de caspasa-3 (Marie

y Petri, 2014). El calcio participa en el mecanismo de transducción de señales muy importante para el parásito, también se ha observado que el flujo de calcio intracelular se relaciona con la muerte de las células del hospedero, ya que los niveles de calcio aumentan después del contacto con los trofozoítos de manera dependiente de Gal/GalNac (Ravdin *et al.*, 1988; Christy y Petri, 2011), el aumento de calcio en la célula es irreversible y precede a la muerte.

1.4.2.2 Independientes de contacto

E. histolytica tiene mecanismos destructivos que causan citotoxicidad en las células del hospedero independientes de contacto, estos mecanismos se basan en la secreción de diferentes proteinasas que desintegran la matriz del epitelio intestinal, un ejemplo de estas sustancias son las CPs, amebaporo, PGE2 (Christy y Petri, 2011; Marie y Petri, 2014).

1.4.2.3 Proteasas de cisteína

Las proteasas de cisteína o CPs son consideradas como un factor de virulencia importante en la patogénesis, son secretadas por la ameba dentro de su microambiente. El genoma de *E. histolytica* contiene 80 genes que codifican para proteasas, incluidas 50 CPs, en las que solo algunas se expresan durante la infección (Tillack *et al.*, 2007). En cultivos axénicos de *E. histolytica* las CP-A1, CP-A2, CP-A5 y CP-A7 son las que se expresan en mayor cantidad (> 90%). Las CPs actúan sobre una gran variedad de sustratos y están directamente relacionadas con la invasión del tejido a través de su capacidad de degradar distintos componentes de la matriz extracelular (fibronectina, laminina, colágeno) y mucinas. La mucina 2 (MUC 2) es el principal componente glucoprotéico que cubre al epitelio del colon, siendo la primera barrera de defensa que tiene el huésped para evitar la invasión del tejido por el parásito, el adelgazamiento de la capa de mucina es un evento previo para la invasión del epitelio. La degradación de la MUC2 se lleva a cabo por proteasas secretadas por el parásito especialmente la CP5 (Christy y Petri, 2011; Faust y Guillen, 2012). Las CPs son importantes para la evasión de la respuesta inmune ya que tienen la capacidad de degradar anticuerpos como IgA e IgG, también son capaces de degradar la proteína

precursora pro-IL-18, evitando la maduración de la IL-18 que participa en procesos pro-inflamatorios y es mediadora de una respuesta Th1, (Trejo y Castano, 2009; Que y Reed, 2000). La EhCP5 se localiza en la superficie de la amiba y principalmente está involucrada en la invasión del colon humano ya que juega un papel central en la degradación de las mucinas, también se ha visto que participan en la formación de absceso hepático amibiano (AHA), esto se demostró al inhibir sus funciones con inhibidores específicos (E-64) y por interferir en su expresión, así el desarrollo del AHA era menor (Bansal *et al.*, 2009; Ankri *et al.*, 1999). Las CPs pueden tener blancos diferentes, la CP112 interacciona con proteínas de las uniones estrechas (occludinas y claudinas), esto se observó mediante ensayo de inmunoprecipitación, después de incubar monocapas de células con los extractos de trofozoítos, sufren degradación, aumentando la permeabilidad paracelular facilitando la entrada, la destrucción del tejido, esto se comprobó al bloquear la CP con un anticuerpo específico previniendo así la degradación de las proteínas de las uniones estrechas y la disrupción de la barrera epitelial (Bentanzos *et al.*, 2013).

1.4.2.4 Amebaporo

Durante un análisis de varias fracciones derivadas de lisados de *E. histolytica* (Lynch *et al.*, 1982), Descubrieron que una de esas fracciones incrementaba la conductividad de las bicapas, los autores postularon que una proteína formadora de poros se expresaba en el parásito, la cual se denominó amebaporo. Posterior a esto Leippe y Col. 1997 purificaron tres miembros de la familia de amebaporo A, B y C, los cuales inducen la formación de poros en las membranas celulares por un mecanismo similar al del complemento. Los amebaporos son enzimas proteolíticas (colagenasas y proteasas) que permeabilizan la membrana y se insertan en la bicapa lipídica mediante la unión de fosfolípidos aniónicos a un pH bajo, forman oligómeros dando lugar a una molécula de mayor tamaño. Esto ocasiona la degradación de la matriz extracelular, formando canales por los que se difunden agua y iones, y se produce una lisis celular por choque osmótico (Leippe *et al.*, 1997, Trejo y Castano, 2009). Más allá de su actividad en contra de las células del hospedero, se ha observado que media la

lisis de bacterias que se encuentran en los fagosomas de *E. histolytica*. De las tres isoformas de péptidos formadores de poros, el amebaporo A es el más abundante, ya que al inhibir la expresión de este péptido se reduce la actividad de formación de poros alrededor de un 37 %. Las tres isoformas están integradas por 77 AA y se producen en una proporción 35:10:1 (Trejo y Castano, 2009). Se ha postulado que los trofozoitos de *Eh* son resistentes a la actividad de los amebaporo, ya que su membrana celular posee fosfolípidos neutros que impiden la unión de polipéptidos (Christy y Petri, 2011).

1.4.3 Fagocitosis

La fagocitosis es uno de los mecanismos más estudiados en *E. histolytica*, ya que participa en el proceso de invasión. Es un proceso muy activo que consiste en la ingestión de fragmentos celulares, células y bacterias, por lo que durante mucho tiempo se ha considerado como un indicador de virulencia y un mecanismo para poder diferenciar microscópicamente a *E. histolytica* de *E. dispar* ya que ambas presentan diferentes grados de fagocitosis (eritrofagocitosis) (Trejo y Castano, 2009). La fagocitosis es un proceso de múltiples pasos: I) inicia con la unión de la ameba a la célula blanco mediante receptores. II) la interacción del receptor con su ligando desencadena una serie de eventos, los que incluyen la reorganización del citoesqueleto y formación de los pseudópodos. III) los pseudópodos se cierran alrededor del fragmento a ingerir y forma un fagosoma, IV) El proceso va acompañado por la formación del fagolisosoma, el cual se fusiona con el lisosoma empezando la digestión de los fragmentos ingeridos (Voigt y Guillen, 1999), en este proceso se encuentran involucradas diferentes moléculas de superficie como las proteasas de cisteína, y componentes del citoesqueleto. La formación del fagolisosoma, es dirigido por GTPasas que actúan modulando la fusión vesicular con las membranas de la célula blanco (Ankri *et al.*, 1998; Campos-Peralta *et al.*, 2011). En múltiples organismos, la fagocitosis es el paso final en la vía de la apoptosis y sirve para limitar la inflamación, previniendo la liberación del contenido intracelular tóxico de las células muertas (Trejo y Castano, 2009).

El papel de la fagocitosis en la patogenicidad de la amiba se evidenció en amibas mutantes deficientes en fagocitosis, las cuales mostraban una baja virulencia *in vivo* (Orozco *et al.* 1983), considerándolo como el mejor marcador de virulencia al momento de hacer un diagnóstico. Aunque en 1992, Tsutsumi y colaboradores observaron que una cepa con una alta tasa de eritrofagocitosis producía solo pequeños abscesos hepáticos, esto comparándola con una que tenía una tasa de eritrofagocitosis menor, la cual producía abscesos más grandes. Por lo tanto sugirieron que la eritrofagocitosis no era representativa de virulencia en los modelos *in vivo* y que solo podría ser un marcador de patogenicidad en cultivos axénicos, ya que no era un marcador cuantitativo del grado de virulencia *in vivo*. En la fagocitosis principalmente se ingieren células muertas, por lo cual se ha sugerido que existe un fuerte vínculo entre la citotoxicidad y la fagocitosis, lo cual explicaría la deficiencia de las mutantes en la fagocitosis, ya que en estas mutantes también se ve afectado el efecto citotóxico, ocasionando que la amiba no tenga la capacidad de ingerir los fragmentos. (Orozco *et al.*, 1983; Hirata *et al.*, 2007; Okada *et al.*, 2005; Christy y Petri, 2011).

1.5 Amibiasis intestinal

La mayoría de las infecciones (90 %) por *E. histolytica* son asintomáticos o pueden causar disentería o enfermedades extraintestinales, cuya forma más común es el AHA. Los portadores asintomáticos de la amiba deben tratarse con antimibianos, ya que son fuente de infecciones y posteriormente pueden manifestarse síntomas de una amibiasis intestinal. En países en vías de desarrollo la amibiasis intestinal es la más común, es diagnosticada por la identificación de quiste y trofozoítos en heces. Los pacientes con amibiasis intestinal sintomática presentan dolor abdominal de varias semanas, pérdida de peso y diarrea, que puede ser acuosa con abundante moco y poca materia fecal con o sin sangre. Hay manifestaciones poco frecuentes de colitis amibiana como: colon tóxico, colitis necrotizante, ameboma y ulceraciones perianales (Haque *et al.*, 2003; Ximenez *et al.*, 2007).

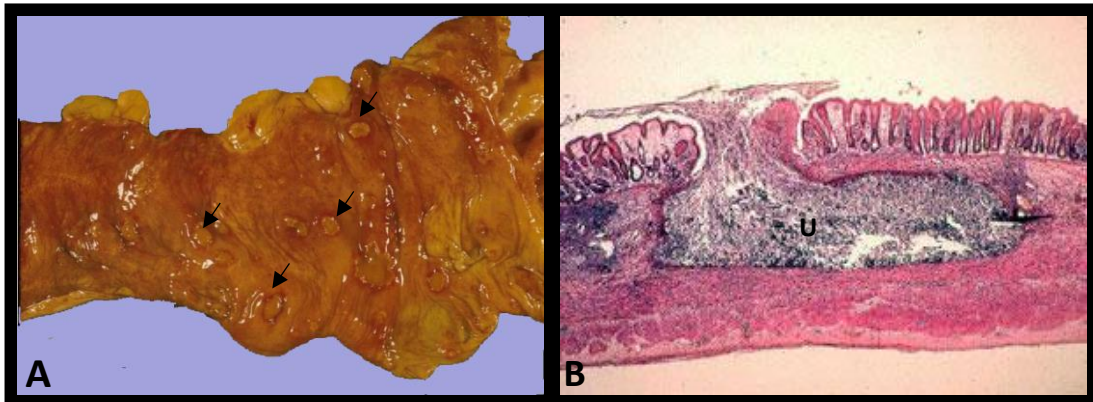


Figura 3. Amibiasis intestinal. La amibiasis intestinal es causada por trofozoítos que son capaces de invadir la mucosa intestinal. A) intestino grueso con úlceras causadas por las amibas. B) corte histológico de una úlcera causada por la amiba.

U= úlcera

Las flechas marcan algunas de las úlceras

1.6 Amibiasis hepática

El absceso hepático amibiano (AHA) es la manifestación extraintestinal más frecuente, aunque que se desarrolla en menos del 1% de pacientes infectados con *E. histolytica*, se desarrolla con mayor frecuencia en hombres que en mujeres con una proporción 10:1 y existen menos casos en infantes (Ximenez *et al.*, 2009; Haque *et al.*, 2003). Los trofozoítos llegan al hígado por vía hematogena a través de la vena porta que conecta

el intestino con el hígado. Algunos de los individuos que presentan AHA tienen colitis amibiana, aunque la gran mayoría no presenta síntomas intestinales y el diagnóstico por microscopia suele ser negativo. El AHA puede presentarse meses o años después de viajar o vivir en zona endémicas; algunos de los síntomas son fiebre, dolor en el cuadrante superior derecho, dolor a la palpación de la zona hepática. Los síntomas usualmente son agudos (duran <10 días) pero también pueden ser crónicos, con anorexia, anemia (leve), altas concentraciones de fosfatasa alcalina y alta sedimentación de eritrocitos. Algunas veces puede complicarse, ya que el absceso se puede extender dentro del peritoneo, cavidad pleural o el pericardio, también puede llegar a los pulmones y cerebro (Haque *et al.*, 2003; Ximénez *et al.*, 2007, Stanley, 2003).

Los trabajos sobre el AHA *in vivo* se han realizado en hámster (*Mesocricetus auratus*) el cual representa un buen modelo para su estudio ya que presenta distintas características que se semejan al humano. Tsutsumi *et. al.* en 1984 demostraron que el AHA en hámster presenta tres fases: inflamación aguda, formación del granuloma y una necrosis progresiva (Fig. 4). El daño inicial aparentemente no es producido por el contacto directo de la amiba con el parénquima del hígado, sino que ocurre a través de la acumulación de leucocitos y macrófagos alrededor de las amibas, causando un daño mediado por enzimas lisosomales que son liberadas por esas células.

Macroscópicamente, las lesiones del hígado por trofozoítos de *E. histolytica* son formadas por áreas de parénquima de hígado sustituido por material necrótico, que es amarillo con consistencia cremosa (Fig. 4). Cuando la lesión es grande, el centro del material necrótico puede ser sustituido por líquido, dando un aspecto de cavidad. Cuando el tejido se examina microscópicamente, las amibas están localizadas principalmente en la periferia del material necrótico cerca del tejido hepático aparentemente sano. Los trofozoítos pueden contener eritrocitos. La reacción inflamatoria es variable, aunque las áreas periportales muestran una abundante reacción inflamatoria crónica (Tsutsumi *et. al.*, 2015).

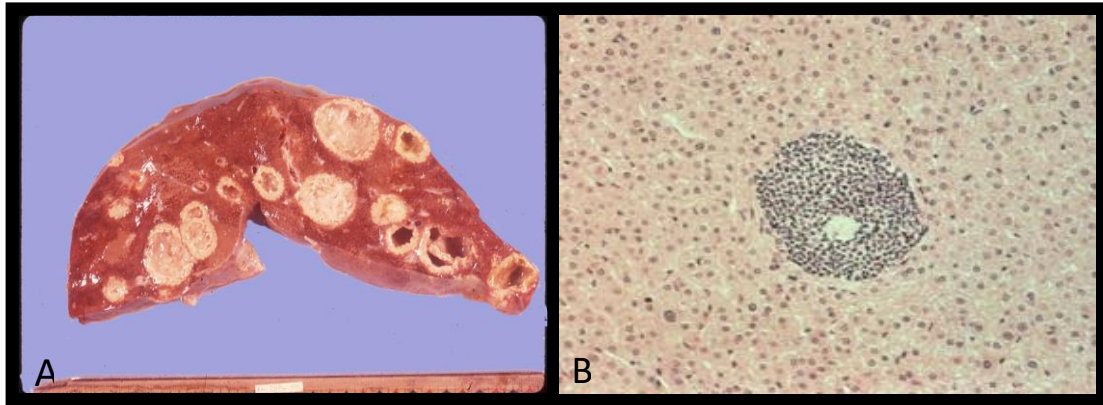


Figura 4. Absceso hepático amibiano. El absceso hepático amibiano es ocasionado por trofozoítos que llegan vía hematógica al hígado generando extensas lesiones. A) hígado con abscesos. B) corte histológico de una un hígado de hámster afectado experimentalmente. Seis horas postinoculación muestra un trofozoíto central rodeado de células inflamatorias agudas.

1.7 Hígado

El hígado es un órgano complejo y de múltiples funciones metabólicas, energéticas, hemostáticas y de defensa, es la glándula más voluminosa del cuerpo y pesa alrededor de 1.5 kg en el adulto promedio. Es de color pardo-rojizo, se encuentra detrás de las costillas y cartílagos costales, debajo del diafragma y ocupa la mayor parte del hipocondrio derecho y parte del epigastrio en la cavidad abdominopelviana (Fig. 5). Está cubierto casi por completo por el peritoneo visceral y revestido en su totalidad por una capa de tejido conectivo denso irregular. Se divide principalmente en dos lóbulos, el derecho que es el más grande y el izquierdo que es el más pequeño, aunque algunos anatomistas consideran que el lóbulo derecho abarca el lóbulo cuadrado y el lóbulo caudado. La forma del hígado se ajusta al entorno que lo rodea. Las superficies superior, anterior y posterior del hígado se denominan superficies diafragmáticas, debido a su relación con el diafragma y la inferior se llama superficie visceral (Tortora y derrickson, 2007, Timmons y Tallitsch, 2009).

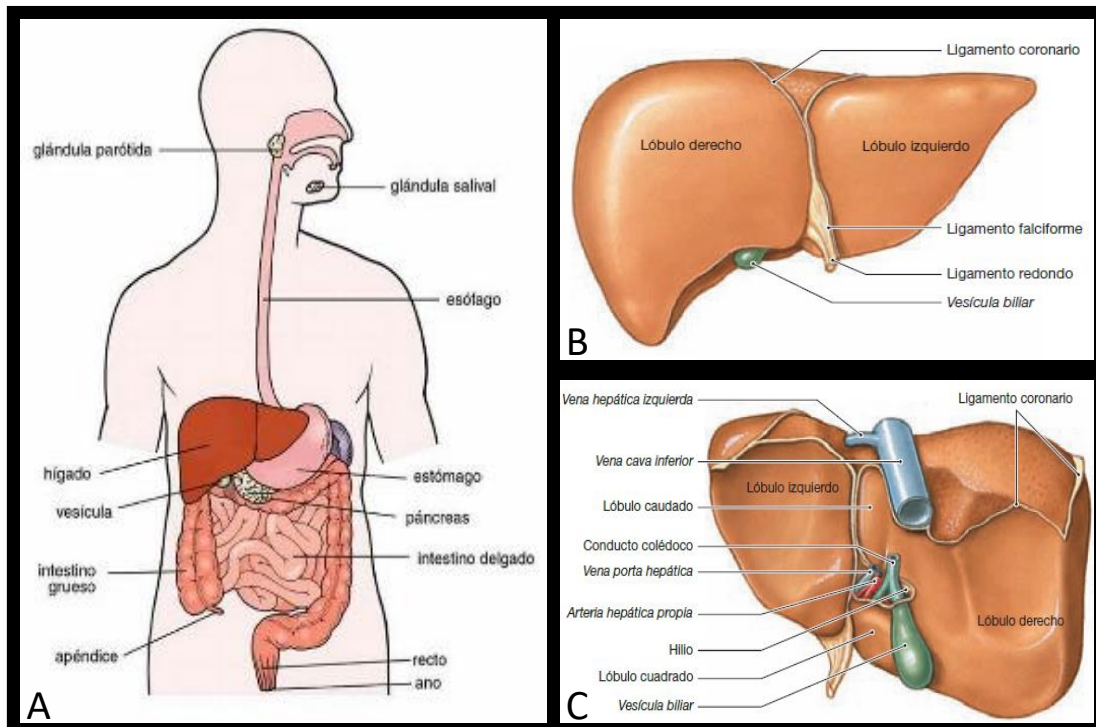


Figura 5. Posición anatómica del hígado. A) El hígado se encuentra debajo del diafragma y ocupa la mayor parte del hipocondrio derecho. Se divide principalmente en lóbulo derecho y lóbulo izquierdo. B) Cara diafragmática. C) Cara visceral.

Los lóbulos del hígado están formados por múltiples unidades morfo-funcionales, llamadas lobulillos hepáticos. Un lobulillo tiene una estructura hexagonal constituida por células epiteliales especializadas llamadas hepatocitos que son las principales células funcionales del hígado. Los hepatocitos están organizados en láminas irregulares ramificadas e interconectadas que rodean a una vena centrolobulillar (Fig. 6). Los lobulillos hepáticos contienen capilares muy permeables llamados sinusoides, a través de los cuales circulan la sangre y es donde confluyen las ramas de la arteria hepática y de la vena porta. Existen otras células aparte de los hepatocitos que componen al hígado, como las células de Kupffer que se encuentran en los sinusoides y son células fagocíticas (macrófagos) que destruyen eritrocitos, glóbulos blancos, bacterias y otros cuerpos extraños que provienen del tracto gastrointestinal (Tortora y Derrickson, 2007, Timmons y Tallitsch, 2009), además de producir moléculas similares a las descritas en los macrófagos circulantes. También se encuentran células endoteliales, que forman el revestimiento de la pared sinusoidal y forman la estructura cilíndrica por sí mismas, y se disponen como células individuales en una fila para formar el capilar típico del sinusoides del hígado. Las células estelares se localizan en el espacio Disse. La función de las células estelares es muy variada, participan en el metabolismo de la vitamina A almacenándola en forma de gránulos lipídicos, ante determinados estímulos sintetizan, secretan y degradan componentes de la matriz extracelular. Otras células que se encuentran en el hígado son los colangiocitos que son células epiteliales que recubren los conductos biliares (Tortora y Derrickson, 2007, Timmons y Tallitsch, 2009).

Los hepatocitos son células poliédricas de 20 μm de diámetro, con un núcleo central redondeado u ovalado con nucléolo claramente visible, presenta una membrana plasmática, citoesqueleto con microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermediarios de citoqueratina y organelos como las mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y liso, aparato de Golgi, lisosomas y peroxisomas.

El hígado recibe sangre de dos fuentes: de la arteria hepática donde se obtiene la sangre oxigenada y por la vena porta de la cual recibe sangre con poco oxígeno pero con abundantes nutrientes recién absorbidas del intestino, además de fármacos, posiblemente microorganismos y toxinas del tubo digestivo. Las ramas de la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar se localizan en los vértices de los lobulillos denominados clásicos y a este conjunto de elementos vasculares y ductales se les conoce como la triada portal (Tortora y Derrickson, 2007; Timmons y Tallitsch, 2009).

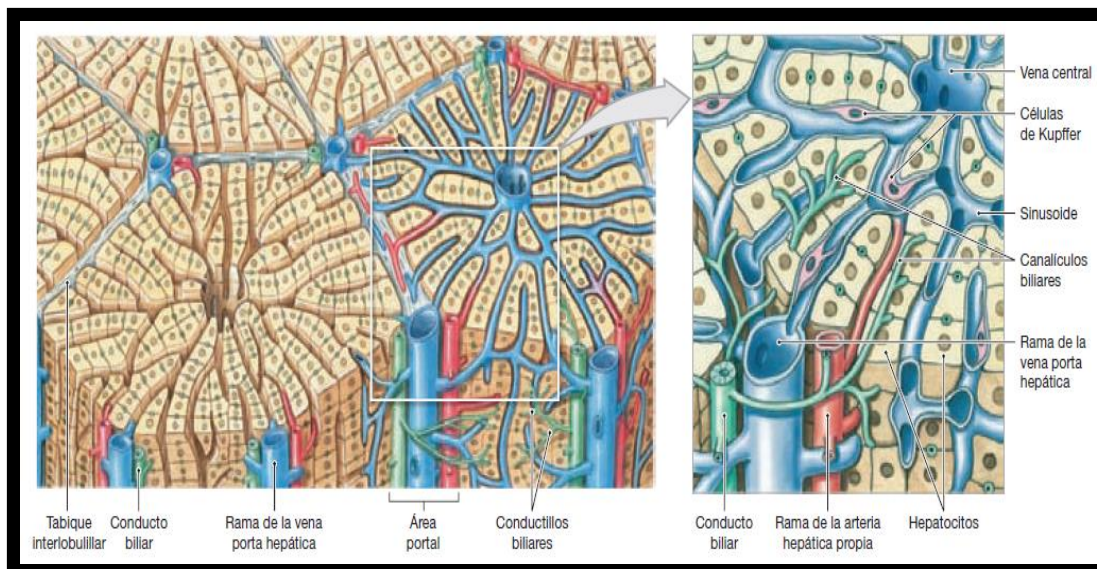


Figura 6. Lobulillo hepático. El lobulillo hepático tiene forma hexagonal y está constituido por hepatocitos. Adyacente a cada hepatocito se encuentran los canaliculos biliares que se conectan con el conducto biliar, en estas estructuras viaja la bilis sintetizada en el hígado hacia la vesícula biliar para ser almacenada.

1.8 Vesícula biliar

La vesícula biliar es un saco musculo-membranoso cónico o en forma de pera, que funciona como reservorio de bilis. Puede almacenar entre 40 y 60 ml de bilis, se localiza en la superficie inferior del lóbulo derecho del hígado, extendiéndose de la extremidad derecha de la porta al borde inferior del hígado. Anatómicamente la vesícula biliar está dividida en tres áreas: fondo, cuerpo y cuello. El conducto cístico comunica la vesícula biliar con el conducto biliar común, donde se unen para formar

el conducto colédoco que es el tubo que lleva la bilis desde el hígado hasta el intestino delgado (fig. 7) (Tortora y Derricson, 2007).

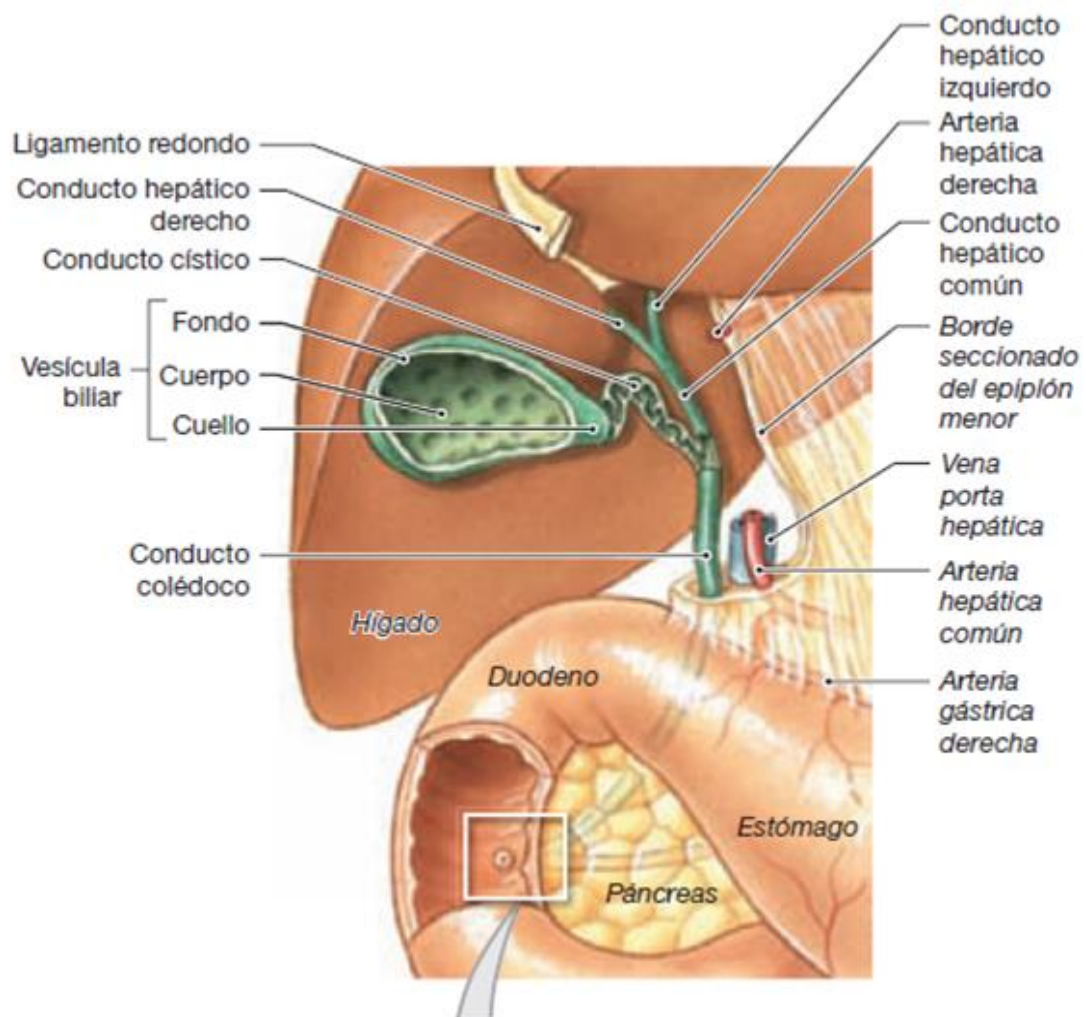


Figura 7. Vesícula biliar. En la imagen se muestra la vesícula biliar y conductos asociados, en la vesícula se almacena la bilis secretada por los hepatocitos y los conductos asociados en conjunto hacen que la bilis llegue al duodeno y cumpla su función.

1.9 Bilis

La bilis es una sustancia producida en el hígado y constituye la principal vía de eliminación del colesterol. Es una solución isotónica de color pardo amarillenta o verde oliva, tiene un pH 7.6-8.6 y está compuesta en su mayor parte por agua, sales biliares, colesterol, fosfolípidos, pigmentos biliares y varios iones.

Las células encargadas de secretar la bilis son los hepatocitos, y es secretada a una red de canales entre las membranas opuestas de dos hepatocitos adyacentes denominadas canalículos biliares, que a su vez desembocan en los conductos biliares, es almacenada en la vesícula biliar y excretada a la luz del duodeno, por estímulo de una hormona, la colecistoquinina. Su producción diaria es entre 800 a 1000 ml de bilis (0.15 a 0.16 ml/min). La producción de bilis sufre de variaciones que dependen de la producción de ácidos biliares por los hepatocitos, proceso que requiere un elevado consumo energético. Los ácidos biliares provienen esencialmente del catabolismo del colesterol y son sintetizados exclusivamente por el hígado, formando derivados glucólicos y taurocólicos, que están presentes en la bilis como sales de sodio y de potasio. En el intestino, promueven la formación de micelas de lípidos provenientes de la ingesta alimentaria, después son reabsorbidos en el íleon terminal, formando una circulación entero-hepática de 6 a 8 veces al día. (Tortora y Derrickson, 2007; Timmons y Tallitsch, 2009).

La bilis es en parte un producto de excreción y por otro una secreción digestiva, las sales biliares que son sales de sodio y de potasio de los ácidos biliares (en especial de los ácidos quenodesoxicólico y cólico), desempeñan un papel en la emulsificación y absorción de lípidos después de la digestión. Aunque los hepatocitos liberan continuamente bilis, intensifican la producción y la secreción cuando la sangre portal contiene muchas sales biliares, de este modo, a medida que la digestión y la absorción continúan en el intestino delgado, la liberación de bilis aumenta entre las comidas, después de que se absorbió la mayor parte, la bilis fluye hacia la vesícula biliar para almacenarse (Timmons y Tallitsch, 2009).

1.10 Ácidos biliares

Los ácidos biliares son productos solubles derivados del catabolismo del colesterol. En general, los ácidos biliares están compuestos por 4 anillos esteroides formando una estructura de hidrocarburos, presentan una cara hidrofóbica y una cara hidrofílica que contiene grupos hidroxilos y una cadena corta ácida de 5 carbonos que posteriormente se amida con glicina o taurina (de Aguiar Vallim *et al.*, 2013). Esta estructura anfipática le da a los ácidos biliares la propiedad de formar micelas facilitando la digestión, absorción de lípidos y algunas vitaminas liposolubles como A, D, E y K. la presencia o ausencia del grupo hidroxilo en la orientación alfa o beta en la posición 3, 6, 7 y 12 en la cadena principal de esteroides afecta tanto su solubilidad como la hidrofobicidad (Fig. 8).

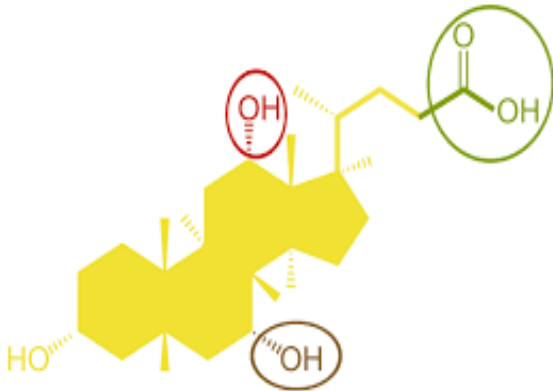


Figura 8. Estructura de los ácidos biliares. La estructura de los ácidos biliares está constituida por 4 anillos esteroide representados en color amarillo. Puede presentar grupos OH en diferente posición representados con rojo y café. Presenta una cadena lateral de 5 carbonos la cual puede ser amidada la cual está representada por el color verde.

1.10.1 Síntesis de ácidos biliares

Bajo condiciones fisiológicas la mayoría de los ácidos biliares existen como conjugados con glicina o taurina (amidación en el grupo carboxil), en una proporción 3 a 1 en humanos, en ratón, la mayoría de los ácidos biliares son conjugados de taurina (> 95%). Como los ácidos biliares conjugados tienen la capacidad de formar sales con Na y K son mejor conocidos como sales biliares. En el proceso de síntesis de los ácidos biliares, al menos 17 enzimas están participando en la modificación de los anillos esteroides del colesterol de la cadena lateral. Estas enzimas catalizan la modificación del anillo esteroide y la escisión oxidativa de 3 carbonos de la cadena del colesterol formando ácidos biliares C-24 (Chiang, 2013; de Aguiar Vallim *et al.*, 2013) (Fig. 9).

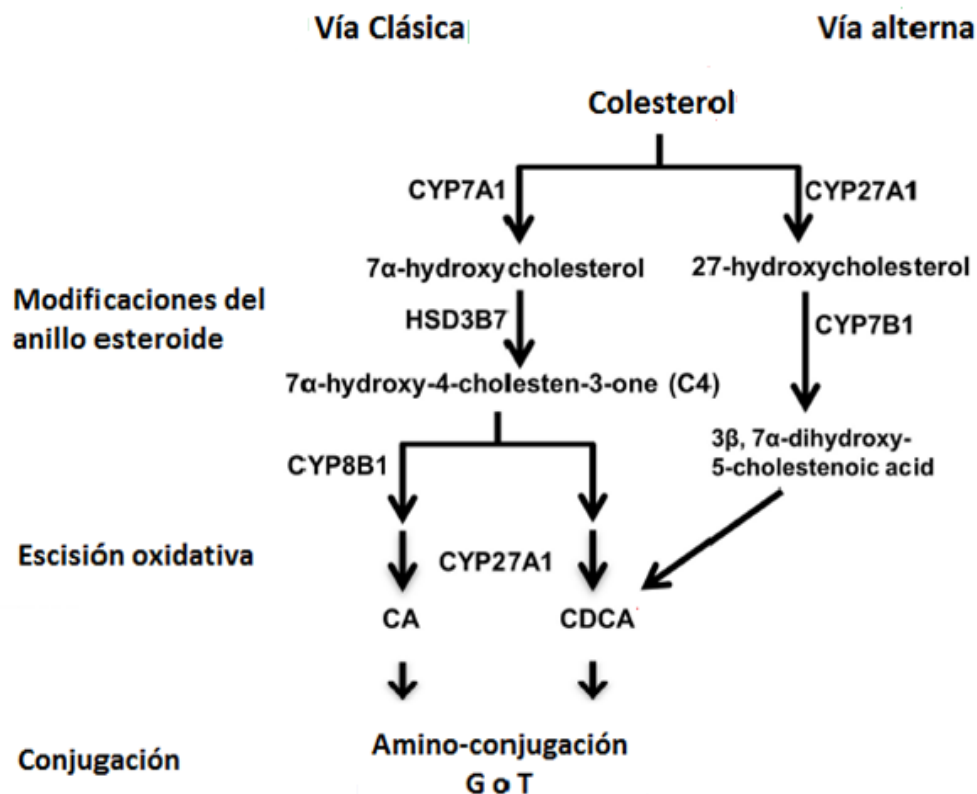


Figura 9. Síntesis de ácidos biliares. Los ácidos biliares se forman a partir de una molécula de colesterol, pueden ser sintetizados de dos formas: la vía clásica y la vía alterna, la diferencia en las dos es su participación en cada una. La molécula de colesterol sufre varias modificaciones como: hidroxilaciones, modificaciones de los anillos esteroides, una escisión oxidativa y conjugaciones.

En humanos la síntesis de ácidos biliares es de 200 a 600 mg por día y se excreta casi la misma cantidad por heces, este recambio diario es aproximadamente el 5% del pool de los ácidos biliares. El 95 % que resta del pool de ácidos biliares es reciclado de 4 a 12 veces al día (Chiang, 2013). Las sales biliares junto con fosfolípidos y colesterol son llevados dentro de la vesícula biliar donde se concentran para formar la bilis, la cual está compuesta por 85% de agua. El resto del soluto es un complejo que mezcla sales biliares (67%), fosfolípidos (22%) y colesterol (4%), junto con electrolitos, minerales, pigmentos de bilirrubina y biliverdina que le dan el color verde amarillento a la bilis.

Las micelas de sales biliares y fosfolípidos juegan un papel importante en la solubilización del colesterol en la bilis, previniendo la cristalización y formación de cálculos biliares (de Aguiar Vallim *et al.*, 2013).

1.10.2 Síntesis de ácidos biliares primarios

Los ácidos biliares primarios son sintetizados en el hígado a partir del colesterol,, algunos de ellos son convertidos en secundarios por bacterias en el intestino delgado. En los humanos, el pool de ácidos biliares consiste en ácidos biliares primarios (CA y CDCA), ácidos biliares conjugados y secundarios (DCA y LC). El CA y CDCA son los ácidos biliares primarios que se sintetizan en mayor cantidad en el humano. En el hígado dos vías son las responsables de la síntesis de los ácidos biliares primarios, la vía clásica y la vía alternativa (Li y Apte, 2015). En la conversión del colesterol a ácidos biliares participan hidroxilaciones, saturación de un doble enlace en C5-C6, epimerización del grupo 3-hidroxil y una escisión oxidativa de una unidad de 3 carbonos para formar una cadena de C24, estas reacciones son catalizadas por enzimas CYP que se localizan en retículo endoplásmico, mitocondria, citosol y peroxisomas (Russell, 2003, Chiang, 2013). Antes de la secreción a la bilis, los ácidos biliares primarios son conjugados con glicina y taurina, este proceso es catalizado por la enzima coenzima a sintetasa de ácidos biliares (BACS por su siglas en inglés) y amino ácido transferasa de ácidos biliares (BAAT) para generar las sales biliares (Nie *et al.*, 2015). Los ácidos biliares conjugados son moléculas cargadas negativamente por lo cual disminuye su pKa incrementado su solubilidad en la mayoría de los intervalos de pHs fisiológicos. De esta manera se facilita la formación de micelas en el ambiente ácido del duodeno, también previene la precipitación de Ca²⁺, minimiza la absorción pasiva y son resistentes a las escisiones por carbopeptidasas pancreáticas (Chiang, 2013; Li y Apte, 2015).

1.10.2.1 Vía clásica

La vía clásica de la síntesis de ácidos biliares genera aproximadamente el 90 % del total de ácidos biliares que se producen en el hígado. Esta vía produce CA y CDCA en cantidades similares. Esta vía es regulada por la enzima colesterol 7 α hidroxilasa

(CYP7A1), una enzima (enzima limitante) del citocromo P450 que convierte el colesterol a 7α -hidroxicolesterol. Este último puede ser convertido en ácido cólico por la vía dependiente de la 12- hidroxilación del anillo esteroide por la enzima CYP8B1. Si el 7α -hidroxicolesterol escapa de la hidroxilación de CYP8B1 es convertido en ácido quenodeoxicólico (Li y Apte, 2015). La enzima CYP27A1 participa en las dos vías (clásica y alternativa) llevando a cabo la oxidación de la cadena lateral del ácido cólico y del ácido quenodesoxicólico. En la síntesis de todos los ácidos biliares debe de escindirse la cadena lateral, la cual es catalizada por la enzima CYP27A1 (de Aguiar Vallim *et al.*, 2013; Li y Apte, 2015).

1.10.2.2 Vía alterna

En la vía alterna la enzima CYP27A1 cataliza la primera hidroxilación para convertir el colesterol a 27-hidroxicolesterol. La hidroxilación del C-7 es catalizada por la enzima CYP7B1. En contraste con la vía clásica, esta vía solo produce CDCA y no CA. Se produce menos del 10 % del total de ácidos biliares bajo condiciones fisiológicas normales en humanos. Sin embargo esta llega a producir cerca del 50 % de los ácidos biliares en roedores (Li y Apte, 2015)

1.10.3 Ácidos biliares secundarios

En el intestino, algunos ácidos biliares conjugados sufren biotransformaciones que son catalizadas por enzimas bacterianas. En el intestino delgado y grueso existen bacterias que tienen hidrolasas de sales biliares. Estas enzimas son capaces de desconjugar los ácidos biliares conjugados, generando ácidos biliares libres (primarios). Este paso es necesario para convertir los ácidos biliares primarios (ácidos biliares que no son reabsorbidos) en ácidos biliares secundarios. En el intestino, la enzima 7α -deshidroxilasa cataliza la deshidroxilación del C-7 en los ácidos biliares primarios, que convierten el CA y CDCA a DCA y LCA respectivamente (Li y Apte, 2015). Los ácidos biliares secundarios son altamente hidrofóbicos y tóxicos ya que han sido vinculadas a altas concentraciones de estos ácidos en el hígado con inflamación, colestasis, cálculos biliares, carcinogénesis, entre otras enfermedades. Representan un pequeño porcentaje del pool de ácidos biliares, los ácidos biliares secundarios

pueden ser absorbidos pasivamente o excretados en las heces (de Aguiar Vallim, 2013; Li y Apte, 2015).

1.10.4 Circulación enterohepática de las sales biliares

Una vez sintetizados los ácidos biliares en el hígado, son secretados inmediatamente a la bilis y almacenados en la vesícula biliar. La ingesta de alimentos estimula las células epiteliales en el duodeno para secretar una hormona peptídica llamada colecistoquinina, que estimula la contracción de la vesícula biliar para liberar la bilis (Li y Apte, 2015). La bilis es llevada al intestino para ayudar a la digestión y absorción de lípidos entre otras funciones. Los ácidos biliares forman micelas mixtas con los lípidos ingeridos, que son necesarias para la digestión por lipasas. Los ácidos biliares (pool) son reabsorbidos en el intestino (íleon) mediante un transportador ASBT presente en los enterocitos. Se difunden por la membrana basolateral de éstos y son secretados dentro de la circulación portal donde llega a los sinusoides y son tomados por los hepatocitos. La circulación enterohepática de ácidos biliares es muy eficiente en los humanos, cerca del 95 % de ácidos biliares son reabsorbidos, el 5 % restante es eliminado por las heces, aunque esto a su vez es sintetizado de nuevo en el hígado. El pool de ácidos biliares (3 g) contiene 40 % de CA y CDCA, 20 % de DCA y trazas de LCA (Chiang, 2013). En el hígado los ácidos biliares reabsorbidos del intestino son reconjugados y resecretados junto con las sales biliares recién sintetizadas, completando un ciclo enterohepático de circulación (Fig. 10). El reciclamiento de los ácido/sales biliares entre el hígado e intestino ocurre entre 6-10 veces al día y transportan 20-40 g de ácidos biliares (de Aguiar Vallim *et al.*, 2013).

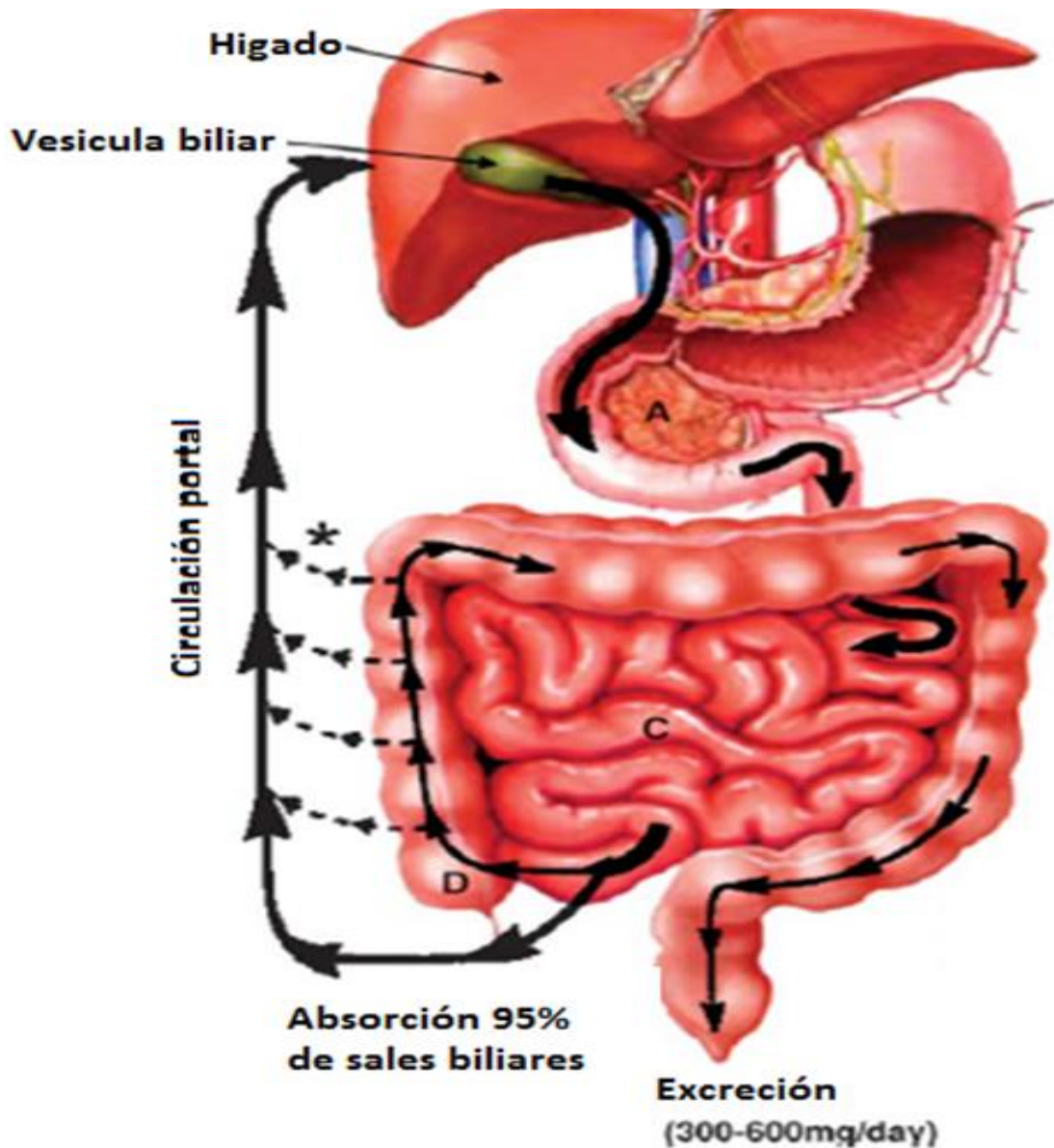


Figura 10. Diagrama de la circulación enterohepática. La circulación enterohepática inicia con la liberación de la bilis hacia el intestino, en donde llevara a cabo su función. Cuando se encuentra en la parte terminal del íleon e inicio del colon, comienza el proceso de absorción el cual ocurre también en el intestino grueso. Al ser absorbida por los enterocitos viajan de nuevo al hígado vía circulación portal. En el hígado serán procesadas nuevamente y almacenadas en la vesícula biliar nuevamente. En el humano la circulación enterohepática se lleva a cabo entre 6-10 veces al día.

II. Antecedentes del proyecto

Las sales biliares forman parte de la bilis, las cuales se encuentran presentes en distintos tejidos a diferentes concentraciones, como el intestino, lugar donde se encuentran abundantes microorganismos, tanto patógenos como comensales. Se ha reportado que las sales biliares poseen actividades antimicrobianas, desafiando la sobrevivencia y colonización de bacterias patógenas y comensales (Begley *et al.*, 2005). Uno de los microorganismos que es capaz de colonizar el intestino es el parásito protozoario *E. histolytica*. En los años 60' se reportó que las sales biliares tenían efecto sobre el agente causante de la amibiasis, sin embargo estos estudios no se han realizado exhaustivamente. En 1972 Yadava y Dutta estudiaron el efecto amebicida de las sales biliares sobre las amibas probando diferentes sales biliares a diferentes concentraciones que iban de 1.9 a 8000 µg/ml en un cultivo axénico de trofozoítos. Las sales biliares que probaron fueron: colato de sodio, taurocolato de sodio, tauroglicolato de sodio, desoxicolato de sodio y lauril sulfato de sodio. Estas sales biliares probadas representan tanto sales primarias como secundarias.

Algunos datos han mostrado que las sales biliares a ciertas concentraciones tienen un efecto amebicida (Fig. 11). Lo cual sostiene la teoría de que si hay una excreción o síntesis inadecuada de sales biliares, podrían favorecer la colonización de la amiba.

Agents	Final* pH	Amoebicidal conc. (µg./ml.)
Non-ionic		
Tween 80	6·8	8,000
An-ionic		
Sodium cholate	6·8	4,000
Sodium taurocholate	6·8	4,000
Sodium tauroglycocholate	6·7	2,000
Sodium deoxycholate	6·7	500
Sodium lauryl sulphate	6·8	125
Cationic		
Cetavlon	6·8	7·8—15·6

Figura 11. Efecto amebicida de las sales biliares y agentes surfactantes en un cultivo axénico de *E. histolytica*.

Variyam (1992) estudió el efecto de las sales biliares junto con las hidrolasas en la adherencia de *E. histolytica* a células CHO, ya que se ha demostrado que las hidrolasas producidas por bacterias entéricas disminuyen la adhesión y como las sales biliares son capaces de promover la actividad de las glicosidasas, querían ver si se modificaba la acción de estas enzimas. El efecto se midió en la capacidad de adhesión de las amibas a células CHO. Las sales que se probaron fueron: taurocolato, desoxicolato de sodio y taurodeoxicolato. Las sales biliares se usaron a diferentes concentraciones que iban de 0.5 mM a 5 mM y los resultados obtenidos fueron los siguientes: Los trofozoítos crecidos únicamente en el medio (grupo control) tuvieron una adherencia de 78.4 +/- 1.2 % y el control con las hidrolasas únicamente tuvo una adherencia de 96.4 +/- 2 % a las 4 h en ambos casos. Aunque a las 24 h el grupo control con las hidrolasas disminuyó hasta 31.4 +/- 3.4 %.

Los resultados de los tratamientos con las sales biliares más las hidrolasas, durante 4 h de incubación fueron los siguientes:

Adhesión taurocolato

0.5 mM 96.3 +/- 7.4

1 mM 74.2 +/- 27.1 %

2 mM 37.1 +/- 10.6

5 mM 21.1 +/- 1.3 %

Adhesión Deoxycolato

1 mM 101.2 +/- 3.7%

2 mM 88.1 +/- 9.7 %

5 mM precipitó el medio por lo que no pudo ser probado.

Adhesión con taurodeoxycolato

2 mM 25.1 +/- 2.9 %

5 mM 29.4 +/- 1.7 %.

Estos resultados muestran que algunas de las sales biliares disminuyeron la adherencia como el taurocolato y tauroglicolato a las concentraciones 2 y 5 mM, comparándolas con el control.

Debido a que se ha visto que la bilis es un factor importante para el crecimiento de *Giardia* en condiciones axénicas y que *E. histolytica* es un parásito que habita en el tracto digestivo del humano, Mata-Cardenas *et al.* (1995) probaron el efecto de la bilis en cultivos axénicos de *E. histolytica*. Se examinó si la suplementación del medio PEHPS con bilis bovina es capaz de inducir un mayor crecimiento en las amibas, como en el caso de *Giardia*. El efecto de la bilis se probó a diferentes concentraciones de 0.03 – 1.50 g/l y los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes: se pudo observar que el crecimiento de la amiba incrementó conforme la dosis, hasta llegar a 0.24 g/l. Dosis mayores a 0.24 g/l bajaron el rendimiento de la amiba. También se realizó una cinética con tiempo de incubación con la concentración de mayor rendimiento 0.24 g/l y se usó un control el cual no se le adicionó la bilis. En las primeras 72 h los cultivos crecieron de manera similar y durante las 24 h siguientes (96 h) los cultivos con bilis alcanzaron un rendimiento mayor que el control. Sin embargo a las 120 h, el cultivo con bilis inició con la fase lítica disminuyendo casi el 30 % de rendimiento.

El efecto de las sales biliares sobre los microorganismos se ha estudiado en otros parásitos protozoarios e incluso bacterias en los que se ha visto que tienen efecto sobre su desarrollo. En *Giardia* se ha estudiado debido a que la bilis es capaz de promover el crecimiento del parásito *in vitro*. Por lo que proponen que la bilis podría ser un factor importante en la colonización del parásito en el hospedero, también se ha visto que la bilis y algunas sales biliares participan en el proceso de enquistamiento. Farthing *et al.* en 1985 estudio el efecto de algunas sales biliares en el crecimiento de *Giardia lamblia in vitro*. El crecimiento se evaluó a las 48 h después de que se le administraron las sales biliares (TC, GC y TDC) a diferentes concentraciones que iban desde 0.2 μ M a 2 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 12. Las sales

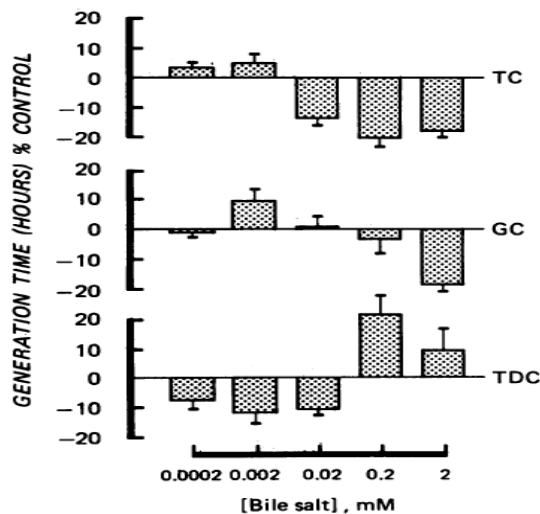


Figura 12. Influencia de las sales biliares en el tiempo de generación (h) de *Giardia* en medio TYI-S. la aceleración del tiempo de generación se representa con valores negativos y la inhibición con valores positivos.

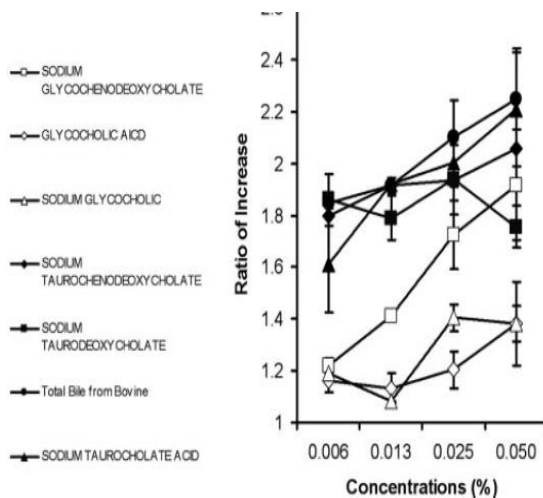


Figura 13. Incremento de la invasión de los esporozoitos a las células HCT-8, inducido por las sales biliares

TC y GC tuvieron poco efecto en el crecimiento a concentraciones bajas, pero a concentraciones cercanas a la CMC hubo una mayor estimulación del crecimiento. En el caso del TDC hubo aumento en el crecimiento a concentraciones bajas y el crecimiento se inhibió a concentraciones cercanas a la CMC (Farthing *et al.*, 1985).

En *Cryptosporidium* un parásito que pertenece al Phylum apicomplexa, el cual es el agente que causa la criptosporidiosis, se ha reportado que el turaocolato de sodio (sal biliar conjugada) induce el desenquistamiento del ooquiste. Por lo que Feng *et al.* (2006) estudiaron el impacto de las sales biliares en la invasión de ooquistes recién desenquistados en diferentes líneas celulares. Se utilizó una gran variedad de sales como: glicoquenodesoxicólico de sodio, ácido glicólico, glicólico de sodio, tauroquenodesoxicólico de sodio, taurodesoxicólico de sodio, taurocolato

de sodio y bilis total. Las sales biliares se usaron a diferentes concentraciones que iban desde 0.006 a 0.050 %. El proceso de invasión se midió por citometría de flujo donde se marcaron los esporozoitos recién salidos del ooquistes y para después ser cultivados en la línea celular HCT-8 y poder ver la marca (Fig. 13). Todas las sales biliares que se probaron tuvieron un aumento en la invasión, el cual demostró ser

dosis dependiente. En general los tauroconjugados aumentaron más la invasión en comparación con los gliconjugados. Por lo que se puede concluir que las sales biliares tienen efecto tanto en el desarrollo del parásito (desenquistamiento) como en su capacidad de invadir células.

En otro organismo en el cual se ha estudiado el efecto que tienen las sales biliares es en *Shigella spp.* Se pudo observar un incremento en su capacidad de adherencia e invasión en células epiteliales al ser cultivadas con las sales biliares: ácido desoxicolato y ácido quenodesoxicolato. Se observó que al agregar las bacterias crecidas con sales biliares a una monocapa de células HeLa, se incrementó su capacidad de invasión aproximadamente un 90% en comparación con el control. También se probaron otras sales biliares (conjugadas) y otros componentes como detergentes para determinar si el incremento de la invasión fue debido al crecimiento por estas sales en particular, los cuales no tuvieron el mismo efecto que CDCA y DCA. Para determinar si el incremento de la invasión venía de algún proceso temprano de invasión, se probó el efecto del DCA en adherencia, en donde se observó un incremento en la adherencia al ser cultivada con el DCA. Una de las hipótesis en el trabajo de Pope *et al* (1995) señala que las sales biliares podrían estar actuando como señal para inducir la expresión de factores que incrementen su invasión. Se han reportado ciertas proteínas asociadas a la virulencia de *Shigella spp* que son liberadas dentro del medio de cultivo como: proteínas VirG e Ipa (inmunógenos presentes en infecciones). Por lo tanto para determinar el efecto del CDA en la liberación de estas proteínas, éstas fueron precipitadas del medio y analizadas en un gel SDS-PAGE, resultando en un incremento en la concentración de estas proteínas en presencia del CDA y CDCA, comparándolo con otras sales y otros componentes (Pope *et. al.*, 1995).

Todos los resultados mostrados han ayudado a entender más la biología de los parásitos, tanto sus mecanismos de sobrevivencia como de patogenicidad, lo cual es importante para poder resolver todos los problemas de salud que conllevan las infecciones por estos parásitos

III. Justificación

La amibiasis por *E. histolytica* sigue siendo un problema de salud pública en nuestro país. La principal enfermedad que causa este protozooario es la amibiasis intestinal invasiva, y menos frecuentemente la amibiasis hepática como el absceso hepático. Por otro lado, se sabe que comparativamente, una gran mayoría de los casos son portadores asintomáticos que no muestran signos de enfermedad. Esto sugiere que la amiba tiene una capacidad para adaptarse al microambiente que forma parte de la microbiota y a otras moléculas y sustancias diversas que se encuentran en el tubo digestivo. Las sales biliares constituyen una de esas moléculas, que gracias a la circulación enterohepática se encuentran constantemente reciclando en la luz intestinal, tanto del intestino delgado, el grueso y en el mismo hígado. Así, las amibas durante su trayecto en la luz intestinal tienen seguramente interacciones con diversos componentes de la bilis que podrían estar condicionando o afectando factores como su sensibilidad, su proliferación, su resistencia o su virulencia, relacionadas con el desarrollo o no de una enfermedad. En la actualidad se sabe muy poco del efecto de la bilis sobre el parásito, y menos sobre el efecto de cada una de las sales biliares que constituyen la bilis en su totalidad. Además, los estudios sobre esta interacción están básicamente relacionados con análisis *in vitro*, y prácticamente no existen estudios *in vivo* del papel de las sales biliares sobre los trofozoítos de *E. histolytica*.

IV. Hipótesis

La presencia de sales biliares en el cultivo de trofozoítos de *E. histolytica* afecta su viabilidad, su morfología, y virulencia.

V. Objetivo general

Determinar el papel de las sales biliares en la viabilidad, morfología y virulencia de *E. histolytica*

5.1 Objetivos particulares

- 1.- Evaluar el efecto de cada una de las sales biliares en la viabilidad y proliferación de las amibas en un cultivo axénico.
- 2.- Evaluar los cambios morfológicos y ultraestructurales de la amiba en la interacción con las sales biliares.
- 3.- Analizar el efecto de las sales biliares en la virulencia de la amiba *in vitro e in vivo*.

VI. Material y métodos

6.1 Parásitos

Se utilizaron trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1-IMSS, fueron cultivados axénicamente en medio TYI-S-33 suplementado con 10 % (v/v) de suero bovino de adulto y vitaminas. La virulencia de esta cepa HM1-IMSS es comprobada mensualmente por pases al hígado de hámster.

6.2 Sales biliares

Para el proyecto se usaron dos sales biliares conjugadas: glicoquenodesoxicólico de sodio y glicolato de sodio, y dos sales secundarias: el desoxicolato de sodio y el ácido litocólico (SIGMA).

6.3 Ensayo de proliferación

Para ver el efecto de las sales biliares en la viabilidad y proliferación se cultivaron trofozoítos (1×10^4) en placas de 96 pozos con diferentes concentraciones de sales biliares (disueltas en DMSO 0.1 %) durante 24, 48 y 72 h a 37 °C. Se usaron como control amibas HM1-IMSS sin ningún tratamiento y amibas cultivadas con el vehículo DMSO. Después de los tiempos de incubación se hicieron 3 lavados con PBS con el fin de eliminar la posibilidad de falsos positivos. Posterior a esto los trofozoítos se resuspendieron en 100 μ l de PBS y se les agregó 5 μ l del reactivo WST-1, se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Después se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 450 nm. Previamente se realizó una curva estándar y obtuvo la fórmula de la regresión lineal para extrapolar las absorbancias al número de trofozoítos. El uso del reactivo WST-1 está basado en el procesamiento metabólico del WST-1, ya que es una sal de tetrazolium que al ser metabolizada por ciertas enzimas de la célula, convierten el WST en formazan que cambia de color el medio. La absorbancia es proporcional al número de células vivas.

6.4 Microscopia electrónica de transmisión

Se observaron por microscopia electrónica de transmisión los trofozoítos que fueron tratados con las sales biliares DC y GC. Estas sales fueron las seleccionadas ya que tuvieron un efecto más representativo sobre las amibas. Después de interaccionar las amibas con las sales durante 48 h los trofozoítos fueron fijados en 2.5% (v/v) de glutaraldehído en 0.1 M de amortiguador de cacodilato de sodio pH 7.2 por 60 minutos. Después se post-fijaron con tetróxido de osmio en el mismo amortiguador. Posterior a esto se deshidrataron las muestras en concentraciones crecientes de etanol (30, 50, 70, 90, 96% y dos veces en absoluto) y óxido de propileno. Las muestras se incluyeron en resina epóxica y se polimerizaron a 60 °C durante 24 h. Se hicieron cortes ultrafinos de 60-90 nm usando el ultramicrotomo, fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron con el microscopio electrónico de transmisión (Zeiss, Mod. 910)

6.5 Microscopia electrónica de barrido.

Para microscopia electrónica de barrido los trofozoítos fueron incubados con las sales (DC y GC) durante 48 h, posterior a la incubación se pusieron los trofozoítos (2.5×10^5) a interaccionar con una monocapa de células CaCo 2 (5×10^5), la interacción se llevó a cabo durante 30 minutos y posterior a esto las células fueron fijadas en 2.5 % (v/v) de glutaraldehído en 0.1 M de cacodilato de sodio durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después se realizaron dos lavados con el amortiguador de cacodilato de sodio para quitar el exceso de fijador. Posterior a los lavados, se comenzó un tren de deshidratación en concentraciones crecientes de etanol (25, 50, 70, 90 % y alcohol absoluto. Después de la deshidratación se secaron a punto crítico para después ser recubiertas con oro.

6.6 Virulencia de *E. histolytica*.

Para determinar el efecto de las sales biliares en la virulencia de la amiba se midió el efecto citopático sobre células CaCo2 (*in vitro*) y la formación del absceso hepático amibiano en hamsteres (*in vivo*).

Los trofozoítos se cultivaron con las sales DC y GC a las concentraciones de 50 μM y 400 μM respectivamente durante 48 horas para los ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*.

6.6.1 Efecto citopático

Para medir el efecto citopático se creció una monocapa de células CaCo2 en placas de 24 pozos (5×10^5) las cuales se incubaron con 2.5×10^5 trofozoítos previamente tratados con las dos sales biliares mencionadas anteriormente (teniendo una relación 1:2), se incubaron durante 1 h a 37 °C. Para determinar la lisis celular, los trofozoítos se retiraron por enfriamiento y se realizaron 5 lavados con PBS frío para quitar el mayor número de trofozoítos. La monocapa se fijó con paraformaldehído al 2% durante 1 h y se realizaron dos lavados con PBS para eliminar el exceso. Posterior a esto, se tiñeron con azul de metileno al 1 % durante 10 minutos, se realizaron 3 lavados con amortiguador de boratos para quitar el exceso del colorante y se le agregó 1 ml de ácido clorhídrico 0.1 M en cada pozo y se incubó durante 30 minutos. Para finalizar se midió el porcentaje de destrucción con el espectrofotómetro a 660 nm.

6.6.2 Producción de AHA en hámster

Para evaluar el efecto de las sales biliares en la producción del AHA *in vivo*, se usaron hámsteres (*Mesocricetus auratus*) de aproximadamente 4 semanas de edad, con un peso de 100 +/- 5 gramos). Para cada tratamiento se usaron 6 hámsteres, los cuales se anestesiaron con 1.5 ml de pentobarbital sódico (Anestesal, Pfizer), por vía intraperitoneal por cada 100g de peso del animal. Se inocularon con 1×10^6 de trofozoítos vía porta, tratados previamente con las sales biliares DC (50 μM) y GC (400 μM) durante 48 h. y a los 3 días después de la inoculación se operaron los hámsteres y se extrajo el hígado para determinar y comparar el tamaño del absceso con los grupo control.

Se tomaron muestras de tejido hepático representativo que se fijaron con formol al 10% y se procesaron para inclusión en parafina para su análisis histológico.

VII. Resultados

7.1 Efecto de las sales biliares en la proliferación y viabilidad de *E. histolytica*

Para evaluar el efecto de las sales biliares sobre la proliferación y viabilidad de *E. histolytica* se probaron 3 diferentes sales: Glicolato de sodio, Desoxicólico de sodio, litocolato de sodio. Para la medición se utilizó el reactivo WST-1, el cual es una sal de tetrazolium que al ser metabolizada por enzimas del microorganismo forma otra sal denominada formazan, la cual hace que cambie el color del medio y la absorbancia medida a 450 nm es proporcional al número de células que están vivas.

Debido a que no se conoce con exactitud la concentración de las sales biliares en la circulación enterohepática, se decidió probar diferentes concentraciones, acercándonos a lo considerado como fisiológico, de acuerdo a las estimaciones que se tienen en la bilis. Debido a que algunas de las sales son hidrofóbicas se disolvieron en DMSO a una concentración final de 0.1 %, para evitar que los trofozoítos sufran un daño.

Para determinar el efecto de las sales biliares en la viabilidad y proliferación de los trofozoítos, se incubaron con diferentes concentraciones. La primera sal con la que se realizaron los ensayos fue el glicolato de sodio (GC), que es una sal conjugada y de las que se encuentran en mayor proporción en la bilis, por lo que se usaron las siguientes concentraciones 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 600 μ M, 800 μ M y 1 mM. Los cultivos se incubaron durante 0, 24, 48 y 72 h. El GC tuvo efecto sobre la viabilidad de las amibas a los primeros minutos de estar en contacto, pudiendo observarse que las concentraciones de 600 μ M, 800 μ M y 1 mM fueron las que tuvieron un mayor efecto en la viabilidad del cultivo (fig. 1), conservando un 80, 70 y 40 % respectivamente. Los cultivos incubados durante 24, 48 y 72 h mostraron diferentes patrones en la viabilidad que dependían de la concentración de las sales biliares, de manera particular, la concentración de 400 μ M tuvo efecto sobre la viabilidad de los trofozoítos hasta las 48 y 72 h, a pesar de que a 0 y 24 h se mantenía casi al 100 %.

El DMSO no produjo ningún cambio significativo comparándolo con el grupo de amibas sin tratamiento (control), lo cual nos indica que el efecto sobre la viabilidad de los trofozoítos no es dada por el vehículo sino es propia del GC.

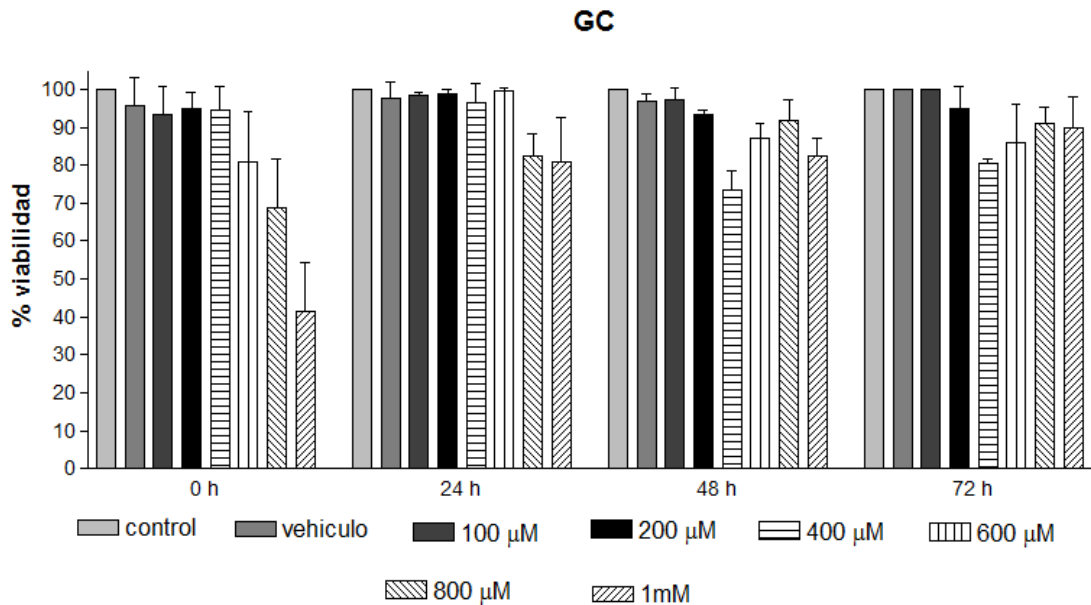


Figura 14. Efecto del glicolato de sodio (GC) en la viabilidad de *E. histolytica*. El ensayo de viabilidad se realizó utilizando el WST-1 y a diferentes concentraciones de GC. Se incubaron los trofozoítos a diferentes tiempos: 0 h, 24 h, 48 h y 72 h a 37 ° C. Como controles se usaron amibas sin tratamiento y amibas incubadas con el vehículo (DMSO 0.1 %). Las concentraciones de 600 µM, 800 µM y 1 mM de GC muestran el mayor efecto sobre la viabilidad al tiempo 0, la concentración de 400 µM tuvo efecto hasta las 48 y 72 h de incubación, disminuyendo su viabilidad hasta el 72 y 80 % respectivamente.

El efecto del GC sobre la proliferación de *E. histolytica* se muestra en la figura 15, donde la gráfica nos muestra que ninguna de las concentraciones a los diferentes tiempos de incubación promovió un incremento en el número de trofozoítos, esto comparándolo con los controles. Lo que podemos observar en la gráfica es que el cultivo incubado con la concentración de 400 µM durante 72 h no muestra un cambio significativo con el de 48 h, sugiriendo que se estuviera inhibiendo el crecimiento a esos tiempos. Esta gráfica nos explica por qué en la gráfica de viabilidad se ve afectada a estos tiempos, no fue un efecto en la viabilidad si no en el proceso de multiplicación. Para los siguientes ensayos se utilizó la concentración de 400 µM, para determinar si tiene efecto sobre la morfología y virulencia de *E. histolytica*.

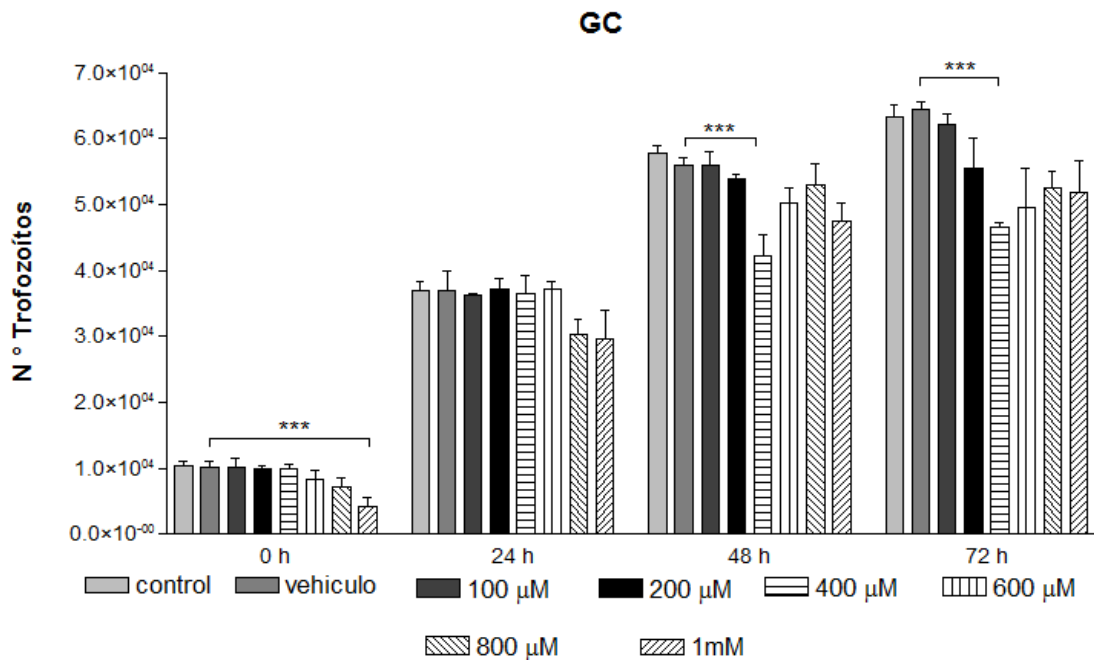


Figura 15. Efecto del glicolato de sodio (GC) en la proliferación de *E. hitolytica*. Los trofozoítos fueron tratados con diferentes concentraciones de GC y fueron incubados a diferentes tiempos a 37 ° C. El número de trofozoítos se obtuvo utilizando el reactivo WST-1. Los controles que se utilizaron fueron amibas sin tratamiento y amibas incubadas con el vehiculo. Ninguna de las diferentes concentraciones de esta sal tuvo efecto sobre la proliferación de las amibas. La concentración de 400 µM tuvo aparentemente un efecto inhibitorio en el crecimiento de la amiba después de estar incubándola durante 48 y 72 h. Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos independientes. *** ($p < 0.001$).

El desoxicolato de sodio (DC) es una sal secundaria que se sintetiza en el colon mediante la biotransformación bacteriana del colato de sodio. En la bilis, aproximadamente el 20 % es DC por lo que se decidió usar las siguientes concentraciones: 6, 12, 25, 50, 75, 100 y 150 µM y se incubaron a 0, 24, 48 y 72 h. La figura 16 nos muestra el efecto del DC en la viabilidad de los trofozoítos, podemos observar que esta sal a concentraciones menores de 200 µM tiene un efecto significativo en la viabilidad, siendo la de 150 µM la más dañina para los trofozoítos. La gráfica muestra a 0 h que el DC tiene un efecto dosis dependiente a partir de la concentración de 25 µM. A las 24 y 48 h se pudo observar de la misma manera el efecto dosis-dependiente pero con diferentes % de viabilidad y a las 72 h, se observó que las concentraciones de 6 y 12 µM tuvieron un efecto sobre la viabilidad y la

concentración de 50 μM mostró un comportamiento similar al de los controles, a pesar que en los tiempos anteriores se había visto afectada.

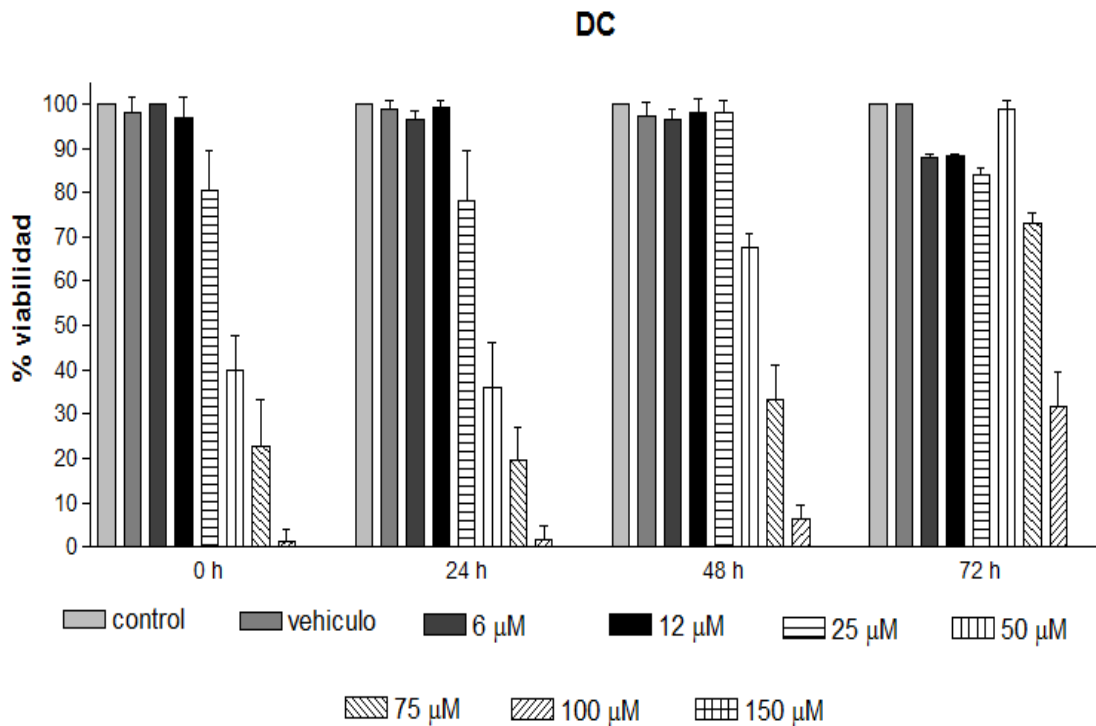


Figura 16. Efecto del desoxicolato de sodio (DC) en la viabilidad de *E. histolytica*. El ensayo de viabilidad se llevó a cabo utilizando el WST-1 y se utilizaron diferentes concentraciones del desoxicolato de sodio (DC), los trofozoítos se incubaron a 0 h, 24 h, 48 h y 72 h a 37 ° C. Como controles se usaron amibas sin tratamiento y amibas incubadas con el vehículo (DMSO 0.1 %). Se observa un efecto dosis-dependiente a partir de la concentración de 25 μM a 0, 24 y 48 h. A las 72 h el efecto dosis-dependiente ya no se observa, la concentración de 50 μM no tuvo efecto sobre la viabilidad, en cambio las concentraciones de 6 y 12 μM tuvieron aproximadamente un 85 % de viabilidad.

El efecto del DC en la proliferación se muestra en la figura 17. Se observa que aparentemente no hay un incremento en la proliferación de los trofozoítos, ya que ninguna de las concentraciones rebasó el número de trofozoítos de los controles. Las concentraciones de 100 y 150 μM , a pesar de que afectaron la viabilidad de los trofozoítos a 0 h 80 y 95 % respectivamente, se observa que siguieron creciendo conforme pasaron los tiempos de incubación, este crecimiento se observa de manera normal teniendo en cuenta que a 0 h hay 10,000 trofozoítos, a las 24 h 30,000, a las 48 h 50,000 y a las 72 h 60,000, esto en los controles. Las concentraciones de 6, 12 y 25 μM tuvieron un efecto inhibitorio sobre los trofozoítos después de las 48 h, ya que

se obtuvo el mismo número de trofozoítos a las 72 h a pesar de que a 0, 24 y 48 h se comportaron igual que los controles. Dato interesante es que la concentración de 50 μM muestra un crecimiento parecido al de los controles a las 72 h, a pesar de que a las 0 h, el número de trofozoítos era mucho menor que el de los controles aproximadamente un 60 % menos, por lo que para los siguientes ensayos se utilizó esta concentración.

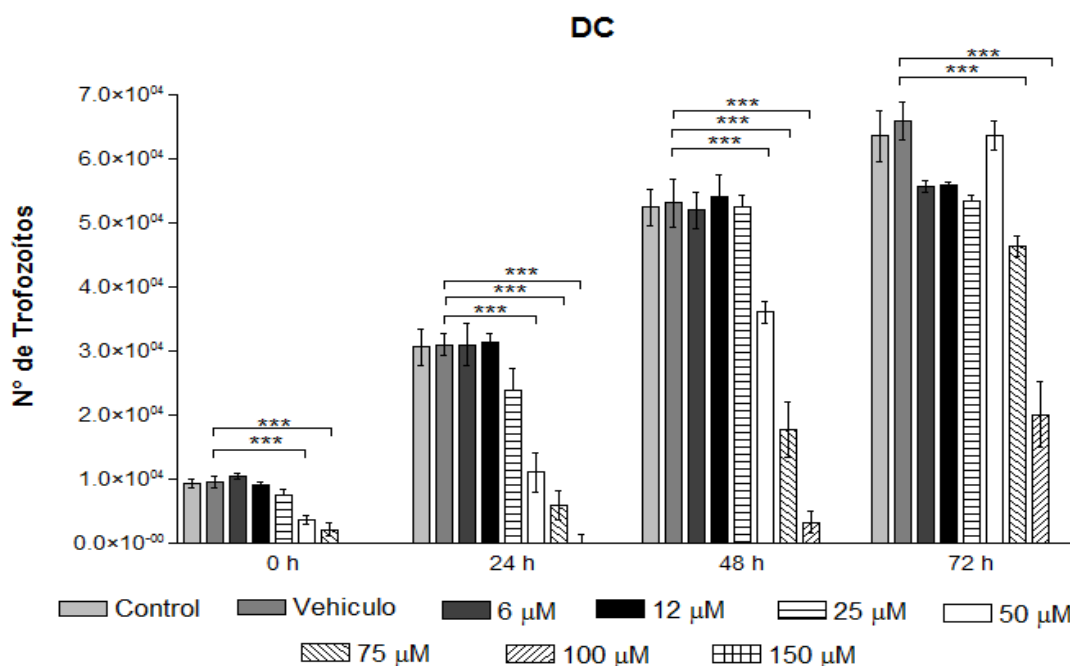


Figura 17. Efecto del desoxicolato de sodio (DC) en la proliferación de *E. histolytica*. Los trofozoítos fueron tratados con diferentes concentraciones de DC y fueron incubados a diferentes tiempos a 37 °C. El número de trofozoítos se determinó utilizando el reactivo WST-1. Los controles que se utilizaron fueron amibas sin tratamiento y amibas incubadas con el vehículo. Ninguna de las diferentes concentraciones tuvo un efecto proliferativo en los trofozoítos. La concentración de 50 μM disminuyó el número de trofozoítos a las 0 h, y conforme pasó el tiempo los trofozoítos incubados con esta concentración siguieron creciendo, y a las 72 h había la misma cantidad de trofozoítos que los controles. En las concentraciones de 6, 12 y 25 μM se observa que ya no proliferaron más después de las 48 h. Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos independientes. ** ($p < 0.01$) *** ($p < 0.001$).

El litocolato (LC) es una sal secundaria que de igual manera que el DC se sintetiza en el colon mediante una biotransformación bacteriana a partir del glicoquenodesoxicolato. De las 3 sales biliares el LC es la más hidrofóbica y la que se encuentra en menor proporción en el humano, por lo tanto se usaron las siguientes concentraciones: 6, 12, 25, 50, 75, 100 y 150 μM para ver qué efecto tenía sobre la viabilidad y proliferación de los trofozoítos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 18, donde la gráfica nos muestra el efecto del LC en la viabilidad. A 0 h se observa que las concentraciones de 75, 100 y 150 μM afectaron la viabilidad de los trofozoítos, disminuyéndola a 70, 50 y 35 % respectivamente. A las 24 h se aprecia que las dos concentraciones más altas 100 y 150 μM tienen un efecto muy similar en la viabilidad, disminuyéndola hasta el 20 y 18 % respectivamente. A las 48 h se observa que el % de viabilidad cambia en las concentraciones más altas y a las 72 h observamos que la viabilidad en todas las concentraciones son similares a la de los controles.

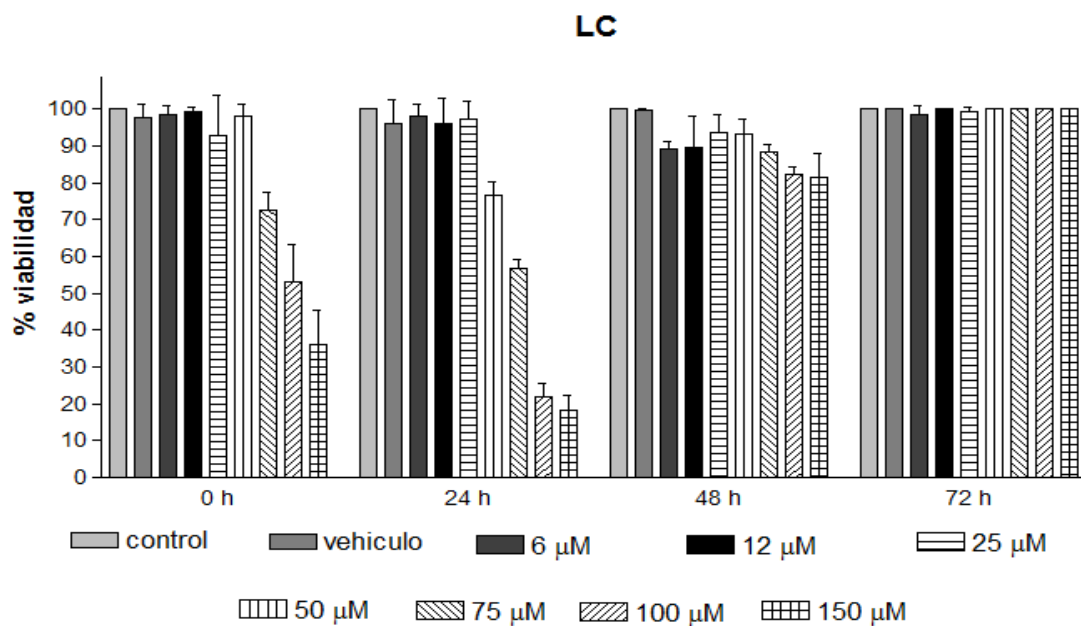


Figura 18. Efecto del litocolato en la viabilidad de *E. histolytica*. El ensayo de viabilidad se llevó a cabo utilizando el WST-1 y se utilizaron diferentes concentraciones del litocolato (LC), los trofozoítos se incubaron a 0 h, 24 h, 48 h y 72 h a 37 ° C. Como controles se usaron amibas sin tratamiento y amibas incubadas con el vehículo (DMSO) 0.1 %. Las concentraciones de 75, 100 y 150 μM tienen un efecto inmediato sobre la viabilidad de los trofozoítos, a las 48h la concentración de 50 μM de LC tuvo efecto sobre la viabilidad. A las 72 h la viabilidad se mantiene casi al 100 % en todas las concentraciones.

El efecto del LC en la proliferación se muestra en la figura 19. A 0 h no se observa ningún efecto proliferativo, y sólo se muestra el efecto que tuvo la sal sobre la viabilidad de los trofozoítos. A las 24 h, de igual manera no se ve un incremento significativo en el número de trofozoítos. A las 48 h se aprecia un incremento en el número de amibas en los cultivos tratados con 100 y 150 μM de LC que va de aproximadamente 10,000 trofozoítos a 45,000 en 24 h, Esto comparándolo con los controles, donde de aproximadamente 30,000 trofozoítos llegan a 50,000 en 24 h. A las 72 h los cultivos incubados con 100 y 150 μM tuvieron un mayor número de trofozoítos y la concentración de 100 μM fue la que tuvo una diferencia significativa comparándolo con el control, por lo que esta concentración pudiera estar teniendo un efecto proliferativo sobre los trofozoítos.

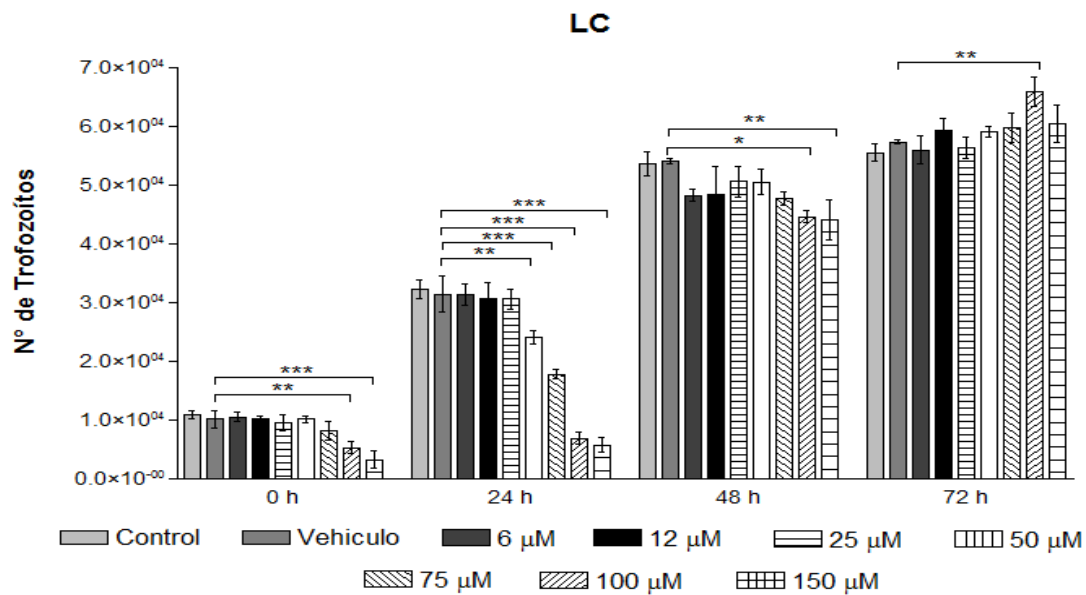


Figura 19. Efecto del litocolato (LC) en la proliferación de *E. hitolytica*. Los trofozoítos fueron tratados con diferentes concentraciones de LC y fueron incubados a diferentes tiempos a 37 ° C. El número de trofozoítos se obtuvo utilizando el reactivo WST-1. Los controles que se utilizaron fueron amibas sin tratamiento y amibas incubadas con el vehículo. Los trofozoítos tratados con 100 μM de LC tuvieron un efecto proliferativo de 24 h a 48 h de incubación y a las 72 h el número de amibas con esta concentración fue mayor que en los controles. La concentración de 150 μM se observa que tuvo un efecto similar al de los cultivos con la concentración de 100 μM , excepto que a las 72 h no hay diferencia significativa con los controles. Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos independientes. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

7.2 Efecto de las sales biliares en la morfología y ultraestructura de *E. histolytica*.

Con base al efecto que se observó en los ensayos de viabilidad y proliferación sobre los trofozoítos de *E. histolytica*. Se decidió analizar los posibles cambios producidos por las sales biliares en su morfología. Para este ensayo usamos las tres sales biliares a diferente concentración: DC 50 μ M, LC 100 μ M, GC 400 μ M. También se usaron dos controles: trofozoítos s/Tx y trofozoítos más el vehículo. Se sembraron 10,000 trofozoítos por pozo en cajas de 96 pozos, posteriormente se agregó el vehículo (DMSO 0.1 %) y las diferentes sales biliares. Los trofozoítos se dejaron incubar durante 0, 24 y 48h. El tiempo de 72 h no se tomó en cuenta debido a que no se podían ver diferencias y la mayoría de las amibas tenían una forma circular (foto no mostrada). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio invertido, con campo claro y contraste de fases.

Aunque el estudio de los cultivos con microscopio invertido no permitió la observación de alteraciones individuales de los amibas, se pudo determinar la extensión de daño, lisis o muerte celular producida por cada uno de los grupos (Fig. 20). En el caso del DC y el LC a 0h, se observaron varios trofozoítos muertos lo que concuerda con lo que se obtuvo en los ensayos de viabilidad y proliferación (Fig. 20C y 20D). A las 24 h ya no se observan células muertas, y solo se aprecia el aumento en el número de células en los dos controles y el GC (Fig. 20 F-J). A las 24 h Los trofozoítos tratados con DC y LC muestran un número similar al de 0h (Fig. 20H y 20I). A las 48 h se muestra que las amibas en los controles empiezan a proliferar por encima de los trofozoítos que están adheridos, formando grumos (Fig. 20K y 20L). En los trofozoítos tratados con las sales y la poca resolución del microscopio invertido, no se observan cambios en la morfología, aunque se aprecia un aumento en el número de trofozoíto tratados con el DC y el LC indicando que a pesar del daño ocasionado se siguieron multiplicando (Fig. 20M-Ñ).

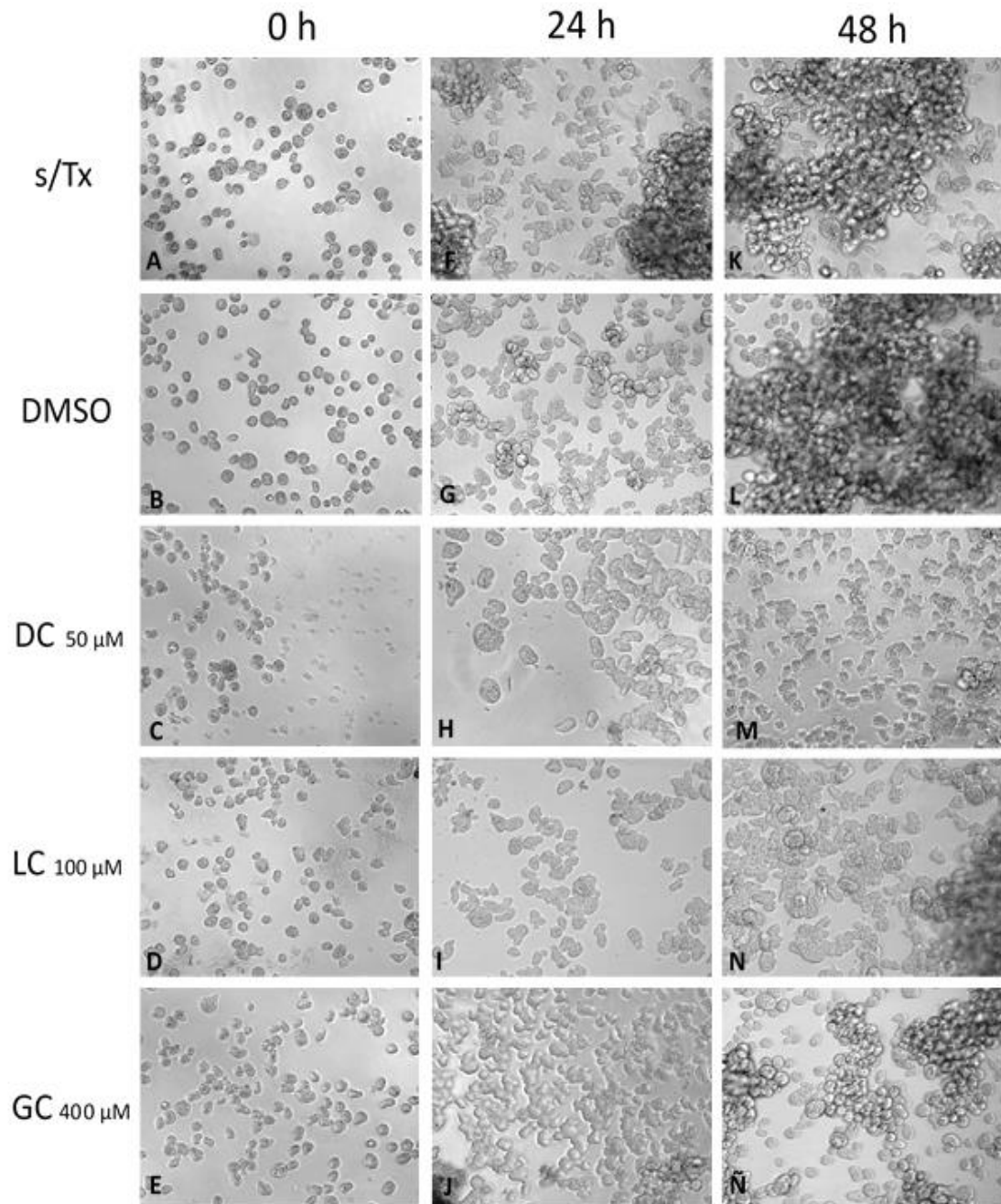
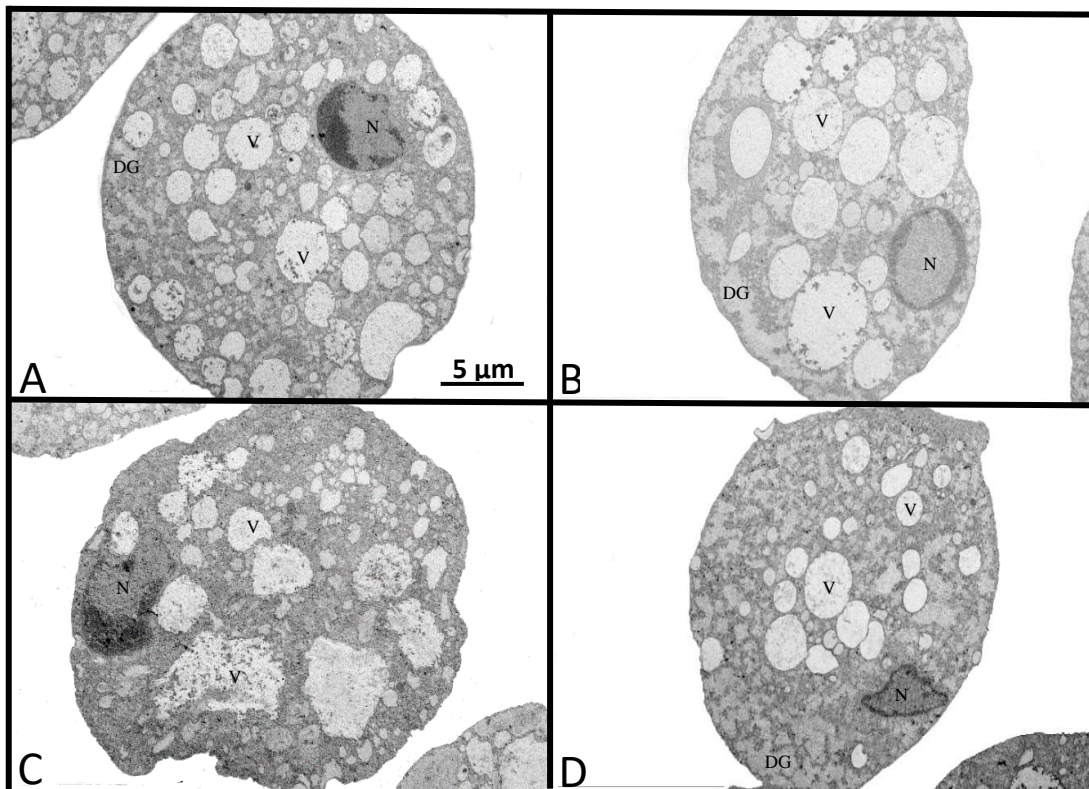


Figura 20. Efecto de las sales biliares en la morfología de *E. hitolyca*. Se incubaron los trofozoítos con las diferentes sales biliares y observar algún cambio morfológico en las amibas. Trofozoítos s/Tx (A, F y K). Trofozoítos incubados con el vehículo (B, G y L). Trofozoítos incubados con DC 50 μ M (C, H y M). Trofozoítos incubados con LC 100 μ M (D, I y N). Trofozoítos incubados con GC 400 μ M (E, J y Ñ).

Se realizó un análisis ultraestructural de los trofozoítos de *E. histolytica* después de interactuar con sales biliares. Los trofozoítos se incubaron 48 h con DC (50 μ M) y GC (400 μ M), posteriormente se procesaron para su observación con el microscopio electrónico de transmisión (MET) (Figura 21). Los trofozoítos s/Tx mostraron una ultraestructura con características similares, tal como han sido descritas anteriormente por otros autores. Mostraron abundantes vacuolas de diferentes dimensiones, con discreto contenido fibrilar. El citosol con granulos de glucógeno. Núcleo con cromatina periférica y aspecto normal (figura 21A). Los trofozoítos incubados sólo con el vehículo (DMSO) mostraron de igual manera una ultraestructura normal similar al 21A, aunque con un número de vacuolas menor, ligeramente de mayores dimensiones y con menor cantidad de glucógeno citoplásmico (figura 21B). Los trofozoítos incubados con el DC (figura 21C) mostraron un gran número de vacuolas, de diferentes dimensiones, con contornos irregulares y algunas con contenido granular. El núcleo se observó normal con la cromatina condensada cerca de la membrana nuclear. Los trofozoítos incubados con GC (figura



21D) presentaron en general un número menor de vacuolas, una disminución en los depósitos de glucógeno y el núcleo se mostraba con características normales.

Figura 21. Efecto de las sales biliares en la ultraestructura de los trofozoítos de *E. histolytica*. Los trofozoítos incubados con las sales biliares durante 48 h se procesaron para MET. A) Trofozoíto s/Tx. B) trofozoíto incubado sólo con el vehículo DMSO. C) trofozoíto incubado con 50 μ M de DC. D) trofozoíto incubado con 400 μ M de GC.
N= núcleo
V= vacuola
DG= depósitos de glucógeno

7.3 Efecto de las sales biliares en la virulencia de *E. histolytica* *in vitro* e *in vivo*

Para determinar el posible efecto de las sales biliares sobre la virulencia de *E. histolytica*, se realizaron dos tipos de experimentos; uno *in vitro* que fue el efecto citopático sobre células CaCo 2 y uno *in vivo* el cual se llevó a cabo mediante la inoculación vía porta de trofozoítos en hámsteres adultos de aproximadamente 1 mes de vida. En el experimento *in vitro* los trofozoítos fueron expuestos durante 48 h con las diferentes sales biliares: GC 400 μM , DC 50 μM y LC 100 μM , se usaron estas concentraciones ya que fueron las más relevantes en los ensayos de proliferación y viabilidad.

7.3.1 Efecto citopático

Después de que los cultivos de trofozoítos se incubaran durante 48 h con las diferentes concentraciones de las sales biliares, se pusieron a interactuar con la monocapa de células CaCo 2. El tiempo de interacción de los trofozoítos con las células fue de 1 h, posterior a esto se hicieron lavados con PBS frío para eliminar a los trofozoítos de la monocapa, posteriormente las células se tiñeron con azul de metileno y se expusieron a HCL para que liberaran el colorante que absorbieron. El daño a la monocapa de células CaCo 2 fue determinado en base a la absorbancia que nos dio el colorante azul de metileno a 650 nm.

Para este ensayo (Fig. 22) se usaron dos controles: trofozoítos sin tratamiento y trofozoítos incubados sólo con el vehículo. El porcentaje de destrucción producido por cualquiera de los controles fue del 75 %, esto comparándolo con la monocapa íntegra. Los trofozoítos incubados con 50 μM de DC destruyeron un 96 % de la monocapa, un 21 % más que los controles. Los trofozoítos incubados con 100 μM de LC destruyeron hasta un 91 % de la monocapa, un 16 % más que los controles y los trofozoítos incubados con 400 μM de GC destruyeron un 56 % de la monocapa, 19 % menos que los controles. Con estos resultados obtenidos elegimos al DC 50 μM y GC 400 μM para los experimentos de análisis morfológico y de virulencia *in vivo* ya que fueron los que tuvieron una mayor diferencia significativa con los controles ($p < 0.001$)

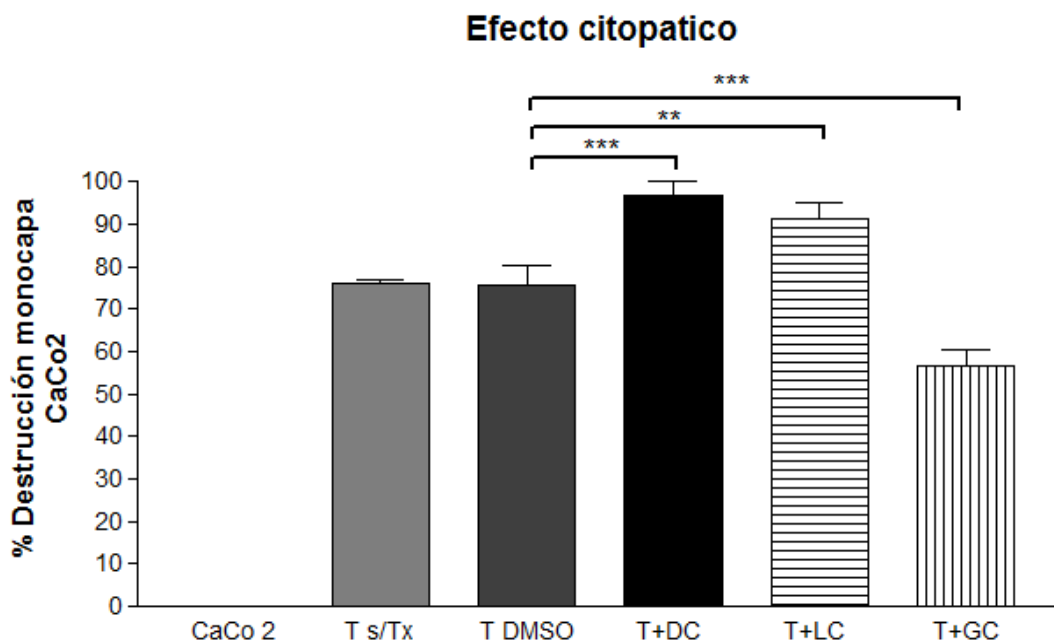


Figura 22. Efecto de las sales biliares en la virulencia de *E. histolytica* in vitro. El efecto citopático fue realizado en una monocapa de células CaCo 2 interaccionando 1 h con los trofozoítos previamente incubados 48 h con las diferentes sales biliares. Se utilizaron dos controles: trofozoítos s/Tx y trofozoítos c/DMSO. Ambos controles mostraron un 75 % de destrucción de la monocapa, el DC (50 μ M) tuvo un 96 % de destrucción de la monocapa, el LC (100 μ M) mostró un 91 % de destrucción y el GC (400 μ M) disminuyó el porcentaje de destrucción a 56 %. Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos independientes. ** ($p < 0.001$), *** ($p < 0.001$).

Las muestras del efecto citopático fueron procesadas para observarse por microscopia electrónica de barrido (MEB) para poder determinar los posibles cambios en la morfología y el modo de acción de los trofozoítos tratados con las diferentes sales biliares hacia la monocapa de células CaCo 2 (Fig. 23). Para apreciar el proceso de invasión o destrucción de la monocapa, este estudio se realizó durante una interacción temprana, siendo ésta a los 30 minutos. Podemos observar la monocapa de células CaCo 2 íntegra antes de la interacción con los trofozoítos (Figura 23A). También podemos ver los trofozoítos interaccionando con la monocapa, observando como generan el daño (Figura 23B, C), en ambos controles se observa como los trofozoítos están fagocitando a las células y se aprecian espacios ya sin células que corresponden a zonas líticas. En los trofozoítos tratados con el DC (50 μ M) se puede observar un mayor número de trofozoítos en la zona de daño y la mayoría se puede

ver que están fagocitando, dando la apariencia de que están más activas. Por el contrario los trofozoítos tratados con el GC (400 μ M) se puede apreciar que gran parte de las amibas están sin fagocitar y muchas se encuentran encima de la monocapa íntegra, sin causarle mucho daño. Se puede apreciar una zona de daño, pero de menor extensión comparándola con los controles y los trofozoítos tratados con el DC.

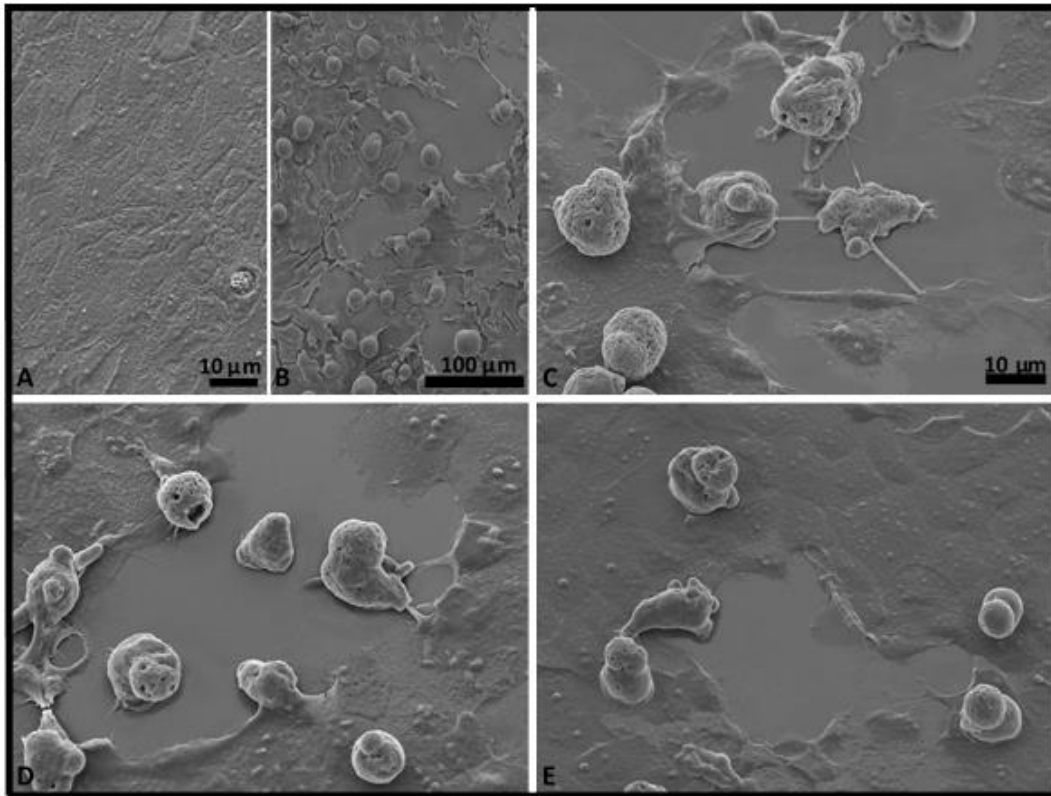


Figura 23. Efecto citopático de *E. histolytica* en células CaCo 2. El efecto citopático fue realizado en una monocapa de células CaCo 2 interaccionando durante 30 minutos con los trofozoítos. Los cultivos fueron fijados y procesados para observarse en MEB. A) Monocapa de células CaCo 2. B) trofozoítos s/Tx interaccionando con la monocapa. C) trofozoítos incubados con el vehículo (DMSO) interaccionando con las células. D) trofozoítos incubados durante 48 h con 50 μ M de DC interaccionando con la monocapa. E) trofozoítos incubados durante 48 h con 400 μ M de GC interaccionando con la monocapa.

En la figura 24 se observan los trofozoítos de manera individual a un mayor aumento. El trofozoíto s/Tx (Fig. 24A) muestra una enorme boca fagocítica ingiriendo una célula dañada de la monocapa de células CaCo2. La superficie del trofozoíto muestra pequeños poros, y alrededor del parásito hay una zona de lisis limitada por células de la monocapa dañada. En la figura 24B se observa un trofozoíto incubado sólo con el vehículo (DMSO 0.01 %). El parásito muestra también una sola boca fagocítica ingiriendo un fragmento de célula de la monocapa. Presenta también un espacio sin células alrededor del parásito de aspecto lítico. El trofozoíto tratado con 50 μ M de DC e incubado con la monocapa de células CaCo2 (Fig. 24C) muestra múltiples proyecciones citoplásmicas con varias bocas fagocíticas mostrando un aparente mayor actividad fagocítica. La zona periparasitaria está igualmente dañada con espacios limitados irregularmente por células de la monocapa. Los trofozoítos incubados con 400 μ M de GC (Fig. 24D) e interaccionados con la monocapa de células CaCo2 muestran proyecciones citoplásmicas tipo pseudópodos y bocas fagocíticas inactivas. Los trofozoítos tratados con esta sal biliar (GC) frecuentemente formaban agrupaciones de varias amibas adheridas sobre la superficie de la monocapa, sin ocasionar un daño aparente a la monocapa (inserto figura Fig. 24D).

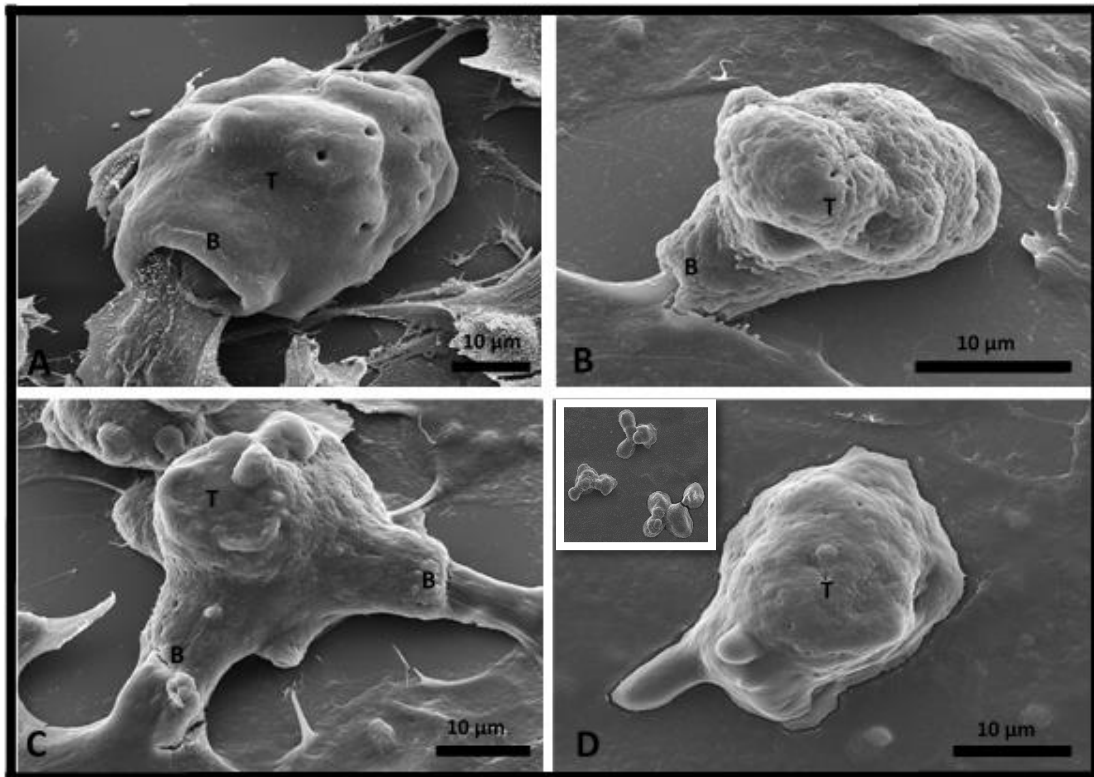


Figura 24. Efecto de trofozoítos de *E. histolytica* tratados con sales biliares sobre células CaCo2, durante 30 min. Los cultivos fueron procesados para estudio con el MEB. A) Trofozoíto S/Tx, B) trofozoítos incubados sólo con el vehículo, C) trofozoítos incubados durante 48 h con 50 µM de DC, D) trofozoítos incubados durante 48 h con 400 µM de GC.

T= Trofozoíto

B= boca fagocítica

7.3.2 Efecto de las sales biliares en la formación de absceso hepático amibiano

Para el estudio del efecto de la sales biliares en la formación de absceso hepático se usaron trofozoítos incubados 48 h con dos sales biliares seleccionadas, escogimos el DC (50 µM) por haber tenido un mayor efecto citopático *in vitro* y el GC (400 µM) que presentó una disminución en el efecto citopático. Después de que los trofozoítos se incubaran durante 48 h con dichas sales biliares, se procedió a anestesiarse los hamsters para posteriormente inocular los trofozoítos (1×10^6) vía porta. El sacrificio de los animales inoculados se realizó a los 3 días. Como grupos control, se inocularon animales con trofozoítos sin tener tratamiento con alguna sal y otro grupo, con trofozoítos tratados sólo con el vehículo de la sal biliar empleada.

Inicialmente, se obtuvieron los hígados de los hámsteres para hacer en análisis macroscópico, se tomaron muestras representativas del daño hepático y se procesaron para el estudio histológico. La observación macroscópica inicial del hígado reveló que el daño al órgano estaba aparentemente más avanzado que lo que se esperaba en lesiones presentes a los 3 días post-inoculación, sugiriendo que la cepa de trofozoítos utilizada estaba extremadamente virulenta. En la figura 25 se presentan imágenes macroscópicas de los hígados inoculados con los diferentes sales y sacrificados a los 3 días. En todos los casos, incluyendo en los controles y con las sales biliares, presentaron lesiones granulosa blanco-amarillentas y difusas, mayormente cercanas a la zona hilar hepática. Este tipo de lesión no permitió la determinación exacta de la extensión de las lesiones para determinar con exactitud el peso y el porcentaje de daño en cada uno de los grupos, no pudiendo determinar si existió diferencias significativas entre los grupos.

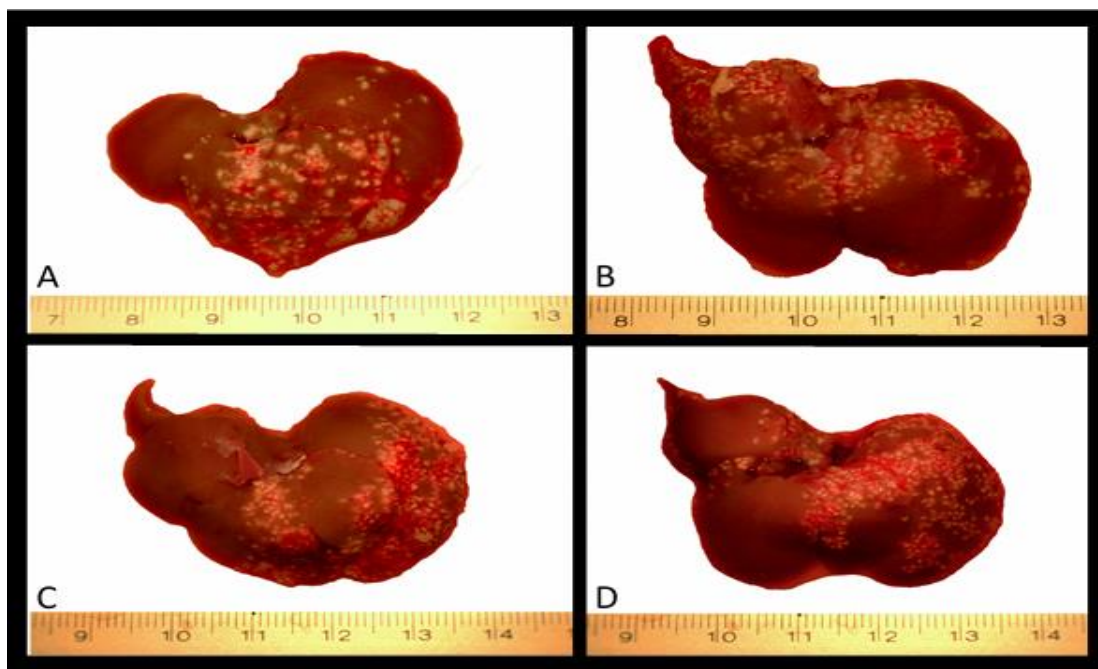


Figura 25. Efecto de las sales biliares en la formación de absceso hepático amibiano. Después de haber inoculado a los hámsteres con trofozoítos de *E. histolytica* de diferentes condiciones, se sacrificaron a los 3 días. A) trofozoítos s/Tx. B) trofozoítos mas el vehículo. C) trofozoítos incubados con DC 50 μ M. D) trofozoítos incubados con GC 400 μ M. las imágenes que se muestran son representativas de cada condición.

De los hígados que se obtuvieron se tomaron fragmentos representativos del daño para histología. Lo que pudimos observar es que aunque la extensión del daño necrótico fue similar entre las diferentes condiciones (Fig. 26), las lesiones granulomatosas mostraron ciertas diferencias. Así mientras los dos controles (26A y 26B) presentaron granulomas bien limitados rodeando claramente tejido necrótico, el animal que fue inoculado con trofozoítos tratados con DC 50 μ M (26C) mostro zonas con lesiones granulomatosas irregularmente limitadas y rodeando tejido necrótico eosinófilo más extenso. Las lesiones granulomatosas en el hígado de hámster inoculado con trofozoítos tratados con GC 400 μ M (26D), fueron relativamente más pequeños, pero con un aumento en el infiltrado inflamatorio. En todos los casos, se observaron trofozoítos viables, principalmente en la periferia de los granulomas. Los datos anteriores nos sugieren la necesidad de establecer un modelo de AHA que desarrolle lesiones más pequeñas, que permita diferenciar con mayor exactitud entre los grupos de animales. Lo anterior podría realizarse utilizando inóculos de amibas más bajos, sacrificios en tiempos más cortos, o utilizar otra cepa de amibas que se hayan considerado de virulencia baja.

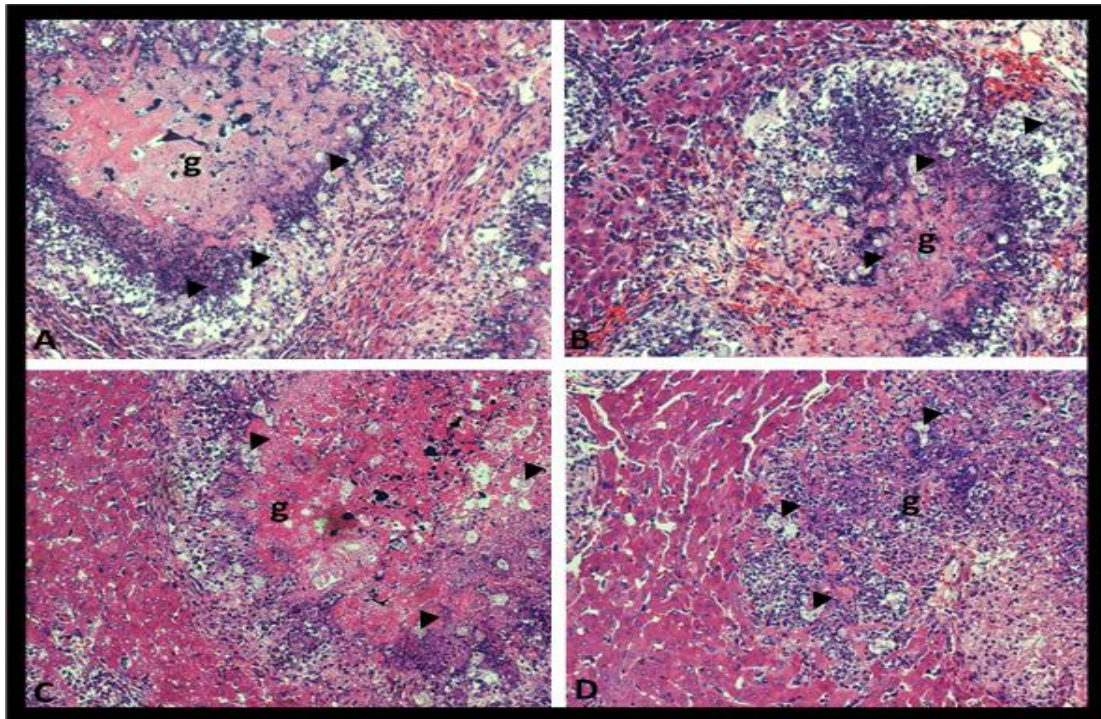


Figura 26. Cortes histológicos de los hígados tratados con las diferentes sales biliares. Se realizó la histología de los hígados tratados con las diferentes condiciones, esperando encontrar diferencias entre ellos. A) Granuloma generado por trofozoítos s/Tx. B) granuloma formado por trofozoítos tratados con el vehículo. C) granuloma generado por trofozoítos tratados con DC 50 μ M. D) formado por trofozoítos tratados con GC 400 μ M. las imágenes son representativas de lo que se observó en cada condición.

g= granuloma

Flechas= amibas

VIII. Discusión

En la actualidad se conocen muchos aspectos del parásito protozoario *E. histolytica*, como su morfología, mecanismos de patogenicidad, su regulación genética y es un buen modelo de estudio para entender mecanismos celulares y moleculares que ocurren en otros organismos. Este parásito es el agente etiológico de la enfermedad infecciosa en el humano que conocemos como amibiasis y que es un padecimiento que se caracteriza por ocasionar diarreas disentéricas (amibiasis intestinal) que si no se trata adecuadamente puede llegar a complicarse causando lo que se conoce como amibiasis extraintestinal, siendo el absceso hepático amibiano el más común (Perez-Tamayo, 2006). A pesar de que existen tratamientos eficaces para eliminar el parásito, los casos de amibiasis son todavía muy frecuentes en nuestro país y en lo que va del año, la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud reporta hasta la semana 25: 107,822 personas diagnosticadas de amibiasis intestinal que es la forma más común de la enfermedad, y 255 personas diagnosticadas con absceso hepático amibiano (DGE, 2017). Así, a pesar que en los últimos años ha disminuido el número de personas con amibiasis, ésta sigue siendo un problema de salud pública en México, en donde influyen distintos factores, tanto culturales como socioeconómicos. La amibiasis intestinal, se considera que aproximadamente el 90 % de los casos son asintomáticos, esto sugiere que mucho de los individuos, aunque estén infectados, los trofozoítos que se encuentran en el intestino no causan aparentemente daño, pero aún siendo considerados como portadores asintomáticos, estarían liberando de manera recurrente, quistes por las heces, siendo esto uno de los mayores problemas para poder erradicar totalmente la enfermedad en nuestro país (Perez- Tamayo, 2006).

A pesar que se conocen muchos aspectos que están involucrados en los mecanismos de patogenicidad de este parásito, todavía se desconocen los factores que influyen para que se desarrolle o no la enfermedad amibiana. Pueden estar involucrados factores del hospedero (estado nutricional, respuesta inmune, microbiota intestinal) o factores del parásito (virulencia, capacidad de adaptarse al microambiente del

intestino). Se han estudiado diferentes aspectos que pudieran estar influenciando el desarrollo o no de la enfermedad, tales como las bacterias intestinales que sugieren que aumenta la virulencia del trofozoíto (Mirelman, 1987), o la relación del absceso hepático con la hipocolesterolemia (Flores *et. al.*, 2014), entre otros. También se han asociado a factores del parásito como la producción de moléculas antioxidantes (Pacheco-Yeppez *et. al.*, 2014) y la capacidad de evadir la respuesta inmune. Así, aunque se conocen varios de los factores que pudieran estar influyendo en el desarrollo o no de la enfermedad, el tema sigue siendo de interés y mucho de las investigaciones actuales están dirigidas a estos aspectos.

Los trofozoítos presentes en el intestino, están seguramente en un ambiente en donde interaccionan con diferentes sustancias y moléculas, las cuales podrían influir en el desarrollo del parásito en el intestino. Una de estas moléculas es la bilis, que es sintetizada y secretada por los hepatocitos hacia la vesícula biliar, y posteriormente pasarían a la luz intestinal, constituyendo de alguna forma como componente del microambiente intestinal (Timmons y Tallitsch, 2009).

La bilis está compuesta por diferentes compuestos orgánicos como sales biliares, fosfolípidos, colesterol, iones y minerales. La función de la bilis es ayudar a la digestión y absorción de las grasas ingeridas por la dieta (Timmons y Tallitsch, 2009). Estas funciones son llevadas a cabo por las sales biliares que son moléculas anfipáticas, esta característica le da la capacidad de formar micelas y a ciertas concentraciones actuar como detergentes. Las sales biliares llevan a cabo un ciclo llamado enterohepático, el cual comienza por las síntesis de las sales en el hígado, se almacenan en la vesícula biliar y son secretadas hacia el intestino después de cada comida, ahí llevaran a cabo su función y son reabsorbidas en el íleon terminal y el colon hacia el hígado. Gracias a esta circulación, los trofozoítos pudieran estar interaccionando con las sales biliares a lo largo del intestino pudiendo ser un factor importante en el desarrollo del parásito.

Se ha estudiado el efecto de las sales biliares en otros microorganismos como en *Giardia spp*, *Crisptosporidium spp*.y algunas bacterias. En estos microorganismos se ha visto que las sales biliares influyen en la proliferación (Farthing *et. al.*, 1985) y

procesos de invasión (Feng *et. al.* 2006), también se ha visto que llegan a tener efectos citotóxicos sobre algunas células como eritrocitos (Billington *et. al.*, 1978), hepatocitos (Heuman *et. al.*, 1991) y bacterias (Sung *et. al.* 1993). Estudios en con *E. histolytica* (Yadaba y Dutta, 1973) sugieren que las sales biliares a ciertas concentraciones tienen un efecto amebicida, aunque los datos no han sido muy claros debido a que usan concentraciones que están fuera de lo fisiológico. Así, en el presente proyecto, se decidió realizar un estudio más exhaustivo y profundo para evaluar las diferentes sales biliares y su efecto en la viabilidad y proliferación de la amiba.

Nuestros resultados revelaron que las amibas expuestas con las diferentes sales biliares tienen efectos variables sobre su viabilidad. Como se observó con las 3 sales biliares GC (600, 800 μ M y 1mM), DC (75, 100 y 150 μ M) y LC (100 y 150 μ M), las concentraciones más altas que usamos tuvieron un efecto inmediato sobre la viabilidad. Principalmente el DC y LC que son consideradas más tóxicas para el ser humano, esto seguramente porque son las más hidrofóbicas químicamente y tienden a formar micelas que actúan como detergentes aún a menores concentraciones, por lo que en el organismo es importante que se tenga una buena regulación en la síntesis y eliminación de estas dos sales (Dawson y Karpen, 2014; Asghapour *et. al.*, 2015). El efecto de las sales biliares en la viabilidad de los trofozoítos ya se había reportado por Yadaba y Dutta (1973), solo que las concentraciones que manejaron los autores eran muy altas, a diferencia que en nuestros estudios se decidió emplear concentraciones consideradas como más cercanas a lo fisiológico.

Se sabe que las sales biliares a ciertas concentraciones pueden inducir proliferación y apoptosis en células de cultivo (Milovick *et. al.*, 2002). En *Giardia* se reportó un efecto proliferativo al incubar los parásitos con diferentes sales biliares (Farthing *et. al.*, 1985), donde observaron que las sales biliares aumentaban o disminuían el tiempo de duplicación que dependía de la concentración de las sales. El mecanismo efector de las sales sobre el parásito se desconoce, por lo que se requiere de estudios más finos. En *E. histolytica* se había hecho un estudio sobre el efecto de la bilis en su crecimiento (Mata-Cardenas *et. al.*, 1995) y observaron que a cierta concentración (0.24 g/l)

aumentaba el número de trofozoítos en comparación al control. Los reportes anteriores constituyeron los antecedentes y se decidió analizar en forma individual el efecto de las sales biliares.

El GC es una de las sales biliares conjugadas que se encuentran en mayor cantidad en el humano, esta sal al estar conjugada con glicina y tener tres grupos OH hacen que su estructura sea más hidrofílica, y por lo tanto menos tóxica para las células (Li y Apte, 2015). Con las diferentes concentraciones que se usaron. No se observó ningún aumento en el número de trofozoítos, incluso en ninguno de los tiempos de incubación. Lo que se pudo observar fue que incubando los trofozoítos con GC 400 μM , se observó un efecto inhibitorio en la proliferación a las 48 y 72 h de incubación, aproximadamente se mantuvo el mismo número de trofozoítos, este efecto se observó de manera similar en *Giardia* (Farthing M., 1985) donde concentraciones de 200 μM y 2 mM de taurodesoxicolato aumentaban el tiempo de duplicación, por lo tanto haciendo más lenta la multiplicación. En bacterias se ha visto que el ácido cólico puede inhibir el crecimiento, corroborando lo que observamos en nuestros resultados (Floch *et. al.*, 1970). Debido a este efecto inhibitorio en la proliferación, esta concentración de GC fue la utilizada para los siguientes ensayos.

Al hacer el estudio morfológico no observamos cambios significativos, excepto en el análisis ultraestructural donde se observó diferencias en el número y dimensiones de las vacuolas citoplásmicas. (Fig 21D). La disminución de vacuolas se ha reportado en trofozoítos tratados con diferentes compuestos amebicidas, como moléculas que se encuentran en plantas como el Resveratol y AaEaR (Pais-Morales *et al.*, 2015, Herrera-Martinez *et. al.*, 2016), en donde observaron también una disminución en la virulencia, relacionada con la disminución del número de vacuolas. En nuestros estudios, al probar el efecto del GC 400 μM , en el efecto citopático presentó una disminución en la capacidad para destruir la monocapa (19 %) (Fig. 22) lo cual podría estar relacionado con la disminución en el número de vacuolas, una disminución en la síntesis de moléculas que utiliza el parásito para destruir tejido, como son las proteasas de cisteína y amebaporos, en los cuales se ha observado que al inhibir los

genes de estas proteínas hay una disminución en el efecto citopático (Bracha, 1999). Mediante MEB logramos observar que muchos de los trofozoítos incubados con esta sal, permanecían adheridos a la monocapa sin hacerle ningún tipo de daño y con pocas bocas fagocíticas (Fig. 23E), por lo que quizás el GC pudiera estar afectado el citoesqueleto de actina, el cual sabemos que participa en diferentes procesos de la ameba como es la adhesión, secreción de proteasas, fagocitosis, motilidad, etc (Meza-Cardena *et. al.*, 2006).

El DC es un sal biliar secundario y es el tercero más abundante en el humano, esta sal biliar es más hidrofóbica que las sales biliares primarias, por lo que se considera más toxica debido a que forman micelas a una concentración menor (Li y Apte, 2015), por lo que se esperaba que afectara su viabilidad. En este caso nos interesaba el efecto proliferativo que pudiera tener esta sal, como reportó Milovic en el 2002, que usando diferentes concentraciones de DC se observaba un efecto proliferativo e inducía apoptosis, efecto que dependía de la concentración de la sal. En nuestros estudios, a pesar de que probamos diferentes concentraciones de DC, no observamos efecto sobre la proliferación, lo que se pudo apreciar fue que a pesar de que las concentraciones más altas (50, 75 y 100 μM) lisaran a más del 50 % de los trofozoítos en nuestro cultivo, estos siguieron creciendo en proporción al número de trofozoítos que sobrevivieron (fig. 17). Al incubar los trofozoítos con 50 μM de DC, observamos trofozoítos lisados y fragmentos celulares en el cultivo. En el análisis ultraestructural. Observamos que los trofozoítos incubados durante 48h con el DC, mostraban vacuolas con contornos irregulares y algunas con contenido granular, aunque no se presentaron vacuolas con membranas lisadas. El DC pudo afectar su membrana como se ha comprobado en bacterias que al ser incubadas con diferentes sales biliares dañan su membrana celular provocando su muerte (Sung *et. al* 1993). En los ensayos de virulencia observamos que el DC incrementó un 21 % la destrucción de la monocapa, por lo que los trofozoítos al estar incubadas con el DC pudieran estar en un proceso de estrés provocando que se vuelvan más virulentas. Esto se ha observado cuando los trofozoítos están en un ambiente con altos niveles de oxígeno provocando una inducción de genes (Akbar *et al.*, 2004), lo cual podría explicar el aumento en el

efecto citopático con esta sal. El DC pudiera estar teniendo influencia en el citoesqueleto de actina, ya que en las imágenes de MEB (Fig. 23D y 24C) se muestra como tienden a formar más bocas fagocíticas, pareciendo que están más activas y el citoesqueleto juega un papel importante en la fagocitosis (Meza-Cardenas *et. al*, 2006).

El LC es otra sal biliar secundaria y es considerada la más hidrofóbica debido a que solo presenta un grupo OH, por lo que se esperaba un efecto citotóxico más fuerte. Sin embargo se observó que no presentó un efecto tan dañino sobre los trofozoítos como con el DC (Fig. 18). En la gráfica 19 donde se observa el efecto en la proliferación, nos mostró un efecto proliferativo a las 48 h en los trofozoítos incubados con 100 μ M de LC, ya que de los 10,000 trofozoítos que se tenían a las 24 h aumentaron el número a aproximadamente 45,000 trofozoítos, este efecto no se observó en los controles, ya que a las 24 h hay cerca 30,000 trofozoítos y para las 48 h aproximadamente 50,000, pudiendo ser que el LC este influyendo en el ciclo celular de los trofozoítos, modulando moléculas como cíclicas, o cinasas que están envueltas en la proliferación. Este efecto es similar a lo que se observó en *Giardia* que a ciertas concentraciones de sales biliares, se disminuía el tiempo de duplicación haciendo que se multiplicaran más rápido (Farthing *et. al*, 1985).

En los diferentes parásitos que se ha visto que tienen efecto las sales biliares, se desconoce cuál es el mecanismo por el cual inducen la proliferación o el aumento en la virulencia en los microorganismos. Puede ser que exista algún receptor para sales biliares en los parásitos, como en *Giardia* (Diaz de la Guardia *et. al.*, 2011) en donde se identificó una proteína que se une a las sales biliares, la cual podría estar actuando como un transductor de señales. Aunque se desconoce si *E. hitolytica* tenga algún tipo de receptor para sales biliares, sería importante su búsqueda ya que aclararía muchos de los resultados que se obtuvieron. En los trofozoítos incubados con 100 μ M de LC no se observó ningún cambio en la morfología, ya que fue igual que los controles. Para esta sal no se realizó el análisis ultraestructural. El LC también provocó un aumento en % de destrucción de la monocapa, pudiendo ser que de igual manera este

induciendo la expresión de genes involucrados en la patogenicidad (Akbar *et. al.*, 2004) debido al estrés causado por la sal.

En los ensayos de virulencia *in vivo*, macroscópicamente no se observó ningún aumento o disminución en la formación del AHA con los trofozoítos incubados con DC y GC. Debido a que el daño se extendió por casi todo el hígado se dificultó su cuantificación. En los cortes histológicos, se observó que los controles (sin tratamiento y con DMSO) tenían el mismo daño, el tamaño del granuloma era similar y se encontraban bien delimitados. En el caso de los trofozoítos tratados con el DC se observó de igual manera la formación del granulomas de mayores dimensiones y una mayor reacción inflamatoria, sugiriendo una probable una mayor respuesta inmune sobre estos trofozoítos. En cambio, los trofozoítos tratados con el GC los granulomas se observaron más pequeños que los demás grupos. En este ensayo nosotros esperábamos observar el efecto que obtuvimos en el efecto citopático en donde el DC aumento el porcentaje de daño en la monocapa y el GC lo disminuyó. Las diferencias no fueron muy claras y esto quizás se deba a distintos factores, ya que en el modelo *in vivo* influyen muchos otros aspectos como la respuesta inmune del hospedero y el tiempo de adaptación del parásito al microambiente del hígado, entre otros factores. Otra explicación es que las condiciones del modelo que manejamos no fueron las óptimas, ya que la cepa estaba más virulenta que la observada anteriormente y/o el inóculo era demasiado alto, generando así un daño extenso en todos los casos dificultando la determinación cuantitativa del daño hepático. También la utilización, en este caso, la inoculación de los trofozoítos por la vía porta, condujo a la producción de lesiones granulosas difundidas, dificultando la cuantificación porcentual del daño. Por lo que sería interesante cambiar las condiciones del modelo experimental, ya sea disminuyendo el inóculo, cambiando la cepa por una con menor virulencia o disminuir el tiempo de evolución, además de que se usara la inoculación directa al hígado (intrahepática) de los trofozoítos. Con los resultados que obtuvimos en este trabajo podemos decir que las sales biliares tienen efecto sobre los trofozoítos, por lo que es importante seguir estudiando este fenómeno para eludir cual es el proceso por el cual actúan las sales en lo trofozoítos.

IX. Conclusiones

1. El Glicolato de sodio, el desoxicolato de sodio y el litocolato afectan la viabilidad de los trofozoítos, ya que a determinadas concentraciones los lisaron.
2. Los trofozoítos de *E. histolytica* incubados con 400 μM de GC y 100 μM de litocolato produjeron una inhibición y estimulación de la proliferación, respectivamente, siendo éstas concentraciones las óptimas para análisis de sus efectos
3. La exposición de los trofozoítos con DC y GC produjeron cambios ultraestructurales de los trofozoítos, con el DC las vacuolas tenían una forma irregular y con el GC el número de vacuolas disminuyó, sugiriendo que los cambios en las vacuolas y sus contenidos podrían participar en cambios en la virulencia. El efecto citopático sobre células CaCo2 aumentó en trofozoítos incubados con DC y LC, en cambio con el GC el efecto se vio disminuido.
4. No se observó ninguna diferencia macroscópica en la formación del absceso hepático amibiano con los diferentes tratamientos, por lo que se sugiere el establecimiento de un modelo menos agresivo para los estudios de virulencia in vivo.

X. Bibliografía

Akbar MA, Chatterjee NS, Sen P, Debnath A, Pal A, Bera T and Das P. Genes induced by a high-oxygen environment in *Entamoeba histolytica*. 2004. Mol Biochem Parasitol. (133) 2. 187-96.

Ali IK, Hossain MB, Roy S, Ayeh-Kumi PF, Petri WA, Jr., Haque R and Clark CG. *Entamoeba moshkovskii* infections in children Bangladesh. 2003. Emerg Infect Dis. (9) 5. 580-4.

Ankri S, Stolarsky T, Bracha R, Padilla-Vaca F and Mirelman D. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. 1999. Infect Immun. (67) 1. 421-2.

Ankri S, Stolarsky T and Mirelman D. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. 1998. Mol Microbiol. (28) 4. 777-85.

Arroyo R and Orozco E. Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. 1987. Mol Biochem Parasitol. (23) 2. 151-8.

Asgharpour A, Kumar D, Sanyal A. Bile acids: Emerging role in management of liver diseases. Hepatol Int. 2015;9:527–33

Bansal D, Ave P, Kerneis S, Frileux P, Boche O, Baglin AC, Dubost G, Leguern AS, Prevost MC, Bracha R, Mirelman D, Guillen N and Labruyere E. An ex-vivo human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. 2009. PLoS Negl Trop Dis. (3) 11. e551.

Begley M, Gahan CG and Hill C. The interaction between bacteria and bile. 2005. FEMS Microbiol Rev. (29) 4. 625-51.

Betanzos A, Javier-Reyna R, Garcia-Rivera G, Banuelos C, Gonzalez-Mariscal L, Schnoor M and Orozco E. The EhCPADH112 complex of *Entamoeba histolytica* interacts with tight junction proteins occludin and claudin-1 to produce epithelial damage. 2013. PLoS One. (8) 6. e65100.

Billington D and Coleman R. Effects of bile salts of human erythrocytes. Plasma membrane vesiculation, phospholipid solubilization and their possible relationships to bile secretion. 1978. Biochim Biophys Acta. (509) 1. 33-47.

Bracha R, Nuchamowitz Y, Leippe M and Mirelman D. Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. 1999. Mol Microbiol. (34) 3. 463-72.

Campos-Peralta J, Sánchez-Monroy V and Villalba-Magdaleno J. *Entamoeba histolytica* y su relación huésped-parásito. 2011. Enf Inf Microbiol. (2) 31. 63 - 70.

- Chiang JY. Bile acid metabolism and signaling. 2013. *Compr Physiol.* (3) 3. 1191-212.
- Christy NC and Petri WA, Jr. Mechanisms of adherence, cytotoxicity and phagocytosis modulate the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. 2011. *Future Microbiol.* (6) 12. 1501-19.
- Clark CG and Diamond LS. The Laredo strain and other '*Entamoeba histolytica*-like' amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. 1991. *Mol Biochem Parasitol.* (46) 1. 11-8.
- Dawson PA, Karpen SJ. Intestinal transport and metabolism of bile acids. *J Lipid Res.* 2015;56(6):1085–1099
- de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ and Edwards PA. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. 2013. *Cell Metab.* (17) 5. 657-69.
- de la Guardia RD, Lopez MB, Burgos M and Osuna A. Purification and characterization of a protein capable of binding to fatty acids and bile salts in *Giardia lamblia*. 2011. *J Parasitol.* (97) 4. 642-7.
- Diamond LS and Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. 1993. *J Eukaryot Microbiol.* (40) 3. 340-4.
- Dutta GP and Yadava JN. Amoebicidal action of bile salts and other surface-active agents on axenically grown *Entamoeba histolytica*. 1973. *Indian J Med Res.* (61) 8. 1124-6.
- Espinosa-Cantellano M and Martinez-Palomo A. Recent developments in amoebiasis research. 2000. *Curr Opin Infect Dis.* (13) 5. 451-456.
- Farthing MJ, Keusch GT and Carey MC. Effects of bile and bile salts on growth and membrane lipid uptake by *Giardia lamblia*. Possible implications for pathogenesis of intestinal disease. 1985. *J Clin Invest.* (76) 5. 1727-32.
- Faust DM and Guillen N. Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. 2012. *Microbes Infect.* (14) 15. 1428-41.
- Feng H, Nie W, Sheoran A, Zhang Q and Tzipori S. Bile acids enhance invasiveness of *Cryptosporidium* spp. into cultured cells. 2006. *Infect Immun.* (74) 6. 3342-6.
- Floch MH, Gershengoren W, Diamond S and Hersh T. Cholic acid inhibition of intestinal bacteria. 1970. *Am J Clin Nutr.* (23) 1. 8-10.
- Flores MS, Obregon-Cardenas A, Tamez E, Rodriguez E, Arevalo K, Quintero I, Tijerina R, Bosques F and Galan L. Hypocholesterolemia in patients with an amebic liver abscess. 2014. *Gut Liver.* (8) 4. 415-20.

Garcia-Rivera G, Rodriguez MA, Ocadiz R, Martinez-Lopez MC, Arroyo R, Gonzalez-Robles A and Orozco E. *Entamoeba histolytica* : a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. 1999. Mol Microbiol. (33) 3. 556-68.

Gilchrist CA and Petri WA. Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. 1999. Curr Opin Microbiol. (2) 4. 433-7.

Hamzah Z, Petmitr S, Mungthin M, Leelayoova S and Chavalitsheewinkoon-Petmitr P. Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* by a single-round PCR assay. 2006. J Clin Microbiol. (44) 9. 3196-200.

Haque R, Ali I, Clark C and Petri W. A case report of *Entamoeba moshkovskii* infection in a Bangladesh child. 1998. Parasitol Inter. 47. 201 - 202.

Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E and Petri WA, Jr. Amebiasis. 2003. N Engl J Med. (348) 16. 1565-73.

Herrera-Martinez M, Hernandez-Ramirez VI, Hernandez-Carlos B, Chavez-Munguia B, Calderon-Oropeza MA and Talamas-Rohana P. Antiamoebic Activity of *Adenophyllum aurantium* (L.) Strother and Its Effect on the Actin Cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*. 2016. Front Pharmacol. (7) 169.

Heuman DM, Pandak WM, Hylemon PB and Vlahcevic ZR. Conjugates of ursodeoxycholate protect against cytotoxicity of more hydrophobic bile salts: in vitro studies in rat hepatocytes and human erythrocytes. 1991. Hepatology. (14) 5. 920-6.

Hirata KK, Que X, Melendez-Lopez SG, Debnath A, Myers S, Herdman DS, Orozco E, Bhattacharya A, McKerrow JH and Reed SL. A phagocytosis mutant of *Entamoeba histolytica* is less virulent due to deficient proteinase expression and release. 2007. Exp Parasitol. (115) 2. 192-9.

Leippe M. Amoebapores. 1997. Parasitol Today. (13) 5. 178-83.

Li T and Apte U. Bile Acid Metabolism and Signaling in Cholestasis, Inflammation, and Cancer. 2015. Adv Pharmacol. (74) 263-302.

Lopez-Vancell R, Montfort I and Perez-Tamayo R. Galactose-specific adhesin and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*. 2000. Parasitol Res. (86) 3. 226-31.

Lynch EC, Rosenberg IM and Gitler C. An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. 1982. EMBO J. (1) 7. 801-4.

Marie C and Petri WA, Jr. Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica*. 2014. Annu Rev Microbiol. (68) 493-520.

Mata-Cardenas BD, Vargas-Villarreal J, Martinez-Rodriguez HG and Said-Fernandez S. *Entamoeba histolytica* axenic growth improvement by ox bile. 1995. Arch Med Res. (26) 4. 441-4.

- Meza I, Talamas-Rohana P and Vargas MA. The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: structure, function, and regulation by signaling pathways. 2006. Arch Med Res. (37) 2. 234-43.
- Milovic V, Teller IC, Faust D, Caspary WF and Stein J. Effects of deoxycholate on human colon cancer cells: apoptosis or proliferation. 2002. Eur J Clin Invest. (32) 1. 29-34.
- Mirelman D. Ameba-bacterium relationship in amebiasis. 1987. Microbiol Rev. (51) 2. 272-84.
- Mirelman D, Anbar M and Bracha R. Trophozoites of *Entamoeba histolytica* epigenetically silenced in several genes are virulence-attenuated. 2008. Parasite. (15) 3. 266-74.
- Nie YF, Hu J and Yan XH. Cross-talk between bile acids and intestinal microbiota in host metabolism and health. 2015. J Zhejiang Univ Sci B. (16) 6. 436-46.
- Okada M, Huston CD, Mann BJ, Petri WA, Jr., Kita K and Nozaki T. Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. 2005. Eukaryot Cell. (4) 4. 827-31.
- Olivos-García A, Saavedra E, Nequiz Avendaño M and Pérez-Tamayo R. Amibiasis: Mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*. 2011. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM. 54. 10-20.
- Orozco E, Guarneros G, Martinez-Palomo A and Sanchez T. *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. 1983. J Exp Med. (158) 5. 1511-21.
- Pacheco-Yepes J, Jarillo-Luna RA, Gutierrez-Meza M, Abarca-Rojano E, Larsen BA and Campos-Rodriguez R. Peroxynitrite and peroxiredoxin in the pathogenesis of experimental amebic liver abscess. 2014. Biomed Res Int. (2014) 324230.
- Pais-Morales J, Betanzos A, Garcia-Rivera G, Chavez-Munguia B, Shibayama M and Orozco E. Resveratrol Induces Apoptosis-Like Death and Prevents In Vitro and In Vivo Virulence of *Entamoeba histolytica*. 2016. PLoS One. (11) 1. e0146287.
- Pérez-Tamayo R. Amibiasis. 2006. Editores de Textos Mexicanos. 322-335.
- Petri WA, Jr., Haque R, Lysterly D and Vines RR. Estimating the impact of amebiasis on health. 2000. Parasitol Today. (16) 8. 320-1.
- Petri WA, Jr., Smith RD, Schlesinger PH, Murphy CF and Ravdin JI. Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. 1987. J Clin Invest. (80) 5. 1238-44.
- Pumarola A. Microbiología y Parasitología Médica. 1991. Elsevier.
- Que X and Reed SL. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. 2000. Clin Microbiol Rev. (13) 2. 196-206.

Ralston KS, Solga MD, Mackey-Lawrence NM, Somlata, Bhattacharya A and Petri WA, Jr. Trophocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion. 2014. Nature. (508) 7497. 526-30.

Ravdin JI, Moreau F, Sullivan JA, Petri WA, Jr. and Mandell GL. Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. 1988. Infect Immun. (56) 6. 1505-12.

Rivero de Rodríguez Z. Detección de *Entamoeba moshkovskii* en humanos: un nuevo problema de diagnóstico en la amibiasis. 2013. Kasmera. (1) 41. 42 -49.

Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. 2003. Annu Rev Biochem. (72) 137-74.

Saffer LD and Petri WA, Jr. Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. 1991. Infect Immun. (59) 12. 4681-3.

Shimokawa C, Kabir M, Taniuchi M, Mondal D, Kobayashi S, Ali IK, Sobuz SU, Senba M, Houpt E, Haque R, Petri WA, Jr. and Hamano S. *Entamoeba moshkovskii* is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice. 2012. J Infect Dis. (206) 5. 744-51.

Stanley SL, Jr. Amoebiasis. 2003. Lancet. (361) 9362. 1025-34.

Sung JY, Shaffer EA and Costerton JW. Antibacterial activity of bile salts against common biliary pathogens. Effects of hydrophobicity of the molecule and in the presence of phospholipids. 1993. Dig Dis Sci. (38) 11. 2104-12.

Talamas-Rohana P, Schlie-Guzman MA, Hernandez-Ramirez VI and Rosales-Encina JL. T-cell suppression and selective in vivo activation of TH2 subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220-kilodalton lectin. 1995. Infect Immun. (63) 10. 3953-8.

Tillack M, Biller L, Irmer H, Freitas M, Gomes MA, Tannich E and Bruchhaus I. The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. 2007. BMC Genomics. (8) 170.

Timmons M and Tallitsch R. Anatomía humana. 2009. Pearson.

Tortora G and Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología. 2007. Panamericana. 11a.

Trejos J, Castano GC. Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. 2009. Infectio. (13) 2. 100 -108.

Tsutsumi V, Aguirre-García J, Shibayama M and Serrano-Luna J. Pathology, pathogenesis and experimental amebiasis. 2015. Springer. 411 - 425.

Tsutsumi V, Mena-Lopez R, Anaya-Velazquez F and Martinez-Palomo A. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. 1984. Am J Pathol. (117) 1. 81-91.

Tsutsumi V, Ramirez-Rosales A, Lanz-Mendoza H, Shibayama M, Chavez B, Rangel-Lopez E and Martinez-Palomo A. *Entamoeba histolytica*: erythrophagocytosis, collagenolysis, and liver abscess production as virulence markers. 1992. Trans R Soc Trop Med Hyg. (86) 2. 170-2.

Variyam EP. Bile salts promote adherence-decreasing effect of colonic luminal hydrolases on *Entamoeba histolytica*. 1992. Arch Med Res. (23) 2. 223-5.

Voigt H and Guillen N. New insights into the role of the cytoskeleton in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. 1999. Cell Microbiol. (1) 3. 195-203.

Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. 1986. Rev Infect Dis. (8) 2. 228-38.

Ximenez C, Morán P, Ramos F and Ramiro M. Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. 2007. Medicina Interna de México. (5) 23. 398 - 407.

Ximenez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Moran P, Shibayama M, Gonzalez E, Valadez A, Hernandez E, Valenzuela O, Limon A, Partida O and Silva EF. Human amebiasis: breaking the paradigm? 2010. Int J Environ Res Public Health. (7) 3. 1105-20.

Ximenez C, Moran P, Rojas L, Valadez A and Gomez A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. 2009. Infect Genet Evol. (9) 6. 1023-32.

Zlobl TL. Amebiasis. 2001. Prim Care Update Ob Gyns. (8) 2. 65-68.