



**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**

*Departamento de Infectómica y Patogénesis
Molecular*

Título de la Tesis

**Estudio Morfológico Comparativo de la Fagocitosis y el
Re-arreglo del Citoesqueleto de Actina entre
Entamoeba histolytica y *Entamoeba dispar***

Tesis que presenta el:

Q.B.P. Daniel Talamás Lara

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de:

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Director de Tesis

Dr. Adolfo Martínez Palomo

Asesores de Tesis:

Dra. Bibiana Chávez Munguía

Dr. Arturo González Robles

Dra. Patricia Talamás Rohana

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 1 de Biología Celular y el laboratorio 9 de Inmunología, del Depto. de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la tutoría del Dr. Adolfo Martínez Palomo.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo.

Becario de CONACyT N°. 262824

Dedicatoria

Esta tesis la dedico a 2 grandes personas que influyeron y seguirán influyendo en mí.

La primera:

Blanca Margarita Lara Bordagaray, MI MAMÁ. Por brindarme todo el apoyo incondicional que sólo un ser extraordinario como una madre puede dar. Los estímulos, palabras de aliento, confianza y fe ciega que has tenido en mi, han servido para impulsarme en convertirme en una persona exitosa, que con el paso de los años te agradece cada regaño, llamada de atención y momento de felicidad que hemos tenido a lo largo de nuestras vidas. Un logro mío es un logro tuyo y por eso me esfuerzo día con día en manifestarte una satisfacción más, debido a que la esperanza de que llegue más lejos, me motiva a seguir adelante. No me canso de agradecerle a Dios el haberme dado la oportunidad de que me concibieras y haberme puesto a una excelente mujer como guía; sobre todo haber nacido con una gran estrella que me cuida, me protege y se hace presente constantemente en nuestras vidas... SAN MIGUEL ARCANGEL, por lo que a él junto contigo y a tus rezos, les agradezco las oportunidades infinitas que me ofrecen intercediendo por mi ante Dios.

La Segunda:

Al Dr. Adolfo Martínez Palomo. Por ser un ejemplo a seguir como persona debido a su calidez humana y enseñarme que un investigador aún siendo mundialmente reconocido debe poseer cosas más valiosas que el simple conocimiento; entre las cuales están la paciencia, la perseverancia, el contacto con todo tipo de personas, la humildad y sobretodo la sencillez; todo esto enaltece el alma de un investigador y la formación que usted me ha dado perdurará en mi por el resto de mis días. Sólo me queda agradecerle toda la sabiduría que ha compartido conmigo y que usted me haya regresado la confianza para ser un investigador tan grande como usted.

Agradecimientos

Agradezco a las siguientes personas el apoyo brindado, porque sin su colaboración mi trabajo se hubiese tornado más complicado.

FAMILIA

- Margarita Lara Bordagaray
- César Salas Molina
- Dra. Patricia Talamás

FESI (U.N.A.M)

- Dra. Maritza Omaña Molina
- M en C. Ángel Durán

Laboratorio 1 (Departamento de IPM)

- Dr. Adolfo Martínez Palomo
- Dr. Arturo González Robles
- Dra. Bibiana Chávez Munguía
- Aux. Lizbeth Salazar Villatoro
- Aux. Anel Lagunes Guillén
- Tec. Ranferi Andrés Pérez

Secretarias (Departamento de IPM)

- Irma Miranda Orea
- Judith Escobedo Pineda
- Martha Dueñas Mejía

Laboratorio 9 (Departamento de IPM)

- Dra. Veronica Hernández
- Dr. José Alfredo Díaz
- M en C. Mayra Herrera
- M en C. Olga Garibay
- M en C. Julio Villegas
- M en C. Alfredo Toledo
- M en C. Luilli López
- Aux. Carlos Osorio
- Tec. Belem de Luna

Laboratorio 43 (DBC)

- Dr. Juan Pedro Luna
- Aux. Elizabeth Reyna

Indice

	<i>Página</i>
<i>Resumen</i>	1
<i>Abstract</i>	3
Capítulo I. Antecedentes	5
1.1.Fagocitosis en macrófagos	5
1.1.1. Quimiotaxis y diapédesis	6
1.1.2. Proteínas de adhesión	7
1.1.3. Las proteínas de adhesión y respuesta celular	8
1.1.4. Citoesqueleto	9
1.1.4.1. Microtúbulos	10
1.1.4.2. Microfilamentos	10
1.1.4.3. Filamentos intermedios	11
1.1.4.4. Otras proteínas asociadas al citoesqueleto	11
1.1.5. Opsonización	12
1.1.6. Endocitosis	12
1.1.6.1. Receptores mediadores de endocitosis	13
1.1.7. Transducción de señales	14
1.1.8. Receptores TLR (Toll like-receptors)	15
1.1.9. Rafts y caveolas	16
1.1.10. Maduración de la vacuola fagosomal	17
1.1.11. Eventos no oxidativos de la fagocitosis y actividad microbica	17
1.1.12. Gránulos lisosomales	18
1.1.13. Cambios metabólicos oxidativos relacionados con la función microbica ..	18
1.1.14. Reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) para evaluar la función fagocítica.....	19
1.2.Fagocitosis de eritrocitos por <i>Entamoeba histolytica</i>	19
1.2.1. Evidencia por microscopía fotónica	20
1.2.2. Evidencia por microscopía electrónica	24
1.3.Citoesqueleto de <i>Entamoeba histolytica</i>	26
1.3.1. Actina y microfilamentos	26
1.3.2. Tubulina y microtúbulos	28
1.3.3. Motores Moleculares	29
Capítulo II. Introducción	31

Capítulo III. Justificación del trabajo	35
Capítulo IV. Hipótesis y objetivos	36
4.1. Hipótesis	36
4.2. Objetivo general	36
4.3. Objetivos particulares	36
Capítulo V. Materiales y métodos	37
5.1. Cultivo de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i>	37
5.2. Cuantificación de amibas en cámara de Neubauer	38
5.3. Obtención de eritrocitos humanos	38
5.3. Ensayo cuantitativo de eritrofagocitosis	39
5.3.1 Tinción de Novikoff	40
5.4. Determinación indirecta de la eritrofagocitosis (cuantificación de hemoglobina)	41
5.5. Cultivo de levaduras de <i>Candida albicans</i>	41
5.6. Reducción del nitro azul de tetrazolio (NBT) para evaluar la función fagocítica	42
5.7. Análisis estadístico.....	43
5.8. Ensayo de inmunofluorescencia para monitorear la re-estructuración de actina entre <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i>	43
5.8.1. Procesamiento de los cubre objetos	44
5.9. Fraccionamiento de proteínas por centrifugación	44
5.9.1 Revelado de la membrana de nitrocelulosa	47
5.9.2 Preparación de geles bis acrilamida	48
5.9.3 Técnica de cuantificación de proteína por el método de Lowry	49
Capítulo VI. Resultados	51
6.1. Evaluación de la diferencia en la capacidad eritrofagocítica entre <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> por microscopía de luz	51
6.1.1. Cuantificación de eritrocitos ingeridos por <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i>	51
6.1.2. Evaluación estadística descriptiva de eritrocitos fagocitados por <i>Entamoeba histolytica</i>	51
6.1.3. Evaluación estadística descriptiva de eritrocitos fagocitados por <i>Entamoeba dispar</i>	52
6.1.4. Evaluación estadística inferencial entre <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> en eritrocitos fagocitados	52

6.2. Evaluación de la diferencia en la capacidad eritrofagocítica entre <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> por espectrofotometría	54
6.2.1. Cuantificación de hemoglobina en interacciones amiba-eritrocito en <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i>	54
6.2.2. Evaluación estadística descriptiva de hemoglobina ingerida por <i>Entamoeba histolytica</i>	55
6.2.3. Evaluación estadística descriptiva de hemoglobina ingerida por <i>Entamoeba dispar</i>	55
6.2.4. Evaluación estadística inferencial entre <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> en hemoglobina ingerida	56
6.3. Evaluación de la diferencia en la capacidad de óxido-reducción entre <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> utilizando la técnica de azul de tetrazolio (NBT)	57
6.3.1. Cuantificación del estallido respiratorio en interacciones amiba-levadura en <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i>	57
6.3.2. Evaluación estadística descriptiva de óxido-reducción por <i>Entamoeba histolytica</i>	58
6.3.3. Evaluación estadística descriptiva de óxido-reducción por <i>Entamoeba dispar</i>	58
6.3.4. Evaluación estadística inferencial entre <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> de óxido-reducción	59
6.4. Monitoreo de estructuración de actina utilizando un sustrato inerte (vidrio) y uno biológico (fibronectina) por la técnica de Inmunofluorescencia .	61
6.4.1. Comparación de la cinética de estructuración de actina entre <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> adheridas a vidrio y a fibronectina	61
6.4.2. Comparación de la cinética de adhesión a fibronectina entre <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i>	62
6.5. Biología molecular	64
6.5.1. Comparación del perfil de proteínas entre <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> en fracciones solubles e insolubles bajo condiciones de adhesión a vidrio y fibronectina	64
6.5.2. Comparación de actina filamentosa (fracción insoluble) y actina globular (fracción soluble) en <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> bajo condiciones de adhesión a vidrio y fibronectina por Western blot	65
Capítulo VII. Discusión	68
7.1. Eritrofagocitosis	68
7.2. Estallido respiratorio	71
7.3. Re-arreglo del citoesqueleto de actina	72
Capítulo VIII. Resumen de resultados	74
Capítulo IX. Conclusión del trabajo	74

<i>Capítulo X. Perspectivas del trabajo</i>	75
<i>Capítulo XI. Referencias</i>	76

Resumen

Entamoeba histolytica es el agente causal en el ser humano de la disentería amibiana y de abscesos extra intestinales. A lo largo de los años se ha demostrado el alto grado de patogenicidad de este parásito y los mecanismos de virulencia con los que cuenta; uno de ellos, su extraordinaria capacidad fagocítica. La fagocitosis ha sido considerada como un marcador de virulencia entre diferentes cepas de *Entamoeba histolytica*, causante de la amibiasis invasora; sin embargo, en *Entamoeba dispar*, el probable agente presente en los casos asintomáticos, el potencial de fagocitosis no se conoce pero se presume que podría ser menor. Diferencias en esta característica podrían ser determinantes en la patogenicidad entre las dos especies.

Una vez ocurrida la fagocitosis, se lleva a cabo el estallido respiratorio como parte del proceso metabólico para la eliminación del material endocitado.

Otro elemento importante en ambas especies es la gran motilidad con la que cuentan, no obstante cada una de ellas podría mostrar diferencias en la distribución y re-arreglo del citoesqueleto de actina, ya que la polimerización de actina es un proceso indispensable para la realización óptima de la fagocitosis.

El estudio de la fagocitosis, de la producción de especies reactivas de oxígeno y del re-arreglo del citoesqueleto, podría ayudar a comprender las diferencias en la patogenicidad entre ambas especies morfológicamente similares, pero con un comportamiento invasivo diferente.

En el presente estudio se analizaron estas capacidades y se confirmó mediante cuantificación por microscopía de luz y su respectivo análisis estadístico, que *E. dispar* tiene una menor capacidad eritrofagocítica. Esta amiba mostró también una menor capacidad de producir especies reactivas de oxígeno en comparación con la especie invasora. Al analizar mediante microscopía confocal el re-arreglo del citoesqueleto de actina se observó que esta capacidad fue menos estructurada en *E. dispar* que en *E. histolytica*.

Finalmente, mediante ensayos de Western blot se comparó el contenido de actina en ambas cepas, encontrando que el contenido de esta proteína es mayor en *E. dispar*. Sin embargo, *E. histolytica* mostró tener una capacidad más eficiente en el rearrreglo del citoesqueleto aún contando con menos proteína. Estos estudios sugieren que el menor potencial endocítico y de producción de especies reactivas de oxígeno, así como la menor capacidad de rearrreglo del citoesqueleto de actina en *E. dispar* puede influir de manera importante en la menor patogenicidad de esta especie.

Abstract

Entamoeba histolytica is the causative agent of the human amoebic dysentery and extraintestinal abscesses. The high degree of pathogenicity and the virulence mechanisms of this parasite have been demonstrated through the years. One of these mechanisms is its extraordinary phagocytic capacity. Phagocytosis has been considered a virulence marker between different *Entamoeba histolytica* strains. On the other hand, the phagocytic potential of other *Entamoeba* species, as the *Entamoeba dispar* related with human asymptomatic infections, is not known. Differences in this capacity could be determinant in the pathogenicity between these two species.

After phagocytosis, respiratory burst is carried out as part of metabolic process for endocytosed material removal. Differences in this process efficiency may exist between both amoebas.

An important feature of both species is their high motility. Nevertheless each one may have differences in distribution of actin cytoskeleton, rearrange capacity, an crucial processes for optimal phagocytosis.

The study of phagocytosis, reactive oxygen species production and cytoskeleton rearrange capacity, may help to understand differences in pathogenicity between these morphologically similar species, but with a different invasive behavior.

In the present study these capacities were analyzed, confirming through light microscopy, that *E. dispar* has a lower erythrophagocytic capacity. The non-invasive amoeba also shows a diminished production of reactive oxygen species in comparison with the invasive *E. histolytica*. Finally, the actin content in both strains was compared by Western blot assays encountering a higher content of this protein in *E. dispar* than in *E. histolytica*. However, in *E. histolytica* actin cytoskeleton showed a higher rearrange capacity even this amoeba has a less quantity of this protein.

These studies suggest that the minor endocytic potential and reactive oxygen species production as well as less pronounced rearrangement of the actin cytoskeleton of *E. dispar*, can partially explain the reduced invasive capacity of this amoeba.

1. Antecedentes

1.1 Fagocitosis en macrófagos

Elie Metchnikoff, en 1880, descubrió que la función de las células fagocíticas era esencial para la supervivencia de todas las especies del reino animal. En los organismos unicelulares como los protozoarios, la función fagocítica es el único medio por el cual estos organismos adquieren su alimento. Cada etapa del proceso fagocítico como la migración, el reconocimiento de lo que puede y debe ingerirse, la endocitosis y la destrucción de partículas se descubre cada vez más complicada.

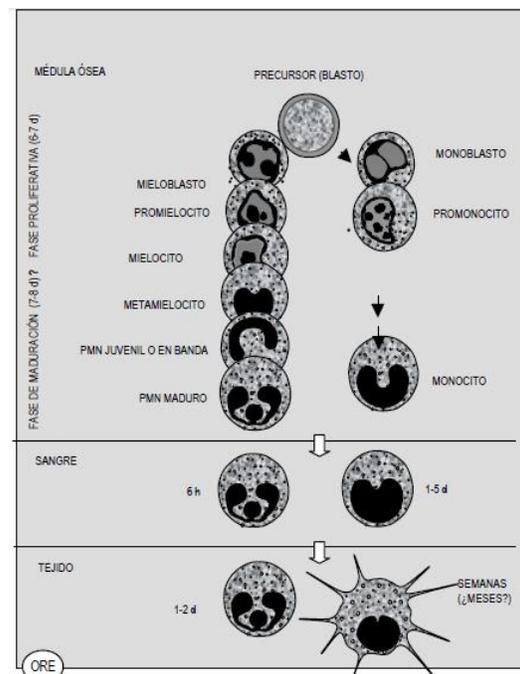


Figura 1A Origen, maduración y vida media de las células fagocíticas "profesionales".
Rojas-Espinosa y Arce-Paredes, 2003

Aunque varias células tienen la capacidad de ingerir partículas, sólo los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) y los macrófagos (MFs) la realizan como su función preponderante. Ambos tipos celulares se originan en la médula ósea a partir de un ancestro común que pronto dará origen a los precursores específicos: el mieloblasto que da origen a la línea granulocítica y el monoblasto que da origen al sistema fagocítico mononuclear (Figura 1A).

El proceso de la fagocitosis en manera general comprende la quimiotaxis, diapédesis, adhesión, endocitosis, cambios físicos y bioquímicos intracelulares que capacitan a los fagocitos para endocitar, eliminar y digerir microorganismos (Figura 1B).

La formación del fagosoma, y su interacción con endosomas y lisosomas para formar el fagosoma maduro (fagolisosoma), la acidificación del fagolisosoma, la formación de

metabolitos reactivos del oxígeno y del nitrógeno, la activación de las hidrolasas lisosomales y finalmente la expulsión del material de desecho mediante el proceso de la exocitosis, son los pasos progresivos que ocurren en este amplio evento (Bainton y col., 1971).

1.1.1 Quimiotaxis y diapédesis

Las situaciones de infección o trauma propician cambios en el microambiente tisular que dan origen a la formación de materiales derivados de los microorganismos (exógenos) como los de alteraciones tisulares (endógenos), con actividad quimiotáctica. Para que las células fagocíticas acudan a los sitios de lesión, deben salir primero de los vasos sanguíneos. Los cambios físicos observados durante la salida de las células incluyen el flujo entorpecido de los leucocitos, después su desplazamiento por rodamiento sobre la superficie interna de los vasos sanguíneos, su marginación, adhesión y expansión sobre el endotelio vascular para finalmente salir por diapédesis a través de las uniones entre las células

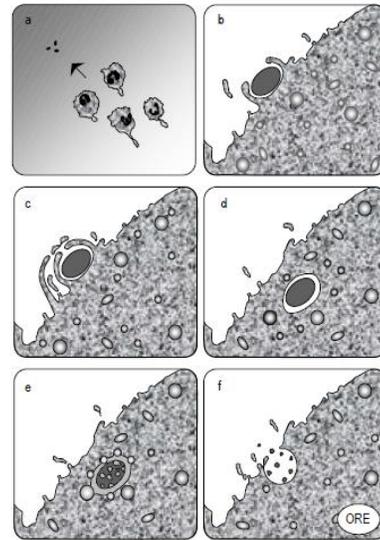


Figura 1B Se ilustran las etapas del proceso de la fagocitosis: (a) la quimiotaxis, (b) la adherencia de las células con los microorganismos, (c) la endocitosis, (d) la formación del fagosoma, (e) la formación del fagolisosoma con la consecuente destrucción del microorganismo, y (f) la eliminación de desechos (exocitosis).

Rojas-Espinosa y Arce-Paredes, 2003

endoteliales. En el proceso de diapédesis participan las proteínas de adhesión tanto de los leucocitos como de las células endoteliales.

1.1.2 Proteínas de adhesión

Por medio de estudios con anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos superficiales de leucocitos murinos, se fueron descubriendo los receptores encargados de llevar a cabo estos procesos de adhesión. Se descubrió que existían receptores con función de integrinas que contenían una cadena α (155-177kD) y una cadena β (95kD) unidas entre sí por enlaces no covalentes. Después se descubrieron diferencias entre estas integrinas dependiendo de la célula en las que se encuentran (PMN, monocito o linfocito); en diferentes tipos de receptores varían las cadenas α mientras que la cadena β permanece igual en cada uno de los casos. Actualmente las cadenas α se conocen como moléculas CD11 (*cluster of differentiation molecule-11*), en tanto que la cadena β , común en todas ellas, se describe como molécula CD18. Así, la composición de las moléculas de adhesión es CD11a/CD18 para el antígeno LFA-1, CD11b/CD18 para MAC-1 (o Mo-1), y CD11c/CD18 para gp150/95. Ahora se sabe que estas proteínas leucocitarias llamadas integrinas β -2, constituyen sólo una de varias familias de moléculas de adhesión (Figura 1C) (Gallin J, 1985).

Además de las integrinas β -2, otras familias prominentes de proteínas de adhesión son la familia de las moléculas de adhesión relacionadas con las inmunoglobulinas (ICAM, *immunoglobulin-related cell adhesion molecules*) que incluyen, entre otras, a ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-*

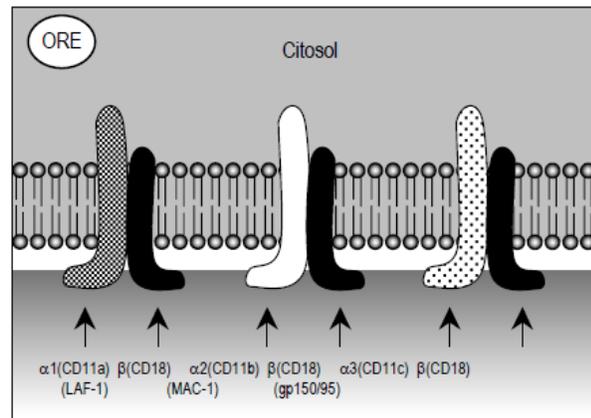


Figura 1C Las proteínas de adhesión de la familia de las integrinas son dímeros formados por una cadena alfa y una cadena beta; mientras que la cadena alfa es particular para cada miembro de la familia (CD11a, CD11b y CD11c), la cadena beta es común a todas ellas (CD18).

Rojas-Espinosa y Arce-Paredes, 2003

1), ICAM-2 y VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), y la familia de las selectinas cuyos miembros son las selectinas P, E y L (Frenette y Wagner, 1996).

Los enfermos con deficiencias en Mo1 y LFA-1 carecen tanto de las cadenas α como de las cadenas β de las proteínas de adhesión y se ha sugerido que la cadena β es necesaria para la síntesis de la cadena α y la falta de la cadena β condiciona la deficiencia en la síntesis o expresión de la cadena α (Anderson y col., 1985).

1.1.3 Las Proteínas de adhesión y la respuesta celular

Las proteínas de adhesión participan en los mecanismos de señalización celular y transmiten señales tanto del interior como del exterior de las células. En condiciones de reposo, las integrinas presentan una conformación inactiva. La activación de los leucocitos por diversos mediadores origina cambios conformacionales en los heterodímeros de las integrinas aumentando su afinidad por sus ligandos ICAM. En otros casos, el mecanismo de señalización comienza con el enlazamiento de un ligando exógeno con una integrina de la superficie celular generando señales bioquímicas en el interior de las células que activan a diversas proteínas G, protein-cinasas y que culminan con la polimerización de la actina, con el consecuente movimiento celular para que se lleve a cabo la quimiotaxis y la fagocitosis. A la vez se expresan algunos genes codificantes de proteínas de adhesión, de citocinas y de otras proteínas (Figura 1D) (Greenberg, 1995).

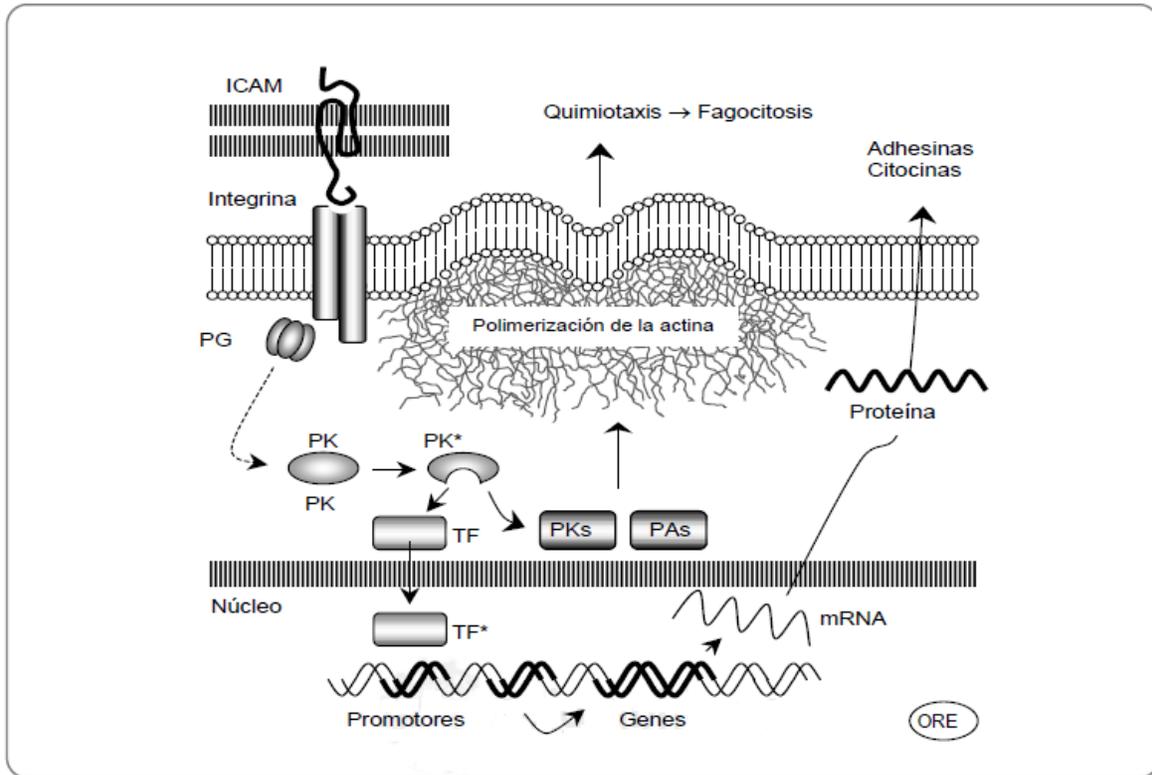


Figura 10 Función de las integrinas: La interacción entre una integrina y su ligando inicia cascadas de señalización en las que intervienen diversas GTPasas (PG), protein cinasas (PKs), fosfatasa (PAs), proteínas adaptadoras y factores de transcripción (TF), que globalmente dan como resultado la activación del citoesqueleto por polimerización de la actina (quimiotaxis y fagocitosis) y la producción de diversas proteínas, incluyendo adhesinas y citocinas (Esquema basado en las referencias 1, 62). **Rojas-Espinosa y Arce-Paredes, 2003**

1.1.4 Citoesqueleto

Las estructuras constitutivas del citoesqueleto son los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios. Los agentes que destruyen los microtúbulos (colchicina, vinblastina, vincristina) inhiben la quimiotaxis a concentraciones relativamente elevadas (10^{-4} a 10^{-5} M). La citocalasina B, la cual deprime la función de los microfilamentos, inhibe reversiblemente la quimiotaxis y la movilidad celular a concentraciones mayores de 1.0 μg por mL. Estos agentes a concentraciones bajas pueden tener el efecto contrario, incrementando la movilidad y la quimiotaxis (Vicente-Manzanares y col., 2002).

1.1.4.1 Microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras cilíndricas construidas a base de 2 monómeros de α y β tubulina. Cada microtúbulo está compuesto por 13 filamentos ordenados en forma paralela y acomodados como un tubo de longitud variable cuya luz mide unos 150 Å de diámetro. Los microtúbulos citoplasmáticos generalmente se encuentran en un estado de ensamble y desensamble rápido, depende de la presencia de Ca^{++} y de cAMP. El ensamblaje de los microtúbulos es inhibido por alcaloides. Varias proteínas asociadas participan en la función de los microtúbulos, entre ellas las proteínas MAPs (*MicrotubuleAssociated Proteins*) que promueven su polimerización y proteínas de las familias de las quinesinas y dineínas que, utilizando ATP como fuente de energía, funcionan como motores que impulsan el movimiento de vesículas y organelos sobre y a lo largo de los microtúbulos (Olmsted y Borisy, 1973; Vicente-Manzanares y col., 2002).

1.1.4.2 Microfilamentos

Los microfilamentos son estructuras constituidas a base de subunidades idénticas o muy similares a la actina del músculo esquelético. La actina se encuentra organizada en forma de filamentos largos de 50 Å de diámetro, compuestos por unidades de monómeros de actina G. Los monómeros de actina tienden a polimerizar para formar actina F y la polimerización está regulada por diversas proteínas, como la timosina $\beta 4$ que secuestra a los monómeros de actina, la profilina que evita la polimerización espontánea y la proteína CapZ que estabiliza los polímeros ya formados evitando que se incorporen o se remuevan más monómeros de actina. Otras proteínas reguladoras de la polimerización de la actina incluyen a la gelsolina, las proteínas ADF, cofilina, actoforina, depactina, que promueven el desensamble de la actina. En las células, los microfilamentos están asociados con miosina citoplásmica y con tropomiosina.

Los microfilamentos existen en 2 formas distintas: una red laxa de fibras cortas asociada a las estructuras de la superficie interna de la membrana plasmática (sensibles a citocalasina B) y haces de fibras que corren por debajo de la membrana, adyacentes a ella. Ambos tipos de microfilamentos son contráctiles y juegan un papel importante en todo tipo de movimiento celular, incluyendo cambios de forma, movimiento al azar y dirigido, endocitosis, secreción de productos, etc (Olmsted y Borisy, 1973; Lazarides y Weber, 1974; Weber y Groeschel-Stewart, 1974).

1.1.4.3 Filamentos intermedios

Se forman por la polimerización tetramérica de filamentos largos compuestos por uno de tres tipos de proteínas: las queratinas (en epitelios), las vimetinas (en leucocitos y fibroblastos, desmina en células musculares) y los neurofilamentos (en células del sistema nervioso). Los filamentos intermedios confieren resistencia estructural y alta plasticidad a la célula que le permiten soportar altas tensiones externas como cuando ocurre la diapédesis (Janmey, 1991).

1.1.4.4 Otras proteínas asociadas al citoesqueleto

Otras proteínas como MARKS (una protein-cinasa), gelsolina y profilina, interaccionan con la actina modulando su actividad. El contacto de neutrófilos con quimioattractantes promueve en pocos segundos ciclos de polimerización y despolimerización de la actina. La polimerización de la actina G para formar la actina F proporciona a la célula la arquitectura reticular dinámica. Las señales que se originan al interactuar un ligando quimiotáctico con su receptor membranal se conectan con el citoesqueleto a través de la actina F. El ordenamiento lineal de la actina F requiere de la participación de las otras proteínas citoplásmicas accesorias. La gelsolina y la profilina se encuentran asociadas de manera no covalente con la actina monomérica en las células en reposo. La estimulación quimiotáctica de las

células provoca que estas proteínas se disocien y entonces ocurre la polimerización de la actina. Cuando el estímulo quimiotáctico ha cesado, la gelsolina y la profilina se reasocian con la actina, promoviendo su despolimerización (Cuadro I) (Sarndahl y col., 1990).

Cuadro I . Proteínas componentes del citoesqueleto^a.

Estructura	Proteína	Prot. asociadas
Microtúbulos	Tubulinas α y β (y en centrómero)	MAPs Quinesinas Dineínas
Microfilamentos	Actina	Miosinas Timosina $\beta 4$ Profilina CapZ Gelsolina ADF, cofilina, actoforina y depactina
Filamentos intermedios	Vimetina y vimetin-like filaments	Plectina

^aAdemás de las señaladas, otras proteínas como tropomiosina, calmodulina, cadherina, MARKS y varias GTPasas, proteincinasas y fosfatasas, participan en la regulación de la actividad del citoesqueleto.

Vicente-Manzanares y cols., 2002

1.1.5 Oponización

La oponización es un fenómeno que mejora el proceso de la endocitosis y que requiere de la interacción de las partículas ingeribles con factores del suero de diversa naturaleza denominados oponinas. Las oponinas incluyen anticuerpos (fundamentalmente IgG), componentes del complemento y algunas otras proteínas presentes en el suero, en el moco y en el fluido pleural. Las oponinas están relacionadas con la presencia de receptores que se encuentran en la membrana de las células fagocíticas.

En el caso de los anticuerpos IgG, éstos funcionan como oponinas. Los leucocitos PMN y los MN de la mayoría de las especies, tienen receptores específicos para la región Fc de las inmunoglobulinas IgG1, IgG3, IgG2 e IgG4, en ese orden de abundancia (Medzhitov y Janeway, 2000).

1.1.6 Endocitosis

Usualmente ocurre a través de receptores localizados en regiones de la membrana revestidas por clatrina. El proceso comprende la invaginación de la membrana plasmática alrededor del material extracelular, formando una

vacuola fagocítica. En la mayoría de los casos, la vacuola se fusiona reversiblemente con los lisosomas para dar origen al fagosoma. Como resultado de esta actividad, continuamente se remueven porciones de la membrana plasmática para formar la envoltura de la vesícula endocítica. En cuanto al destino de este material membranal, inicialmente se supuso que la membrana celular incorporada en los fagosomas era rápidamente destruida por las enzimas lisosomales pero esta proposición no se sostuvo cuando se demostró que la membrana lisosomal y plasmática diferían grandemente en su composición química, enzimática y antigénica. Según algunas hipótesis, durante el proceso de fusión fago-lisosomal, los componentes transportados por las vesículas podrían: (a) mantenerse ligados a los componentes de la membrana celular, (b) permanecer en solución, o (c) ligarse a la fracción de membrana lisosomal, según las afinidades particulares entre ligandos y membranas. Cuando las dos vesículas (fagosoma y lisosoma) se separan, los componentes endocitados o sus productos de hidrólisis podrían ser reciclados al exterior junto con la membrana celular, o podrían ser retenidos en los lisosomas para ser procesados y posteriormente integrados al citoplasma (Medzhitov y Janeway, 2000).

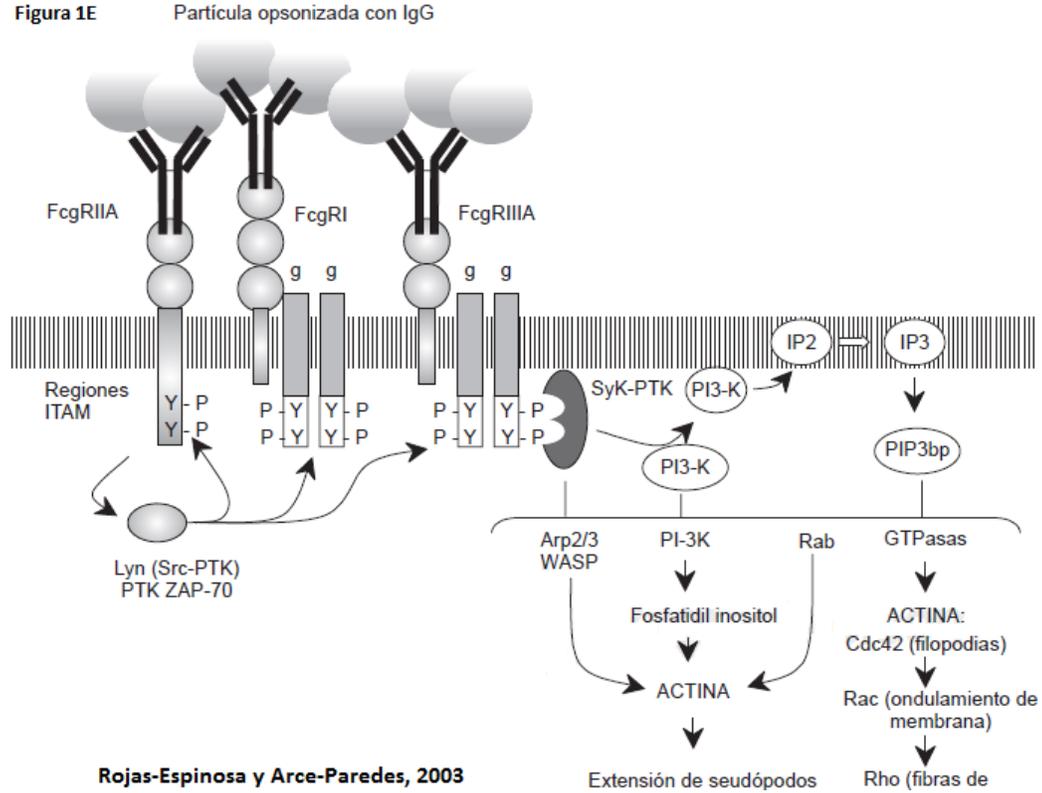
1.1.6.1 Receptores mediadores de endocitosis

La ingestión de microorganismos por las células fagocíticas ocurre a través de dos tipos de receptores: los receptores para constituyentes propios de los microorganismos (*Pattern-Recognition Receptors*) y los receptores para opsoninas. Los primeros incluyen a los receptores para manosa (MR), los receptores para mananos e integrinas (DEC-205), y los receptores para lipopolisacáridos (ScR, Scavenger Receptors). Los segundos, incluyen a los receptores para la proteína fijadora de manosa (MBPR, Mannose-Binding protein Receptor), la cual también es reconocida por el receptor para C1q, los receptores para la proteína surfactante A (SPR2), los receptores para inmunoglobulinas IgG (FcγR), y los receptores para complemento C3b (CR1) y C3bi (CR3)(Medzhitov y Janeway, 2000).

1.1.7 Transducción de señales

La mayor parte del conocimiento sobre las vías de señalización que conducen a la fagocitosis proviene del estudio de los receptores para inmunoglobulinas (FcγR). Estos receptores en los fagocitos humanos incluyen a FcγRI, FcγRII y FcγRIII. FcγRII tiene un dominio extracelular, un dominio transmembranal, y un dominio intracitoplásmico con dos regiones ITAM (*immunoglobulin gene family tyrosine activation motif*). FcγRI y FcγRIII carecen de ITAMs pero se encuentran asociados a proteínas adaptadoras que tienen las regiones ITAM. El entrecruzamiento de FcγRI y FcγRIII por sus ligandos promueve la fosforilación en los dominios ITAM de las subunidades gamma. La protein-tirosin-cinasa inicial (PTK) responsable de esta fosforilación es Lyn, un miembro de la familia Src. Las tirosinas fosforiladas en los dominios ITAM funcionan como sitios de unión de alta afinidad para los dominios SH2 de las proteín-tirosin-cinasas Src y Syk. Syk fosforila a la proteína p85bp y ésta se torna un sitio de captura para la protein-inosin 3 cinasa, PI3-K. PI3-K cataliza la formación de fosfoinositidos fosforilados como PIP3 el cual se une a una proteína enlazadora de PIP3 (PIP3bp). Ésta y otras proteínas, a través de las GTPasas Rac o Ras, promueven la polimerización de la actina. Así, la activación de Syk inicia una serie de cascadas de señalización que son causa de activación transcripcional, rearreglos en el citoesqueleto y liberación de mediadores inflamatorios. El entrecruzamiento de los receptores IγR por sus ligandos, resulta, finalmente, en la polimerización de la actina y la fagocitosis (Figura 1E) (Ravetch, 1997;Unkeless y Jin, 1997; Kwiatkowska y Sobota, 2001; Rollet-Labelle y cols., 2004).

Figura 1E



1.1.8 Receptores TLR (Toll like-receptors)

En mamíferos se han identificado cuando menos diez proteínas TLR (TLR1 a TLR10), todas con un dominio intracitoplásmico y una región homóloga al receptor para IL-1 y por lo tanto, capaces de transducir señales (cuadro II) (Modlin y col., 1999).

Cuadro II Receptores TLR en mamíferos y sus ligandos^a.

Receptor	Ligando
TLR1	Triacil-lipopéptidos (bacterias, micobacterias)
TLR2	Factores solubles (<i>Neisseria meningitidis</i>)
TLR2	Peptidoglicanas y lipoproteínas
TLR2	Glicoinositolfosfolípidos (<i>Trypanosoma cruzi</i>)
TLR2	Glicolípidos (<i>Treponema</i>)
TLR2	Porinas (<i>Neisseria</i>)
TLR2	Zimosan (levaduras)
TLR3	ARN de doble cadena (virus)
TLR4	Lipopolisacáridos (Gram-negativos)
TLR4	Ácido lipoteicoico (Gram-positivos)
TLR4	Lipoarabinomananas (Micobacterias)
TLR4	HSP60 y HSP70 (propias del huésped)
TLR5	Flagelina (bacterias)
TLR6	Lipoproteínas (diacil-lipopéptidos de micoplasma)
TLR9	CpG ADN

No se han identificado con certeza los ligandos naturales para TLR7, TLR8 y TLR10.

Anderson K, 2000

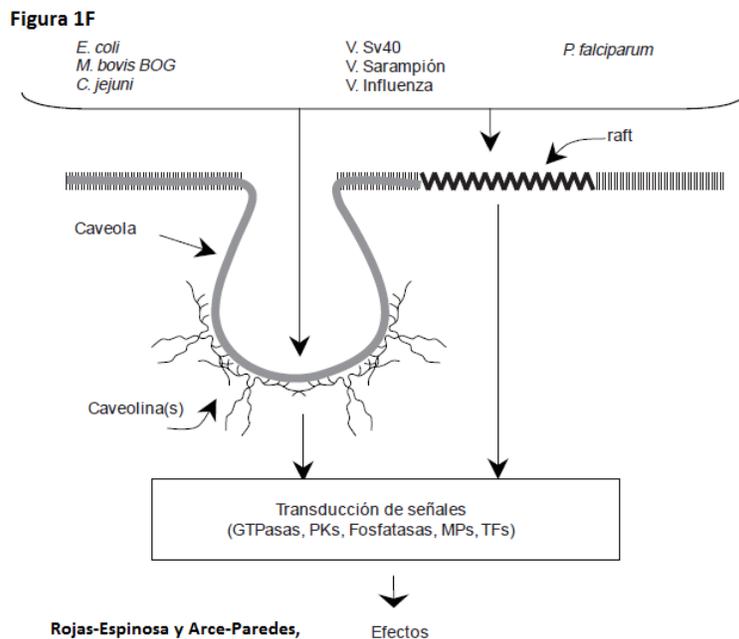
1.1.9 “Rafts” y caveolas

Algunos microorganismos también pueden penetrar a los fagocitos a través de “rafts” y de caveolas.

Los “rafts” son microdominios lipídicos presentes en la membrana plasmática y endosomal de todas las células eucarióticas. Estas regiones se encuentran enriquecidas en colesterol, glucoesfingolípidos y glucolípidos con fosfatidil inositol a través de los cuales se enlazan a las membranas celulares.

Las caveolas, son una variedad de “rafts”, localizadas en la membrana plasmática que adoptan una forma de botella y que además de los lípidos antes mencionados tienen unida al colesterol una o más proteínas de la familia de las caveolinas. Las caveolinas transportan colesterol del retículo endoplasmático, donde se producen a la caveola y regulan la actividad de las proteínas de señalización (tirosin cinasas) que se encuentran en la caveola. Es decir, las caveolinas participan en el transporte de colesterol del citoplasma a la membrana y regulan la actividad de las proteínas de señalización presentes en la caveola (proteincinasas). A través de cascadas de señalización, en las que intervienen GTPasas, proteincinasas (PKs), fosfatasas, proteínas motoras (MPs) y factores de transcripción, las señales iniciadas en las

caveolas se traducen en diversos efectos, entre ellos la polimerización de la actina y la activación del citoesqueleto (Figura 1F) (Jeoung-Sook y col., 2000; Schlegel y Lisanti, 2001).



1.1.10 Maduración de la vacuola fagosomal

Poco después de la internalización de la partícula ocurre la despolimerización de la actina F que en un principio queda asociada al fagosoma; la reciente membrana vacuolar se hace accesible a los endosomas tempranos. Luego ocurren eventos de fusión y de fisión, la membrana vacuolar y su contenido maduran, fusionándose con endosomas tardíos y finalmente con lisosomas para formar el fagolisosoma. La fusión fagolisosomal no necesariamente implica la fusión completa de las membranas, el paso del contenido lisosomal a la vacuola fagocítica ocurre a través de túneles vesiculares que sólo permiten el intercambio limitado del contenido vacuolar y que es congruente con el concepto de reciclamiento de la membrana. Otras proteínas como las GTPasas rab5, rab7 y rap1 (proteínas G pequeñas) se asocian secuencialmente a los fagosomas, conforme éstos maduran.

Los fagosomas no sólo presentan cambios en la composición de su membrana, también muestran cambios en su contenido; por ejemplo, adquieren tempranamente catepsina H, una enzima abundante en los endosomas tempranos y más tardíamente catepsina S, una enzima distintiva de los endosomas tardíos. Conforme maduran, los fagosomas se mueven sobre los microtúbulos; el tráfico de los fagosomas sobre los microtúbulos está dirigido por una serie de proteínas como la dineína, la dinactina y la kinesina (de Chastellier y Thilo, 1997).

1.1.11 Eventos no oxidativos de la fagocitosis y actividad microbicida

En leucocitos de humano, el pH intravacuolar disminuye sólo hasta 6.0-6.5. Aunque estos valores de pH pueden ser bien tolerados por los microorganismos, su efecto bacteriostático está relacionado con la activación de las enzimas que entran al fagosoma; a pH neutro la mayoría de las enzimas se encuentran como zimógenos inactivos.

Ahora se sabe que en la acidificación del fagosoma participa principalmente un sistema enzimático de localización endosomal que funciona como una bomba de protones(Strugill-Koszycki y col., 1994).

1.1.12 Gránulos lisosomales

Existen varios tipos de gránulos, dos de estos tipos están relacionados con la función hidrolítica digestiva de las células fagocíticas. Uno de ellos son los gránulos primarios o azurófilos, el otro tipo son los gránulos secundarios o específicos.

Los gránulos azurófilos contienen lisozima, elastasa, catepsina G, mieloperoxidasa, glicosidasas ácidas y otras hidrolasas, mientras que los gránulos secundarios contienen lisozima, lactoferrina y colagenasa (Bainton, 1975).

1.1.13 Cambios metabólicos oxidativos relacionados con la función microbicida

Pocos segundos después del contacto de las células fagocíticas con agentes quimiotácticos y con microorganismos, se detectan perturbaciones metabólicas que incluyen cambios en el potencial eléctrico, producción y liberación de cAMP, liberación de anión superóxido y escape de algunas enzimas lisosomales. Algunos cambios están relacionados con el metabolismo del oxígeno y del nitrógeno mientras que otros son de carácter no oxidativo.

Dentro de los cambios oxidativos que acompañan al proceso de la endocitosis se encuentran los incrementos en: (a) el consumo de oxígeno, (b) el consumo en glucosa, (c) la actividad del ciclo de las pentosas o hexosas monofosfato y (d) la producción de peróxido de hidrógeno. Al conjunto de estos cambios se le llama “estallido respiratorio” (Suzuki y col., 2011).

1.1.14 Reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) para evaluar la función fagocítica

La reducción de NBT ocurre cuando, compitiendo por el oxígeno, la molécula es reducida por el sistema NADPH-oxidasa hasta su estado de formazan, un producto insoluble de color azul. La reducción del NBT también ocurre por efecto directo del anión superóxido. El anión superóxido también reduce al grupo hemo del citocromo c ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$), incrementando su absorción de luz a 550 nm. Esta es la base para la cuantificación bioquímica del anión superóxido.

En la prueba del NBT, los neutrófilos se incuban con el colorante oxidado, se estimulan con éster forbólico (PMA) o con partículas ingeribles y se examinan al microscopio para buscar la presencia o ausencia de formazan azul dentro de las células. Usualmente la totalidad de las células normales son capaces de reducir al NBT mientras que los neutrófilos de pacientes con enfermedades crónicas granulomatosas no lo hacen (Bahener y Nathan, 1968).

1.2 Fagocitosis de eritrocitos por *Entamoeba histolytica*

Por todo lo descrito anteriormente, cuando se utiliza la palabra fagocitosis empleada por Metchnikoff desde 1892, inmediatamente viene a nuestras mentes la inmunología y los procesos biológicos de protección, pero hay que recordar que éste es un evento ancestral que evolutivamente fueron adquiriendo los primeros microorganismos unicelulares que aparecieron, entre ellos los protozoarios, en los cuales este proceso es la base de la nutrición y no de protección.

Fagocitos mieloides como macrófagos, células dendríticas y neutrófilos juegan un sinfín de roles en la inmunidad, la inflamación y la reparación de tejidos, siendo elementos fundamentales de la respuesta inmune innata en contra de los microorganismos y en la iniciación de la respuesta inmune adaptativa; los fagocitos son los primeros en detectar a los

agentes extraños usando receptores de superficie y luego incorporándolos para finalmente inactivarlos (Underhill y Goodridge, 2012). Sin embargo, no sólo estas células presentan el amplio evento de la fagocitosis, ya que microorganismos patógenos como *Entamoeba histolytica* poseen la característica de fagocitar causando un efecto contrario al de las células mieloides, cuya función genera un efecto benéfico. Con la comunicación de Lösch en 1875 del primer caso de disentería amebiana, se precisó la naturaleza hematófaga de *Entamoeba histolytica*. Desde entonces, ha estado en la mente de los investigadores que los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* ingieren hematíes (Lösch, 1875).

1.2.1 Evidencia por microscopía fotónica

No obstante, aunque se han reportado varios trabajos sobre la fagocitosis amebiana, el trabajo más completo hasta la fecha ha sido el que realizaron Chévez y col., en 1972. Llama la atención que en la amiba existe polarización funcional, sobre todo para la ingestión, que se realiza por el polo caudal del trofozoíto, sin que se pueda observar con métodos de microscopía alguna estructura especializada en este lugar que proceda a la captura de los hematíes. Los eritrocitos al ser ingeridos, sufren profundos cambios en su morfología y una vez introducidos al citoplasma empiezan a ser degradados paulatinamente.

Los cambios morfodinámicos que se realizan durante la eritrofagia están sujetos a diversos modelos y se dividen en 3 partes: a) captura, b) ingestión y c) digestión de los eritrocitos.

a) Captura. Los eritrocitos entran en contacto con los trofozoítos a través de alguno de los siguientes 3 mecanismos:

1. Accidental. La relación física entere las amibas y los eritrocitos es completamente circunstancial debido a que al inicio de la interacción, los hematíes chocan contra los trofozoítos inmóviles y quedan adheridos a su cuerpo.

2. Tropismo aparente. En este caso, los trofozoítos por medio de movimientos pseudopódicos entran en contacto con los hematíes inmóviles.

3. Atracción. Otras veces, los eritrocitos son atraídos por las amibas sin establecer contacto físico previo entre ellos; los eritrocitos toman forma piriforme y se adhieren firmemente a la membrana del trofozoíto.

La captura de los hematíes puede iniciarse en cualquier parte de la superficie del trofozoíto, pero su máxima intensidad se lleva a cabo en la región caudal, con respecto al desplazamiento.

Las nuevas propiedades físicas que adquieren los hematíes al contacto con la membrana del trofozoíto no sólo afectan la relación entre la amiba y los hematíes, sino que se transmiten también entre los hematíes originando la formación de grandes cúmulos de eritrocitos íntimamente adheridos entre sí y al polo caudal del trofozoíto. Con frecuencia los trofozoítos se desplazan y arrastran el cúmulo de hematíes durante un tiempo variable, antes de ser ingeridos.

b) Ingestión. La ingestión de los eritrocitos unas veces es sencilla y rápida mientras que en otras ocasiones es complicada y lenta. Con base en las observaciones realizadas por Chévez y col., en 1974, son 2 las modalidades principales de ingestión de los eritrocitos.

1. Forma laminar envolvente. El eritrocito es cubierto por un delgado velo citoplasmático, seguido de un movimiento suave de succión hacia el centro celular. Durante la ingestión no participan pseudópodos y el velo citoplasmático que envuelve al eritrocito avanza sobre él por medio de leves movimientos ondulatorios. La duración del fenómeno es de uno a tres min.

2. Invaginación. La incorporación del eritrocito hacia el citoplasma se hace por succión mediante un aparato captor que inicia con delgados y finos velos citoplasmáticos y termina en forma de trompa y túnel por el cual se desliza el hematíe hasta el interior del citoplasma.

Una notable modificación al mecanismo anterior consiste en que los hematíes son fragmentados en 2 o 3 partes por constricciones de la trompa y del túnel e incorporados por una succión enérgica. El tiempo de ingestión del

eritrocito varía entre 20 seg y 5 min. Esta modalidad de ingestión de hematíes es la más común.

La velocidad de ingestión es también variable y está en estrecha relación con la avidez de la amiba, así, se observa que un trofozoíto después de 6 a 8 h de haber adherido hematíes, puede no haberlos fagocitado aun. Durante la captura e ingestión de los glóbulos rojos, estos ya no vuelven a su forma y tamaño originales, sino que siempre quedan de menor diámetro y esferoidales. Además la cantidad de hematíes y la velocidad de su captura e ingestión ofrecen diferencias dependientes de la sangre empleada y esto puede deberse probablemente a propiedades antigénicas de los eritrocitos empleados.

c) Digestión. La digestión de los eritrocitos, como la captura e ingestión, es variable en tiempo y depende de la vivacidad y movimientos de la amiba. Durante el proceso digestivo, los hematíes disminuyen paulatinamente de tamaño hasta desaparecer después de 6 u 8 h.

Es de aceptar que los mecanismos de fijación, ingestión y digestión de los hematíes sean eventos consecutivos y armonizados dentro del proceso general de la eritrofagia, pero pueden separarse y considerarse aislados unos de los otros.

La polarización funcional que existe en la región caudal del trofozoíto para la ingestión de hematíes es uno de los fenómenos morfodinámicos que más han llamado la atención, ya que si el contacto y la fijación de los eritrocitos pueden llevarse a cabo en cualquier parte de la superficie de la amiba, es en la región caudal donde se concentran los acontecimientos que culminan con la ingestión de los hematíes.

Existen fuerzas que atraen y fijan firmemente los hematíes a la superficie del trofozoíto. La naturaleza y magnitud de tales fuerzas es difícil de precisar sólo con óptica, pero se puede suponer que se trata de fuerzas eléctricas y de tensión superficial entre la amiba y los hematíes. Al respecto conviene recordar la carga electronegativa de los hematíes y la extraordinaria adhesividad de las amibas.

Chévez y col., en 1974 observaron la eritrofagocitosis de diferentes especies animales y encontraron eventos importantes. Los hematíes de mono, son fagocitados en poco número, en cambio los de ajolote, son fagocitados con voracidad en grandes cantidades. Quedó demostrado que la eritrofagocitosis no es exclusiva para los hematíes humanos. La finalidad de su proyecto fue explorar si la voracidad de *E. histolytica* por los eritrocitos humanos se debe a la relación de especie, derivada de su situación de parasitismo obligado y si la afinidad o rechazo de *E. histolytica* por los hematíes de otros animales se relaciona con el grado de evolución de las especies en la escala filogenética y con sus hábitos ecológicos.

La captura de los hematíes se realiza por el polo posterior de los trofozoítos; en ningún caso existe rechazo o indiferencia totales para un determinado tipo de hematíe. La cantidad de eritrocitos retenidos y la fuerza de adhesión varían mucho según la especie.

Las fases tempranas de la eritrofagocitosis, el contacto entre el trofozoíto y los hematíes, la fijación de éstos sobre la superficie, la captura y localización en el polo funcional de incorporación, deben depender de la naturaleza y composición química de los hematíes, en especial de sus propiedades de membrana. El grado de fagocitosis puede ser una de las propiedades características de las cepas invasoras de *E. histolytica*. Por lo tanto, la eritrofagocitosis ha sido considerada tradicionalmente como uno de los criterios importantes para identificar trofozoítos patógenos de *Entamoeba histolytica*. Como continuación de una serie de estudios sobre las propiedades de superficie de *Entamoeba*, se ha demostrado que *in vitro* la ingestión de glóbulos rojos humanos por amibas patógenas y no patógenas correlaciona con la patogenicidad de las amibas (Trissl y col., 1978).

La eritrofagocitosis ha sido considerada como el criterio más importante de identificación de trofozoítos patógenos debido a que este proceso es más rápido y eficiente en cepas aisladas de casos de disentería comparados con el de amibas no patógenas o amibas provenientes de portadores asintomáticos. El elevado índice de fagocitosis podría ser una de

las propiedades de superficie relacionadas con la virulencia de las cepas patógenas de *E. histolytica* (Trissl y col., 1978).

Estudios previos han mostrado que la destrucción celular por *Entamoeba histolytica* ocurre en 3 pasos: (1) la adhesión, (2) la citólisis, y (3) la fagocitosis. (Gitler y col., 1984; Lynch y col., 1984; Ravdin y col., 1980; Ravdin y Guerrant, 1981; Ravdin y col., 1982).

La eritrofagocitosis y la colagenolisis *in vitro* se consideran como marcadores de virulencia en trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. Resultados obtenidos por Tsutsumi y col. (1992) sugieren que la eritrofagocitosis puede tomarse como un indicador cualitativo de la patogenicidad en cepas axénicas de *E. histolytica* y no como un indicador cuantitativo del grado de virulencia *in vivo*, según se estima por la producción de abscesos hepáticos en hámsteres.

1.2.2 Evidencia por microscopía electrónica

Entamoeba histolytica fagocita a los eritrocitos humanos de 2 maneras, siendo la más conocida la “fagocitosis clásica” que consiste en cómo la amiba mediante sus pseudópodos rodea y engulle totalmente a los eritrocitos, generando una vacuola del mismo tamaño dentro de ella misma. La segunda manera de fagocitar es el “mecanismo de succión” en el cual se empieza a generar un ataque lítico por extensiones citoplasmáticas de la amiba, en donde apenas logra tocar la superficie del eritrocito; subsecuentemente existe un plegamiento intenso y a la vez una licuefacción de la membrana eritrocitaria. Después de esto el eritrocito es succionado hacia adentro de la amiba por un canal delgado. En este caso en vez de formarse una vacuola grande con el eritrocito completo, se generan pequeñas vesículas llenas del eritrocito ya digerido dentro del citoplasma de la amiba (Lejeune y Gicquaud, 1987).

Los estudios de interacciones entre amibas y eritrocitos muestran un amplio polimorfismo y el proceso muestra una gran variedad entre cada uno de ellos. En interacciones tempranas los eritrocitos se adhieren sin un patrón

definido y se extienden prolongaciones citoplasmáticas largas y cortas de la amiba para capturar a los eritrocitos y poder ingerirlos, cada trofozoíto muestra entre 1 a 3 proyecciones extendidas aleatoriamente sobre su superficie. Incluso aunque las extensiones sean cortas, se muestra que atrapa a varios eritrocitos a la vez. En los procesos de la microfagocitosis ocasionalmente se vieron las membranas plasmáticas vacías, es decir, sin contenido citoplasmático quedando como un eritrocito “fantasma”. A los 5 minutos de interactuar parece ser que los eritrocitos tienden a polarizarse hacia un polo del parásito. En interacciones tardías varios eritrocitos que se encontraban juntos, aparentemente son ingeridos por amplias “bocas fagocíticas”. Por otra parte, sólo ocasionalmente en áreas individuales los eritrocitos eran ingeridos en partes diferentes al polo améxico que se forma mostrando deformidades durante el proceso. Depresiones amplias similares a “bocas fagocíticas” se han observado, pero sin eritrocitos y estas áreas corresponden a un solo polo del parásito (Tsutsumi y col., 1992).

Mora Galindo y Anaya Velázquez mencionan 3 estadios en los que transcurren los eventos de degradación: Estadio 1, corresponde al eritrocito humano intacto endocitado. Estadio 2, cuando dentro de la amiba se encuentran vacuolas que contienen a los eritrocitos con su matriz citoplasmática parcialmente degradada y las membranas plasmáticas aparentemente intactas. Estadio 3, cuando las vesículas de alimento para las amibas se forman y contienen principalmente membranas eritrocitarias con algunos materiales amorfos electrondensos (Mora-Galindo y Anaya-Velázquez, 1993).

1.3 Citoesqueleto en *Entamoeba histolytica*

El citoesqueleto en los eucariontes está compuesto principalmente de tres elementos: microfilamentos de actina, microtúbulos (tubulina) y filamentos intermedios. A pesar de que un factor de *E. histolytica* es la gran motilidad y que fagocita eficientemente, los componentes del citoesqueleto son simples. No se han identificado genes homólogos en *E. histolytica* que codifiquen para la red de proteínas de filamentos intermedios, incluyendo queratina, desmina y vimentina, generando una fuerte evidencia que en particular estos componentes del citoesqueleto son pobremente conservados en la evolución. En contraste, ya se han identificado componentes de los microfilamentos y los microtúbulos en *E. histolytica*.

1.3.1 Actina y microfilamentos

La información sobre el genoma de *E. histolytica* sugiere que la ameba utiliza más eficientemente las redes citoesqueléticas ricas en actina que otros protozoarios. Existen 8 genes que codifican para actina, además de otros 6 más que codifican actinas divergentes (Archibald y cols., 2003).

Bajo concentraciones fisiológicas salinas, la actina monomérica se ensambla en polímeros de actina-F para formar los microfilamentos. El ensamble y desensamble de actina es un proceso extremadamente dinámico y altamente controlado, dependiente de diferentes proteínas de unión a actina (Winder y Ayscough, 2005). El genoma de *E. histolytica* codifica proteínas homologas de unión a actina encargadas de cortar, agrupar, reticular y nivelar los filamentos de actina. El número y variedad de estas proteínas de unión a actina apoyan la idea de que el citoesqueleto de *E. histolytica* es rico en esta proteína fibrilar y esto está relacionado con la intensa dinámica morfológica y motriz de éste parásito.

Ya que la polimerización espontánea de los monómeros de actina es inhibida por la acción de proteínas secuestradoras como timosina β_4 y

profilina, una polimerización eficiente de actina requiere de la intervención de *factores promotores de la polimerización*. Los factores mejor descritos son el complejo Arp2/3 y la familia de proteínas de formina.

El complejo Arp2/3 está compuesto por dos proteínas relacionadas a actina (Arp2 y Arp3 que actúan como un templado para nuevos filamentos de actina) y trabaja en conjunción con 5 sub unidades: ARPC1, 2, 3, 4 y 5. Todas estas sub unidades han sido bien descritas en el genoma de *E. histolytica* y las sub unidades Arp2 y Arp3 son las mejor conservadas (Vartiainen y Machesky, 2004).

En contraste, *E. histolytica* posee 6 genes que codifican para forminas, que se han sugerido como potentes reguladores de la dinámica de células eucarióticas ya que parecen mostrar una habilidad para incrementar el ensamble de los filamentos de actina. Las forminas controlan el rearrreglo del citoesqueleto de actina, especialmente en la citoquinesis y la polarización celular (Higgs y Peterson, 2005).

Los filamentos de actina pueden crecer rápidamente por la adición de monómeros en los extremos. Los filamentos son regulados por varios mecanismos. Los filamentos longitudinales son controlados por proteínas de nivelación (como la gelsolina); estas proteínas bloquean la adición de nuevos monómeros y así actúan para disminuir el total de estos filamentos longitudinales. Además la gelsolina corta a los filamentos de actina y así se incrementa rápidamente la dinámica de la actina (Winder y Ayscough, 2005).

La organización de las redes de actina y el alto grado de orden de estructura es crucial para las funciones celulares. Estas estructuras pueden ser las responsables del total de las formas en el rearrreglo del citoesqueleto y a su vez, contribuir en los procesos celulares. Los rearrreglos de los filamentos de actina dentro de las matrices entrecruzadas, son también mediados por proteínas con múltiples dominios de unión a actina que permiten una mejor organización de los filamentos de actina. Ejemplos de estos tipos de proteínas son dímeros de filamina y tetrámeros de espectrina que son largos y flexibles (Vargas y col., 1996).

1.3.2 Tubulina y microtúbulos

E. histolytica tiene una baja capacidad de adaptación de tubulina con respecto a otras células eucarióticas. Están presentes proteínas homologas básicas de tubulina como α , β y γ , aunque otras tubulinas más características de organismos como los flagelados (ϵ y δ) están ausentes de *E. histolytica* (Dutcher, 2001). Los microtúbulos compuestos por α y β tubulina están intranuclearmente en *E. histolytica* (Vayssie y col., 2004). *E. histolytica* codifica proteínas que intervienen en el corte de los microtúbulos; estas proteínas son candidatos para el análisis experimental de mecanismos intranucleares para determinar la localización de los microtúbulos, así bien como para observar el tráfico de las tubulinas entre el citoplasma y el núcleo.

Hay poca información disponible que explique la organización de los microtúbulos y de la actina-F durante la motilidad de *E. histolytica* (Léung y col., 2002). Existen proteínas multifuncionales asociadas a los microtúbulos, estas proteínas son llamadas MAP's como la MAP1B, MAP2 que son buenos candidatos a asociarse a los microtúbulos porque actúan como enlazadores, ya sea a través de la dimerización de los MAPs con microtúbulos sencillos y sitios de unión a actina o actuando directamente como puentes entre dos citoesqueletos; estas proteínas MAPs han sido plenamente identificadas en el genoma de *E. histolytica* así como proteínas con dominios de unión a actina y a microtúbulos (Vargas y col., 1996).

1.3.3 Motores moleculares

La distribución de factores intracelulares y vesiculares se lleva a cabo utilizando tres transportadores moleculares: la miosina a lo largo de los microfilamentos y la kinesina y dineína a lo largo de los microtúbulos. Aunque *E. histolytica* es un protozoo altamente móvil, no se han observado fibras de estrés y microtúbulos citoplasmáticos. La familia de las miosinas basadas para los filamentos de actina, consisten por lo menos en 20 clases tanto estructurales como funcionales. El genoma humano contiene cerca de 40 genes para miosinas, representados en 12 clases, sin embargo, *E. histolytica* es la primera célula eucariótica reportada sólo con una sola miosina no convencional; esta miosina de cadena pesada (miosina IB) pertenece a la familia de miosinas tipo I (Eichinger y col., 2005).

Todos los miembros de la familia de las miosinas almacenan una estructura común compuesta por tres módulos: los dominos de cabeza, de cuello y cola. La región motora es el amino terminal, que utiliza ATP para poder moverse a lo largo de los filamentos de actina. Mediante la interacción con proteínas específicas, la cola es la responsable de funciones específicas y de localización. En particular, la presencia de dominios SH3 en la región de la cola son importantes para la unión de estas moléculas de miosina clase I con la maquinaria endocítica y el complejo Arp2/3. Las miosinas clase I son capaces de reclutar el complejo Arp2/3 (Marion y col., 2005). La miosina IB en *E. histolytica* juega un rol estructural en las redes de actina debido a la habilidad de entrecruzar filamentos. La actividad de la miosina IB en la estructuración del citoesqueleto regula el estado de la solidificación celular y la dinámica de la actina-F durante la fagocitosis (Marion y col., 2004).

La miosina más estudiada ha sido la convencional o también llamada miosina clase tipo II. Esta es una molécula de doble cabeza compuesta por dos cadenas pesadas y por dos pares de cadenas ligeras esenciales y regulatorias. La cola de la cadena pesada consiste en una α hélice, esta parte de la proteína en forma de cola enrollada es capaz de formar un dímero

paralelo que puede invertirse él mismo para asociarse con filamentos gruesos bipolares. Esto permite que la miosina II desempeñe un amplio papel en las matrices filamentosas, la cual da una alta velocidad en el movimiento. *E. histolytica* también tiene una miosina II de cadena pesada convencional, la cual ha sido reportada en desempeñar fases cruciales en la motilidad del parásito, en receptores de superficie del casquete y en la fagocitosis (Arhets y col., 1998).

El transporte direccional a lo largo de los microtúbulos depende de la dineína y la quinesina, ambas son proteínas motoras asociadas a los microtúbulos que convierten la energía química obtenida de la hidrólisis del ATP en movimiento. Estos motores son unidireccionales y se mueven ya sea hacia el extremo positivo o hacia el negativo de los microtúbulos. Las quinesinas y las dineínas están implicadas en un amplio rango de funciones, principalmente en el transporte intracelular de organelos durante la interfase y en la función de eje durante la mitosis y meiosis. Hasta la fecha no ha sido claramente establecido si el genoma de *E. histolytica* contiene el gen de la cadena pesada para la dineína sin embargo el gen para la cadena ligera sí está presente (Mallik and Gross, 2004).

Las quinesinas son motores moleculares dependientes de los microtúbulos y desempeñan roles importantes en el transporte intracelular y la división celular. Si bien el dominio motor es encontrado dentro del amino terminal en la mayoría de las quinesinas del tipo-N y en las quinesinas tipo-M y tipo-C se encuentran localizadas dentro del carboxilo terminal (Asbury, 2005). La posición de los dominios motores dicta la polaridad del movimiento de las quinesinas a lo largo de los microtúbulos; mientras quinesinas del tipo N y M son orientadas a extremos positivos las tipo C están hacia los extremos negativos.

La secuencia del genoma de *E. histolytica* predice sólo seis genes que codifican para quinesinas; cuatro para las de tipo-N, dos para tipo-C y para las de tipo-M aun no se han encontrado (Walenta y col., 2001).

2. Introducción

Entamoeba histolytica y *Entamoeba dispar* son dos de las 8 especies de *Entamoeba* que regularmente habitan en el humano. La primera especie es un organismo invasivo capaz de invadir la pared intestinal pudiendo llegar a generar una enfermedad extra intestinal; y la segunda, identificada a partir de un caso asintomático (Brumpt 1929). Debido a que estas dos especies cuando son vistas por microscopía de luz parecen ser morfológicamente iguales, fueron consideradas durante mucho tiempo como una sola especie. Sin embargo, estudios bioquímicos, inmunológicos y genéticos, proveen evidencia convincente que estas amibas pertenecen a especies diferentes; la primera evidencia sobre la existencia de diferencias biológicas entre *E. histolytica* y *E. dispar* fue la notable diferencia en el grado de aglutinación que presentan ambas especies, al contacto con la lectina concanavalina A (Martínez-Palomo y Robles, 1973).

Las características citológicas de *E. dispar* se han empezado a estudiar recientemente y se comparan con las de *E. histolytica*. Observaciones por microscopía de barrido electrónico, demuestra que *E. dispar* presenta una superficie más lisa que *E. histolytica* y su forma es polarizada, es decir forma un sólo pseudopodo frontal y un uroide en el extremo opuesto mientras que *E. histolytica* es pleomorfica, cambiando continuamente de forma y en la superficie se distinguen numerosos pseudópodos. En cortes observados al microscopio electrónico de transmisión, la capa de carbohidratos en la superficie de la membrana plasmática de *E. dispar* es notablemente más delgada que en *E. histolytica*. Además *E. dispar* muestra una menor capacidad fagocítica durante su interacción con monocapas de células MDCK en comparación con *E. histolytica*. Los núcleos y los componentes citoplasmáticos en estas dos especies son similares. (Espinosa-Cantellano y col., 1998).

Respecto a la patogenicidad de *E. dispar* estudios realizados por Espinosa-Cantellano y col. (1997) reportan que después de una inoculación intrahepática de esta amiba considerada como no patógena, macroscópicamente sólo se encontró un pequeño punto gris a los 7 días post-infección, en estas áreas analizadas por microscopía de luz se identificó un foco inflamatorio con infiltración moderada. Esta infiltración de tipo aguda estaba compuesta principalmente por neutrófilos y eosinófilos. Un estudio subsecuente inoculando en cavidad abdominal, a 7 días post-infección, dos de seis hámsteres presentaron una moderada adhesión hacia el diafragma e intestino generando una lesión hepática caracterizada por un punto amarillo. La observación de estas áreas reveló una congestión de vasos y un amplio infiltrado inflamatorio caracterizado por elementos tanto agudos como crónicos; desde eosinófilos, macrófagos, y células mononucleadas, sin embargo no se presentó ninguna área de necrosis o evidencia de algún trofozoíto de *E. dispar*. Con este resultado se concluyó que estos trofozoítos sólo inducen una respuesta inflamatoria local, siendo incapaz de producir regiones necróticas que evolucionen a un absceso hepático, incluso con una concentración mayor de inóculo que el utilizado con *E. histolytica*.

Sin embargo una cepa de un paciente brasileño sintomático sin disentería cultivada monoxenica y otra polixénica, se reportó que podía causar daño hepático. Los cultivos xénicos aislados y clonados de *E. dispar* fueron tratados para su monoxenización usando al organismo asociado *Crithidia fasciculata* mientras que los cultivos xénicos estaban compuestos por la misma flora bacteriana del paciente. Estos cultivos xénicos muestran una actividad lítica moderada contra células VERO y células MDCK, sin embargo causan daño hepático severo en hamsters comparable con el causado por una cepa virulenta de *E. histolytica* (Costa y col., 2006; Dolabella y col., 2012). A pesar de que *E. dispar* no ha sido asociada con una enfermedad invasiva en el hombre, la habilidad de trofozoítos xénicos para producir prominente daño tisular en condiciones experimentales, ha

indicado que algunas cepas tienen un potencial patógeno considerable cuando está en presencia de bacterias.

Los glicoconjugados de la superficie de la membrana plasmática juegan un papel preponderante en el reconocimiento celular. Estas macromoléculas muestran una diferencia significativa entre *E. histolytica* y *E. dispar*, ya que los glicoconjugados que contienen residuos de D-manosa y N-acetil- α -D-galactosamina se expresan más en *E. histolytica* que en *E. dispar* (Pacheco y col., 2009). Estas diferencias en las características de superficie entre ambas especies podrían estar involucradas en el tropismo por la célula blanco y repercutir en las capacidades patógenas de cada una de las especies.

Por otra parte es importante especular que al axenizar un cultivo de *E. dispar*, los trofozoítos se inhabilitan para obtener suficientes nutrientes y a su vez, la poca tolerancia a los metabolitos tóxicos que desechan en el medio, es lo que podría estar afectando a *E. dispar* en su capacidad invasiva (Costa y col., 2006).

El estudio de los fagosomas entre ambas especies también ha revelado diferencias significativas. Experimentos con bacterias encontraron que los fagosomas son más grandes, el número de bacterias contenidas es mayor, la degradación es más rápida y se realiza a un pH más ácido en *E. histolytica* que en *E. dispar*. El potencial de acidificación de los fagosomas baja al momento de utilizar inhibidores de miosina, de microtúbulos o de actina siendo más prominente con la inhibición de la miosina. En contraste, inhibidores contra microtúbulos o cistein proteasas muestran distintos efectos sobre la degradación en los fagosomas entre estas dos especies. Aunque la despolimerización de los microtúbulos inhibe severamente la degradación de los fagosomas de *E. histolytica*, en *E. dispar* no afecta la degradación; de una manera similar ocurre con la inhibición de las cistein proteasas (Mitra y col., 2005). Esto demuestra claramente que los principales componentes del citoesqueleto están relacionados al menos con la capacidad degradativa de organismos fagocitados por cualquiera de las dos especies.

La similitud entre *E. histolytica* y *E. dispar* en relación a su composición genética, biología celular y hospederos, constituye una importante área de investigación para identificar y analizar los factores que pueden estar relacionados con la capacidad de desarrollar una infección invasiva. Se ha demostrado que la habilidad de ingerir y eliminar células blanco está estrechamente asociada con el grado de patogenicidad de estas amibas e involucra directamente a su citoesqueleto (Wilson IW y col., 2012).

3. Justificación del trabajo

Mientras que algunas personas infectadas con amibas presentan un cuadro clínico característico, la mayoría de ellas son asintomáticas. En años recientes se ha aceptado que ambas infecciones amibianas son causadas por dos especies de amibas morfológicamente similares pero con diferente potencial patógeno.

La eritrofagocitosis, el metabolismo de especies reactivas de oxígeno así como la capacidad de reestructuración del citoesqueleto de actina, son elementos importantes en relación con el carácter patógeno o no-patógeno. Por lo tanto, podríamos esperar diferencias en estas capacidades entre *E. histolytica* causante de la amibiasis invasora y *E. dispar* identificada en los casos asintomáticos.

Capítulo IV

4.1 Hipótesis

Entamoeba dispar posee una menor capacidad eritrofagocítica, de producción de especies reactivas de oxígeno y del rearreglo del citoesqueleto de actina en comparación con *Entamoeba histolytica*.

4.2 Objetivo General

Estudiar comparativamente a nivel morfológico y bioquímico el evento de la eritrofagocitosis en *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*.

4.3 Objetivos Particulares

- a. Cuantificar la capacidad eritrofágica de las dos especies de *Entamoeba* a diferentes tiempos.
- b. Cuantificar la actividad de óxido-reducción sobre levaduras fagocitadas por los trofozoítos en ambos tipos de amibas.
- c. Analizar el contenido de actina y su capacidad de polimerización en ambas especies.

5. Materiales y Métodos

5.1 Cultivo de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*

Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (cepa HM1:IMSS) y *Entamoeba dispar* (cepa SAW 760 RR clona A) fueron cultivados axénicamente a 37°C en tubos estériles de 16 x 125 mm, conteniendo medio TYI-S-33 y LYI respectivamente, suplementado con 10% de suero bovino previamente inactivado por calor a 56°C durante 30 min, 2% de la mezcla de vitaminas de Diamond y 1% de penicilina y estreptomicina. Para cultivos masivos se utilizaron botellas de cultivo de 25 cm² de superficie.

La resiembra se realizó con cultivos en fase logarítmica de crecimiento, se dejaron en forma vertical para que por gravedad se formara un sedimento en el cual están las amibas muertas, posteriormente se succionó el sedimento, se decantó el medio viejo y se le adicionó medio nuevo, después de eso se incubaron en baño de agua-hielo a 4°C durante 5 min agitando suavemente para que las amibas que estaban adheridas al cristal se desprendieran de las paredes. A continuación, se tomó una alícuota de 0.7 – 1 ml en el caso de *Entamoeba histolytica* y 2 ml en el caso de *Entamoeba dispar* para subsecuentemente transferirlas a un tubo con medio nuevo y llevar a un volumen de 12 ml para *E. histolytica* y 13 ml para *E. dispar*. Los tubos ya resembrados se observan al microscopio de luz para corroborar que las amibas hayan sido transferidas correctamente y finalmente éstos fueron incubados a 37°C.

5.2 Cuantificación de amibas en cámara de Neubauer

Según los requerimientos de crecimiento amibiano se colocaron 4 tubos con amibas en hielo durante 9 min y el contenido de los mismos se pasó a un tubo Falcon de 50 ml, posteriormente se centrifuga a 3,000 R.P.M. por 4 min, el sobrenadante se desecha, y la pastilla se resuspendió en medio TYI sin suero, con la cantidad necesaria para por lo menos tener 3 alicuotas de 500 µl con 0.5×10^6 amibas por ensayo. Subsecuentemente se tomaron 10 µl del medio TYI en donde se encontraban suspendidas las amibas y se colocaron en la cámara de Neubauer para posteriormente contar los 4 cuadrantes. Después de sacar un promedio, se multiplica por 10,000 (factor de dilución de la cámara) y se multiplica por el volumen del cual se partió del tubo en donde crecieron las amibas.

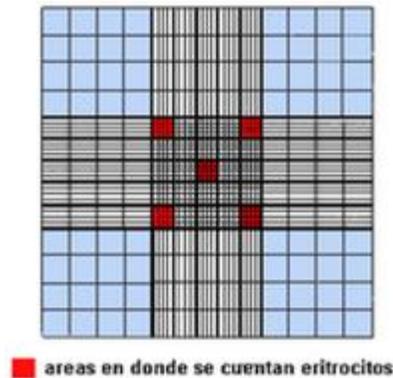
$$\frac{X+X+X+X}{4} = \bar{X}$$

$$\bar{X} \times 10,000 \times 12\text{ml} = \# \text{ de Amibas}$$

5.3 Obtención de eritrocitos humanos

Los eritrocitos empleados fueron del tipo sanguíneo B Rh + y se obtuvieron por punción venosa con una jeringa estéril (1 ml) utilizando como anticoagulante la solución Alsever p.H. 6 (2 ml). La muestra se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó a 2,500 R.P.M. por 20 min para separar a los eritrocitos de los demás componentes; una vez separada la solución del paquete globular, con una pipeta Pasteur se extrajo la solución Alsever y el velo blanco que se formó en la interfase para desecharlo posteriormente. Después la muestra se transfirió a un tubo eppendorf y se lavó 3 veces con PBS a una velocidad de 1,700 R.P.M quitando el sobrenadante y dejando únicamente la pastilla.

El paquete globular se diluyó con PBS (1:10) y subsecuentemente una vez más (1:100) para disminuir la concentración de eritrocitos, quedando una dilución final de 1:1000. Se tomaron 10 µl de la última dilución y se hizo el conteo en la cámara de Neubauer con la siguiente fórmula:



$$\frac{\# \text{ Eritrocitos (de los 5 cuadrados)}}{5} \times 25 \times 10,000 \times 1,000 = X \text{ Eritrocitos/ml}$$

Por último se ajustó en número de eritrocitos a una proporción de 0.5×10^8 por cada 500 µl con medio TYI incompleto.

5.3 Ensayo cuantitativo de eritrofagocitosis

Se utilizó una proporción de 1:100 (amiba:eritrocito) por lo que se tuvieron que mezclar en un tubo eppendorf 500 µl de amibas y 500 µl de eritrocitos (0.5×10^6 y 0.5×10^8 respectivamente). Se realizó la interacción a tres diferentes tiempos, 5, 10 y 15 min y se homogeneizó suavemente la suspensión celular para después incubar a 37°C y la interacción eritrofagocítica se detuvo por incubación en hielo. En seguida se procedió a centrifugar las muestras a 900 R.P.M por 4 min, se recolectó el sobrenadante y a cada pastilla se le agregó 1 ml de glutaraldehído al 2.5% durante 1 h para realizar la fijación. Posteriormente se hicieron lavados con PBS pH de 6.8; 2 lavados a 900 R.P.M por 4 min y luego otros 3 lavados a 800 R.P.M. por 4 min para eliminar todos los eritrocitos que no hayan sido fagocitados y estuvieran en el sobrenadante. Después de eso se realizó la

tinción de Novikoff para teñir a los eritrocitos y cuantificar la eritrofagocitosis en cada uno de los tiempos por microscopía de luz.

5.3.1 Tinción de Novikoff

Consistió en añadir 1 ml de la siguiente mezcla e incubar las preparaciones por 30 min a 37°C protegiéndola de luz y con una solución fresca de 3,3´diaminobenzidina (DAB) disuelta en 2-amino-2metil propanodiol (AMDD o Ammediol) 0.05 M (2 mg/ml) y 20 a 30 µl de H₂O₂ al 30%, ajustando el pH a 9.7.

Cálculos para la solución Novikoff.

Ammediol (C₄H₁₁NO₂)

$$\begin{array}{r}
 C_4 = 12.01 \times 4 = 48.04 \\
 H_{11} = 1.007 \times 11 = 11.07 \\
 N = 14 \times 1 = 14 \\
 O_2 = 16 \times 2 = 32 \\
 \hline
 PM = 105.11
 \end{array}$$

	Se utilizaron 20 ml	
105.14 g ----- 1 Mol	→	5.257g ----- 1000 ml H ₂ O
X ----- 0.05 Mol		X ----- 20 ml H ₂ O
X = 5.257 g para 1 L		X = 0.10514

Y a la solución amortiguadora de Ammediol se le adicionaron 0.04g de DAB.

$$2 \text{ mg} \text{ ----- } 1 \text{ ml}$$

$$\begin{array}{l}
 X \text{ ----- } 20 \text{ ml} \\
 X = 40 \text{ mg}
 \end{array}$$

- Se pesó en la balanza analítica 0.04 g

Después de transcurrido el tiempo se lavaron las muestras 3 veces con PBS dejándolas con el último lavado. Luego se tomaron 10 µl de cada muestra para colocarlos en un portaobjetos y así contar los eritrocitos ingeridos por cada una de las amibas, haciendo un conteo de 100 amibas.

5.4 Determinación indirecta de la eritrofagocitosis (cuantificación de hemoglobina)

Se usó una proporción de 1:100 (amiba:eritrocito) por lo que se tuvieron que mezclar en un tubo eppendorf 500 µl de amibas y 500 µl de eritrocitos (0.5×10^6 y 0.5×10^8 respectivamente). Se realizó el ensayo eritrofagocítico a los tiempos de 5, 10 y 15 min y se detuvo la interacción con hielo para después centrifugar a 1100 R.P.M. por 10 min. Se lavó una vez con PBS y posteriormente se lavó con solución Turk al 3% 5 veces más para finalmente centrifugar una última vez a 2100 R.P.M. por 5 min. A cada una de las pastillas se le agregó 1 ml de ácido fórmico concentrado y se llevó a cabo la lectura de cada muestra en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 400 nm.

Para la lectura de las muestras en el espectrofotómetro se tuvieron que transferir las muestras a celdas de plástico y como blanco se usó 1 ml de ácido fórmico puro.

5.5 Cultivo de levaduras de *Candida albicans*

Levaduras de la cepa de *Candida albicans* CA14 generadas a partir de la cepa SC5314 (*Clinical Systemic Isolate*) (Fonzi e Irwin, 1993), fueron cultivadas axénicamente a 28 °C en tubos estériles de 16 x 125 mm, conteniendo 10 ml de medio YPG suplementado con extracto de levadura al 1%, peptona de caseína al 2%, glucosa al 2%, pH final de 6.8 manteniéndolas en agitación a 200 R.P.M. durante 24 h.

Para cosechar las levaduras previamente se deben encontrar a 4 °C en PBS al 1% y no dejarlas por más de una semana almacenadas ya que a falta de nutrientes, estas inducen micelio. Una vez hecho lo anterior, se procedió a centrifugar durante 1 min a 1500 R.P.M. para posteriormente decantar el medio. Las levaduras se volvieron a resuspender en 1 ml de PBS y posteriormente se pasaron a un tubo Eppendorf para centrifugar de nuevo a 1700 R.P.M. durante 1 min. Se quitó el medio una vez más y para hacer un

último lavado se resuspendieron en 1 ml de PBS y las levaduras previamente contadas en cámara de Neubauer se almacenaron a 4 °C.

5.6 Reducción del nitro azul de tetrazolio (NBT) para evaluar la función fagocítica.

Se utilizaron cultivos de 72 h. Las amibas se centrifugaron y se resuspendieron en medio TYI sin suero. Se ajustó el número de amibas para ponerlas en cubre objetos y realizar las interacciones amiba-levadura a 30 min, 1 y 2 h así como sus respectivos controles de levaduras y amibas.

El NBT se preparó a una concentración de 1 mg/ml en solución estéril de PBS 0.1%. La concentración idónea para utilizar este reactivo es de 0.05% sumando la cantidad de volumen que se utilizó en las interacciones (Hellum, 1977); es decir, que la proporción que se utilizó fue de 350,000 amibas resuspendidas en 400 µl más 35,000,000 de levaduras resuspendidas en 100 µl y 500 µl de NBT. La manera en que se procedió a agregar estos componentes fue colocar primero las amibas sobre el cubre objetos y dejarlas adherir durante 15 min, posteriormente agregar las levaduras e inmediatamente el NBT cuidadosamente gota por gota sobre toda la superficie del cubreobjetos, después de esto se incubaron durante 30 min, 1 y 2 h a 37 °C respectivamente.

Al finalizar las interacciones, la reacción se detuvo agregando 1 ml de metanol al 70% disuelto en PBS durante 10 min y se realizó un lavado con PBS para retirar el exceso de metanol; subsecuentemente se le agregó safranina al 0.5% disuelta en agua durante 1 min y se retiró el excedente con lavados hasta que la muestra estuviera ligeramente teñida.

Después de los lavados, se montó el cubre objetos ligeramente húmedo sobre un porta objetos para realizar el conteo de las levaduras que se habían logrado reducir utilizando un microscopio de contraste de fases. El conteo se llevó a cabo por microscopía de luz de contraste de fases tomando al azar 100 amibas por cada muestra procesada.

5.7 Análisis estadístico

A los datos obtenidos del número de eritrocitos fagocitados, absorbancia de hemoglobina y amibas que redujeron azul de tetrazolio al estar expuestas a levaduras patógenas a lo largo de los diferentes tiempos y de cada cepa en particular, les fueron calculadas las medidas descriptivas siguientes: media, desviación estándar, mínimo, cuartiles (Q1, Q2, Q3), máximo y coeficiente de variación; así mismo se elaboraron diagramas de caja y bigote para describir con mayor detalle los fenómenos que ocurren en el proceso de la eritrofagocitosis y fagocitosis.

Para determinar si existían diferencias significativas entre el número de eritrocitos ingeridos, absorbancia de la hemoglobina y amibas que mostraran una reducción del NBT a su estado de formazan por estar expuestas a levaduras patógenas a lo largo del tiempo y por cepa, se aplicaron análisis de varianza factorial (ANOVA) con los datos transformados de las variables mencionadas (los datos fueron transformados utilizando la técnica de Box-Cox); Lo anterior se hizo de esta manera porque previamente se aplicó la prueba de Anderson-Darling la cual indicó que los datos no eran normales. Una vez realizada la prueba de ANOVA y determinar entre qué cepas y tiempos hubo diferencias, se aplicó la prueba de Tukey, que ayudó a medir la diferencia de los valores de la media de cada uno de los grupos en términos de varianza intragrupal.

5.8 Ensayo de inmunofluorescencia para monitorear la reestructuración de actina entre *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*.

El ensayo de inmunofluorescencia se llevó a cabo a 3 tiempos (15, 30 y 60 min) en 2 diferentes sustratos; uno inerte (vidrio) y otro biológico (fibronectina) y las amibas se dejaron adherir sobre los cubreobjetos previamente estériles en cajas Petri de un diámetro de 3.5 cm. La cantidad de amibas resuspendidas en medio TYI sin suero fue de 250,000 en 300 μ l. Transcurridos los tiempos determinados para que las amibas se adhirieran,

se retiró el exceso de medio para dejar únicamente las amibas adheridas al cubreobjetos, después de esto, se añadieron 500 µl de p-formaldehído precalentado al 4% disuelto en PBS durante una hora a 37°C; transcurrido el tiempo se retiró el exceso de p-formaldehído y se lavaron los cubreobjetos con PBS por triplicado. Se bloqueó con 1 ml suero fetal bovino (SBF) al 10% durante 1 h a 37 °C y después se lavó por triplicado con PBS. Posteriormente se incubaron las preparaciones con 50 µl de faloidina rodaminada dilución 1:50 durante 30 min a 37 °C y transcurrido el tiempo se lavaron por triplicado con PBS. Finalmente se le agregaron 12 µl de Vecta Shield con DAPI y se montaron las muestras en un portaobjetos. Es importante quitar el exceso de Vecta Shield antes de sellar los bordes con barniz transparente para preservar húmeda la muestra. Al final se guardaron las preparaciones a -70 °C bajo protección de luz hasta llevar las muestras al microscopio confocal LSM 700.

5.8.1 Procesamiento de los cubreobjetos

Los cubreobjetos se lavaron con agua y jabón para eliminar cualquier residuo de grasa que pudiera interferir en la observación. Una vez secos y completamente limpios se colocaron en las cajas de Petri de 3.5 cm para manipularlos de manera más eficiente. A los cubreobjetos que llevarían el sustrato biológico, se les colocó 100 µg de fibronectina resuspendidos en 100 µl y se dejaron en la campana con luz ultravioleta junto con las otras cajas que contenían solamente el vidrio durante toda la noche para esterilizarlas y que la solución de fibronectina se evaporara y así quedara adherida al cubreobjetos (Una vez evaporada la solución de fibronectina, las cajas se pudieron almacenar a 4 °C).

5.9 Fraccionamiento de proteínas por centrifugación

Se colocaron 10×10^6 amibas de *E. histolytica* y *E. dispar* por caja Petri utilizada (total de 4 cajas, 1 en puro plástico y 1 con 1 mg/ml de fibronectina disuelta en PBS para cada especie). Se pusieron las amibas

resuspendidas en 35 ml de medio sin suero y se dejaron interaccionar por 1 h. Al transcurrir el tiempo, se retiró el medio sin suero sin tocar el fondo hasta dejar completamente secas las cajas para después almacenarlas a -70°C . Al retirar las cajas del congelador, se les adicionaron 300 μl de buffer de lisis que contenía inhibidores de proteasas y Tritón-X100 al 2.5%, posteriormente se raspó el plástico para desprender completamente a todas las amibas y esos 300 μl se succionaron y se pasaron a un tubo eppendorf (se llevaron al vortex 30 s por 30 s de descanso durante 5 min a 4°C). Para la obtención de fracciones de proteína se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min a 4°C . En el centrifugado resultante quedó una pastilla que corresponde a la fracción insoluble que contiene la porción de citoesqueleto polimerizado y en el sobrenadante la fracción soluble que contiene la actina globular no polimerizada. Se tomaron 100 μl de la parte soluble, se almacenó durante 1 h a -20°C , después se le agregaron 900 μl de acetona al 90%, se centrifugó a 14,000 R.P.M. por 20 min a 4°C y al finalizar se retiró el sobrenadante que contenía acetona y sales; se dejó abierto el tubo para que se evaporara la acetona remanente y dejar completamente seca la nueva pastilla correspondiente a la fracción soluble, finalmente se guardó esa pastilla para procesarla posteriormente. La pastilla que contiene actina filamentosa se resuspendió en buffer de lisis con inhibidores sin Tritón-X100 y se llevó al vortex por 1 min y se volvió a centrifugar a 14000 R.P.M. por 20 min a 4°C 3 veces más. Para las pastillas de la fracción soluble e insoluble se resuspendieron en 100 μl de buffer de lisis sin Tritón-X100 y se les llevó al vortex por 1 min y en hielo 1 min 5 veces. Al material resuspendido se le tomaron 5 μl por muestra para cuantificar la proteína (Ver método de cuantificación de proteína por el método de Lowry). A la cantidad sobrante de las muestras procesadas se les adicionó buffer de muestra (1X, 2X ó 4X dependiendo de la cantidad final que se requiera) para que quedara un volumen total no mayor a 30 μl . Eso se lleva al vortex por 1 min y se hierve 3 min; después vortex 1 min más y se dejan en hielo para posteriormente cargar las muestras en los geles. Una vez cargados los geles y montados en

la cámara de electroforesis, se enciende la fuente de poder y se lleva a 100 V, y una vez que las proteínas atraviesan la parte concentradora del gel, se aumenta el voltaje a 120 V; de los 2 geles que se prepararon uno se reveló con tinción de plata para perfil de proteínas y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para subsecuentemente hacer un western blot para determinar la cantidad de actina polimerizada y globular con la que cuenta cada especie de amiba de acuerdo a cada condición, esto por medio de un análisis densitométrico con el programa ImageJ versión 1.46a y un análisis estadístico con el programa GraphPad Prism versión 5

Gel de perfil de proteínas: Una vez desmontado, el gel se colocó en una solución desteñidora por 1 h en agitación a temperatura ambiente (o toda la noche), después se lava 3 veces por 10 min con agua destilada y posteriormente se tiñó con plata (la tinción de plata es más sensible que la tinción con azul de Coomassie); el reactivo contiene 7 ml de agua, 1 ml de reactivo 1 (solución de complejos de plata) 1 ml de reactivo 2 (solución moderadora de reducción), 1 ml del reactivo 3 (reactivo de revelado de imagen) y 5 ml de acelerador (es muy importante adicionarlos en ese orden). No existe un tiempo determinado de incubación para que aparezcan las bandas; el revelado depende en gran medida de la concentración de proteínas en el gel. Una vez que apareció la tinción, se desechó el líquido y se puso en solución desteñidora por 15 min para lavarlo y detener la reacción. Después se puede poner en agua para evitar que se seque y así almacenarlo el tiempo que sea necesario.

Gel transferido: El gel que se transfirió se montó entre un sándwich que llevará unas esponjas, papeles filtro y en el centro la membrana de nitrocelulosa y el gel; este sándwich se montó en una cámara de transferencia y se dejó transfiriendo con un voltaje de 30 V durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente al desmontar el sándwich se sacó la membrana, se recortó y se pasó a una caja más pequeña para ponerla en TBST y evitar que perdiera humedad (el TBS a una concentración de 10X,

habrá que prepararlo a 1X y a esta preparación se le agregara $\frac{1}{2}$ ml de Tween-20 para convertirlo en TBS-T), luego se le quitó el TBS-T y se le agregó TBS-T con leche al 5% para bloquear (10 ml de TBS + 0.5 g de leche Svelty sin grasa y sin fibra por membrana) por 1 h. Se decantó y se lavó rápidamente 2 veces con TBS-T. Se volvió a poner TBS-T en cajas Petri grandes y se pasó la membrana, se selló con parafilm y se llevaron al cuarto frío para dejar en agitación de 24 a 36 h (entre semana son 10 lavados de 10 min después de bloquear); sí se dejó toda la noche, lavar 5 veces más por 10 min. Después se preparó leche al 5% con TBS-T (10 ml por membrana) y la membrana se transfirió a una caja Petri más pequeña para ponerle los 10 ml de TBS-T leche al 5% más el anticuerpo anti actina (2 μ l) a una dilución de 1:5000 (1 μ l por cada 5 ml). Una vez puesto el primer anticuerpo se selló con parafilm y se dejó en agitación a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se recuperó el anticuerpo, se etiqueta para saber cuántas veces se ha usado (sólo se puede utilizar un máximo de 3 veces) y se almacenó a -20 °C. Después se pasó la membrana a una caja más grande y se hicieron 3 lavados por 5 min con TBS-T para luego decantar el último lavado y nuevamente pasar la membrana a una caja más pequeña y ponerle 10 ml de leche al 5% con TBS-T y poner el anticuerpo anti ratón acoplado a peroxidasa en una dilución 1:1000 (1 μ l/ml) y se dejó incubar en agitación 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se desechó la leche que contiene el anticuerpo secundario y se lavó 3 veces por 10 min con TBS-T.

5.9.1 Revelado de la membrana de nitrocelulosa

Se prepararon por separado el fijador y el revelador (109 ml de cada uno y aforados a 500 ml). En el cuarto oscuro se preparó el material revelador, las placas y reactivos para posteriormente en una tapa colocar una proporción de 1:1 de peróxido y luminol para mezclar ambos con una pipeta (500 μ l de cada uno). Se tomó la membrana de nitrocelulosa, se escurrió por la orilla haciendo que tocara papel absorbente y se mojó la membrana con la mezcla varias veces con ese mismo 1 ml (este

procedimiento permite que la enzima conjugada al anticuerpo secundario se una al substrato y lo procese para dar lugar así a la generación de luminiscencia; esto se puede apreciar a simple vista por un ligero brillo en la membrana). Una vez que se vio que la membrana dio luminiscencia, ésta se colocó dentro del casete de revelado por debajo del plástico que contienen en el interior (es muy importante montarla debajo del plástico porque si no la membrana se pegará a la placa de revelado). Una vez montada la membrana, se colocó encima una placa reveladora alrededor de 5 a 30 seg; enseguida se pasó rápidamente a la solución reveladora hasta notar la aparición de las marcas, una vez que se percibe que la placa se reveló, se pasó a otra charola que contenía agua para enjuagarla e inmediatamente a otra charola que contenía la solución fijadora. Las placas de autoradiografía se escurrieron y se dejaron secar para entonces proceder al análisis del resultado (NOTA: todos estos tiempos desde el montaje de la placa y los enjuagados pueden variar a conveniencia para que se obtenga un resultado óptimo).

5.9.2 Preparación de geles bis acrilamida

Previamente se tiene que saber a qué concentración se necesita preparar el gel separador SDS-PAGE de poliacrilamida dependiendo del peso de la proteína que se está buscando para utilizar la cantidad de reactivos correctos; en este caso los geles se prepararon al 10%.

Gel separador

Solución	15%	12.5%	10%	7.5%	5%
Amortiguador pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Bis-acrilamida	5.0 ml	4.2 ml	3.3 ml	2.5 ml	1.69 ml
Agua bidestilada	2.5 ml	3.3 ml	4.2 ml	5.0 ml	5.91
Persulfato de amonio 10%	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Se lavaron, se secaron y se montaron los 2 vidrios en la cámara, ya una vez fijados correctamente, se llenaron con agua para asegurar que no existan fugas. Se decantaron y se secó con papel el remanente de agua.

Se preparó la mezcla para el buffer separador al 10%. Después de adicionarlo a las placas (3.5 ml aproximadamente) se agrega isopropanol para que la superficie del gel quede uniforme, posteriormente se esperó a que la acrilamida polimerizara y se procedió a preparar el gel concentrador (Nota: el gel separador debe llegar apenas a donde comienza la porción verde de la cámara, para dar espacio suficiente para colocar una buena cantidad de gel concentrador).

Gel concentrador

Amortiguador pH 6.8	0.75 ml
Bis-acrilamida	0.50 ml
Agua bidestilada	1.75 ml
Persulfato de amonio 10%	40 μ l
TEMED	2 μ l

Una vez polimerizado el gel separador, a la mezcla para el gel concentrador se le añadieron los últimos 2 reactivos y una vez mezclado todo, el volumen total se colocó rápidamente en la cámara, ya que polimeriza en un tiempo muy corto; inmediatamente se colocó el peine y se esperó a que solidificara (Nota: el gel concentrador se debe colocar hasta el borde del vidrio, casi hasta que se derrame. Al colocar el peine, éste no debe topar con la porción del gel separador).

5.9.3 Técnica de cuantificación de proteína por el método de Lowry

Se debe preparar una solución “stock” de una proteína conocida (por lo general se utiliza albumina sérica bovina) para realizar una curva de calibración y poder interpolar los resultados de la muestra problema. El stock de albumina se prepara con agua destilada a una concentración de 1 mg/ml y la curva de calibración se realiza en placas de 95 pozos con fondo cóncavo.

Curva de proteína

[Albumina]	Agua	Reactivo A	Reactivo B
Blanco	20 μ l	10 μ l	80 μ l
2 μ l	18 μ l	10 μ l	80 μ l
4 μ l	16 μ l	10 μ l	80 μ l
6 μ l	14 μ l	10 μ l	80 μ l
8 μ l	12 μ l	10 μ l	80 μ l
10 μ l	10 μ l	10 μ l	80 μ l

Una vez realizada la curva se coloca una cantidad determinada de muestra (1 – 10 μ l) y se lleva a un volumen total de 20 μ l con agua, después se le adiciona, 10 μ l del reactivo A y posteriormente se adicionan 80 μ l del reactivo B. La mezcla se incuba por 15 min a temperatura ambiente y finalizado este tiempo se lee a una absorbancia de 750 nm. En caso de que la lectura de la muestra de un valor superior a los obtenidos en la curva estándar, será necesario preparar diluciones de la muestra y repetir el ensayo.

Capítulo VI

6. Resultados

6.1 Evaluación de la diferencia en la capacidad eritrofagocítica entre *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* por microscopía de luz

6.1.1 Cuantificación de eritrocitos ingeridos por *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*

Una vez que se realizó la tinción de Novikoff, a las tres diferentes muestras (5, 10 y 15 min) que previamente estaban en suspensión se les tomó una alícuota de 10 μ l para llevarlo a un portaobjetos y contabilizar tanto a las amibas como a los eritrocitos internalizados. Todos los experimentos se realizaron bajo las mismas condiciones.

Se contabilizaron 100 amibas elegidas al azar, así como los eritrocitos que cada una de ellas fagocitó a los 3 diferentes tiempos, dando como resultado un amplio grupo de valores. Este método de estudio entre las 2 cepas a los 3 diferentes tiempos se realizó por triplicado generando 1,800 eventos, lo que brindó suficiente material estadístico para obtener un rango de error reducido al realizar los cálculos.

6.1.2 Evaluación estadística descriptiva de eritrocitos fagocitados por *Entamoeba histolytica*

Las medidas descriptivas que se obtuvieron para cada tiempo de la cepa de *Entamoeba histolytica* en el número de eventos que se presentaron (300) fueron los siguientes: media, desviación estándar, coeficiente de

variación, mínimo, cuartil 1, mediana, cuartil 3 y máximo. En donde cada valor se muestra en la siguiente tabla.

<i>Entamoeba histolytica</i>	N	Media	S	C.V.	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
5 min	300	3.077	2.218	72	1	1	3	4	14
10 min	300	4.943	3.315	67	1	3	4	6	20
15 min	300	7.923	4.851	61	1	5	7	10	31

6.1.3 Evaluación estadística descriptiva de eritrocitos fagocitados por *Entamoeba dispar*

Las medidas descriptivas que se obtuvieron para cada tiempo de la cepa de *Entamoeba dispar* en el número de eventos que se presentaron (300) fueron los siguientes: media, desviación estándar, coeficiente de variación, mínimo, cuartil 1, mediana, cuartil 3 y máximo. En donde cada valor se muestra en la siguiente tabla.

<i>Entamoeba dispar</i>	N	Media	S	C.V.	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
5 min	300	1.476	0.923	62	1	1	1	2	7
10 min	300	2.54	2.19	86	1	1	2	3	16
15 min	300	4.64	3.42	73	1	2	4	6	24

6.1.4 Evaluación estadística inferencial entre *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en eritrocitos fagocitados

Utilizando los datos anteriores transformados se procedió a realizar un análisis de varianza factorial (ANOVA) entre las diferentes variables (cepa,

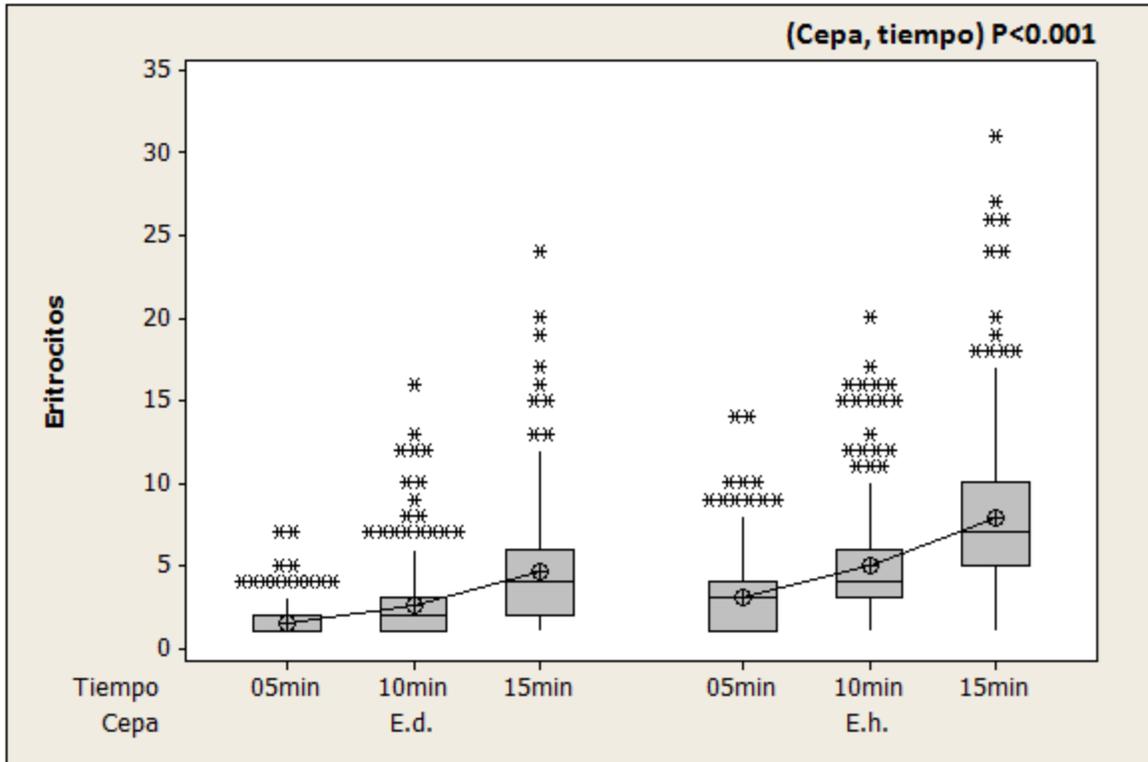
tiempo y cepa-tiempo) para asegurar que las diferencias en los comportamientos entre *E. histolytica* y *E. dispar* durante la eritrofagocitosis (eritrocitos ingeridos) fueran significativos.

Los resultados obtenidos respecto a la variable “cepa”, en la capacidad para fagocitar eritrocitos, demuestra que existe una diferencia significativa ($F=438.36$, $P<0.01$).

Los resultados obtenidos con la variable “tiempo” requerido para fagocitar eritrocitos demuestran también una diferencia significativa ($F=356.82$, $P<0.01$).

Los resultados obtenidos con las variables “cepa-tiempo” durante la fagocitosis de eritrocitos, demuestran que no existe una diferencia significativa ($F=2.59$, $P>0.05$). Esto sugiere que la tendencia de los valores a cruzarse durante estos tiempos es prácticamente nula.

Después de que se comprobó con la prueba de ANOVA que entre ambas cepas existe una diferencia significativa en ingerir eritrocitos, se aplicó la prueba de Tukey donde esta prueba sirvió para comparar cada valor de variable con cada una de las demás variables tanto de cepas como de tiempo. El resultado obtenido demuestra que sólo entre *Entamoeba histolytica* a los 10 min y *Entamoeba dispar* a los 15 min no existe una diferencia significativa ($P>0.05$); en todas las demás combinaciones el valor de “P” fue menor a 0.01($P<0.01$), corroborando que si existen diferencias significativas entre todas las demás combinaciones posibles. Los resultados anteriormente mencionados se esquematizan en la gráfica 1.



Gráfica 1. Evaluación de la diferencia en la capacidad eritrofagocítica entre *E. histolytica* y *E. dispar* por microscopía. La diferencia en la capacidad eritrofagocítica fue altamente significativa tanto por especie como por tiempos de interacción con los eritrocitos. Aunque existen valores aberrantes en la gráfica (asteriscos) estos son despreciables ya que el total de eventos asciende a 300 en cada una de las diferentes condiciones.

6.2 Evaluación en la diferencia de la capacidad eritrofagocítica entre *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* por espectrofotometría

6.2.1 Cuantificación de hemoglobina en interacciones amiba-eritrocito en *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos a través de la cuantificación directa, se determinó por medio de espectrofotometría, la absorbancia producida por la hemoglobina ingerida por 0.5×10^6 trofozoítos en cada una de las especies a los mismos tiempos descritos previamente; así, fue posible obtener con mayor precisión información adicional sobre el proceso de la

eritrofagocitosis. Todos los experimentos se realizaron bajo las mismas condiciones y por triplicado.

6.2.2 Evaluación estadística descriptiva de hemoglobina ingerida por *Entamoeba histolytica*

Las medidas descriptivas que se obtuvieron para cada tiempo de la cepa de *Entamoeba histolytica* en el número de eventos que se presentaron (3) fueron los siguientes: media, desviación estándar, coeficiente de variación, mínimo, cuartil 1, mediana, cuartil 3 y máximo. En donde cada valor se muestra en la siguiente tabla.

<i>Entamoeba histolytica</i>	N	Media	S	C.V.	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
5 min	3	0.4260	0.0533	12	0.3663	0.3663	0.4432	0.4686	0.4686
10 min	3	0.4699	0.0876	18	0.3944	0.3944	0.4493	0.5660	0.5660
15 min	3	0.5638	0.1220	21	0.4349	0.4349	0.6191	0.6374	0.6374

6.2.3 Evaluación estadística descriptiva de hemoglobina ingerida por *Entamoeba dispar*

Las medidas descriptivas que se obtuvieron para cada tiempo de la cepa de *Entamoeba dispar* en el número de eventos que se presentaron (3) fueron los siguientes: media, desviación estándar, coeficiente de variación, mínimo, cuartil 1, mediana, cuartil 3 y máximo. En donde cada valor se muestra en la siguiente tabla.

<i>Entamoeba dispar</i>	N	Media	S	C.V.	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
5 min	3	0.3157	0.0308	9.7	0.2945	0.2945	0.3016	0.3511	0.3511
10 min	3	0.3522	0.0321	9	0.3189	0.3189	0.3547	0.3829	0.3829
15 min	3	0.3969	0.0536	13	0.3496	0.3496	0.3860	0.4552	0.4552

6.2.4 Evaluación estadística inferencial entre *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en hemoglobina ingerida

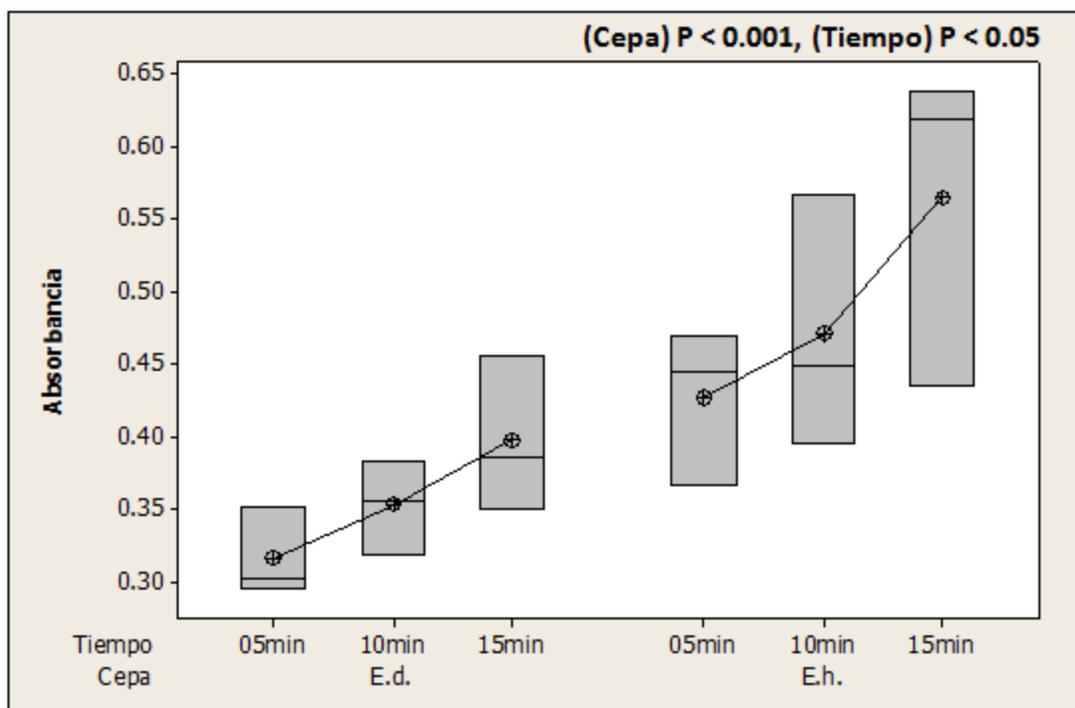
Utilizando los datos anteriores transformados se procedió a hacer un análisis de varianza factorial (ANOVA) entre las diferentes variables (cepa, tiempo y cepa-tiempo) para asegurar que las diferencias en el comportamiento entre *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* durante la eritrofagocitosis indirecta (hemoglobina ingerida) fueran significativas.

Los resultados obtenidos respecto a la variable “cepa” en absorbancias de hemoglobina, demuestran que si existe una diferencia significativa ($F=21.49$, $P<0.01$).

Los resultados obtenidos respecto a la variable “tiempo” para fagocitar eritrocitos demuestra que si existe una diferencia significativa ($F=4.62$, $P<0.05$).

Los resultados obtenidos con las variables “cepa-tiempo” durante la fagocitosis de eritrocitos demuestran que no existe una diferencia significativa ($F=0.06$, $P>0.05$). Esto indica que la tendencia de los valores a cruzarse durante los tiempos estudiados es nula.

Después de que se comprobó con la prueba de ANOVA que entre ambas cepas existe una diferencia significativa en hemoglobina ingerida, se aplicó la prueba de Tukey para comparar cada valor de variable con cada una de las demás variables tanto de cepas como de tiempo. Los resultados obtenidos demuestran que los valores entre *Entamoeba dispar* a los 5 min con *Entamoeba histolytica* a los 10 min y a los 15 min existe una diferencia significativa ($P<0.05$; $P<0.01$); así también como para *Entamoeba dispar* a los 10 min con *Entamoeba histolytica* a los 15 min ($P<0.05$). En todas las demás combinaciones el valor de “P” fue mayor a 0.05 ($P>0.05$), corroborando que no existen diferencias significativas entre todas las demás combinaciones posibles. Los resultados anteriormente mencionados se esquematizan en la gráfica 2.



Gráfica 2. Evaluación de la diferencia en la capacidad eritrofagocítica entre *E. histolytica* y *E. dispar* por espectrofotometría. Esta prueba confirma que existe una diferencia significativa en el evento de la cantidad de hemoglobina ingerida por las amibas; la variante tiempo también mostro una diferencia significativa, obteniendo un valor de $P < 0.05$.

6.3 Evaluación de la diferencia en la capacidad de óxido-reducción entre *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* utilizando la técnica de azul de tetrazolio (NBT)

6.3.1 Cuantificación del estallido respiratorio en interacciones amiba-levadura en *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*

Se determinó por medio de la técnica de NBT la capacidad de óxido-reducción de cada una de las cepas a tiempos de 30 min, 1 y 2 h para examinar al microscopio la presencia o ausencia de azul de formazán en las levaduras de *Candida albicans* en el interior de las amibas.

Se contabilizaron 100 amibas al azar y a su vez los cambios de color que habían ocurrido dentro de las células independientemente de las levaduras que hubieran fagocitado, tomando como valor positivo al menos 1

sola levadura reducida y como valor negativo células que no hubieran fagocitado o no mostraran un cambio de color en su citoplasma.

Este método de estudio entre las 2 cepas a los 3 diferentes tiempos se realizó por triplicado generando 1,800 eventos con sólo 2 posibles variantes (positivas y negativas) por lo cual se hizo un recuento únicamente de células positivas y negativas de cada uno de los tiempos y se tomó el valor de las amibas que habían reducido, por lo que se generaron sólo 3 resultados por tiempo; con esta información se procedió a generar lo siguientes datos.

6.3.2 Evaluación estadística descriptiva de óxido-reducción por *Entamoeba histolytica*

Las medidas descriptivas que se obtuvieron para cada tiempo de la cepa de *Entamoeba histolytica* en el número de eventos que se presentaron (3) fueron las siguientes: media, desviación estándar, coeficiente de variación, mínimo, cuartil 1, mediana, cuartil 3 y máximo. En donde cada valor se muestra en la siguiente tabla.

<i>Entamoeba histolytica</i>	N	Media	S	C.V.	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
30 min	3	13.333	1.528	11	12	12	13	15	15
1h	3	43	2.65	6	41	41	42	46	46
2h	3	71	8.66	12	61	61	76	76	76

6.3.3 Evaluación estadística descriptiva de óxido-reducción por *Entamoeba dispar*

Las medidas descriptivas que se obtuvieron para cada tiempo de la cepa de *Entamoeba dispar* en el número de eventos que se presentaron (3) fueron las siguientes: media, desviación estándar, coeficiente de variación,

mínimo, cuartil 1, mediana, cuartil 3 y máximo. En donde cada valor se muestra en la siguiente tabla.

<i>Entamoeba dispar</i>	N	Media	S	C.V.	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
30 min	3	7.33	3.21	43	5	5	6	11	11
1 h	3	15.667	0.577	3.6	15	15	16	16	16
2 h	3	22.33	2.08	9	20	20	23	24	24

6.3.4 Evaluación estadística inferencial entre *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* de óxido-reducción

Utilizando los datos anteriores transformados se procedió a realizar un análisis de varianza factorial (ANOVA) entre las diferentes variables (cepa, tiempo y cepa-tiempo) para asegurar que las diferencias en los distintos comportamientos, durante la capacidad de óxido-reducción entre *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*, fueran significativas.

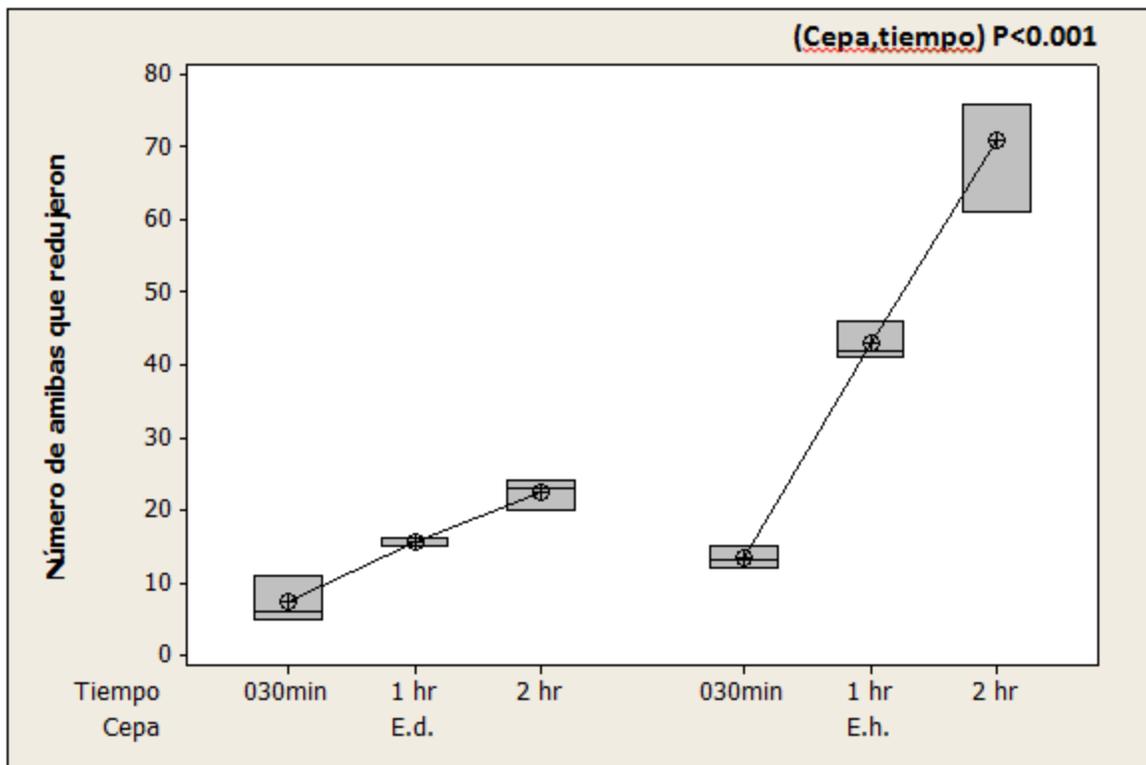
Los resultados obtenidos con la variable “cepa” en ambas que redujeron al azul de formazán, demuestran que si existe una diferencia significativa ($F=111.47$, $P<0.01$).

Los resultados obtenidos con la variable “tiempo” requerido para fagocitar eritrocitos demuestran que si existe una diferencia significativa ($F=89.7$, $P<0.01$).

Los resultados obtenidos respecto a las variables “cepa-tiempo” durante la fagocitosis de eritrocitos demuestran que no existe una diferencia significativa ($F=2.81$, $P>0.05$). Esto indica que la tendencia de los valores a cruzarse durante los tiempos estudiados es nula.

Después de que se comprobó con la prueba de ANOVA que entre ambas cepas existe una diferencia significativa en capacidad reductiva, se aplicó la prueba de Tukey para comparar cada valor de variable con cada una de las

demás variables tanto de cepas como de tiempo. Los resultados obtenidos demuestran que los valores entre *Entamoeba dispar* a 1 h con *Entamoeba dispar* a 2 h y con *Entamoeba histolytica* a los 30 min no tienen una diferencia significativa ($P>0.05$); así también como para *Entamoeba histolytica* a 1 h con *Entamoeba histolytica* a las 2 h ($P>0.05$). En todas las demás combinaciones el valor de “P” fue menor a 0.01 ($P<0.01$), corroborando que si existen diferencias significativas entre todas las demás combinaciones posibles. Los resultados anteriormente mencionados se esquematizan en la gráfica 3.



Gráfica 3. Evaluación de la diferencia en la capacidad de óxido-reducción entre *E. histolytica* y *E. dispar* utilizando la técnica de azul de tetrazolio (NBT). Tanto entre especies de amibas como entre tiempos de interacción, se apreció que *E. histolytica* tiene mayor capacidad para producir especies reactivas que reduzcan el azul de tetrazolio a formazán, indicando que *E. dispar* no es tan eficiente como *E. histolytica* en realizar el estallido respiratorio.

6.4 Monitoreo de estructuración de actina utilizando un sustrato inerte (vidrio) y uno biológico (fibronectina) por la técnica de inmunofluorescencia

La polimerización de actina es un proceso altamente dinámico en el cual la actina globular, con ayuda de proteínas de unión a actina, da lugar a la formación de diversas estructuras. Este proceso se incrementa como resultado de la adhesión de las células a un sustrato, sea éste inerte o biológico. Dicha estructuración en *E. histolytica* inicia a tiempos tempranos de interacción con el sustrato, tanto en vidrio como en fibronectina; sin embargo, *E. dispar* presenta un proceso de polimerización más lento y limitado.

6.4.1 Comparación de la cinética de estructuración de actina entre *E. histolytica* y *E. dispar* adheridas a vidrio y a fibronectina

Las micrografías capturadas por microscopía confocal muestran que a los 15 min, la estructuración de actina en ambas amibas es cortical y distribuida a lo largo de todo el volumen citoplasmático cuando se encuentran adheridas a vidrio, sin embargo, a tiempos más largos *E. histolytica* muestra patrones bien definidos de nuevas estructuras mientras que *E. dispar* sigue mostrando una estructuración cortical y distribuida en el citoplasma. En condiciones de adhesión al sustrato fibronectina, se empezó a observar un cambio dramático desde los 15 min en *E. histolytica* (similar al tiempo de 60 min sobre vidrio) y a los 60 min la mayoría de las amibas observadas en todos los campos mostraron estructuras bien definidas; sin embargo, en el caso de *E. dispar*, tanto al mínimo como al máximo tiempo, no se observaron cambios significativos en la distribución de actina (figura 1).

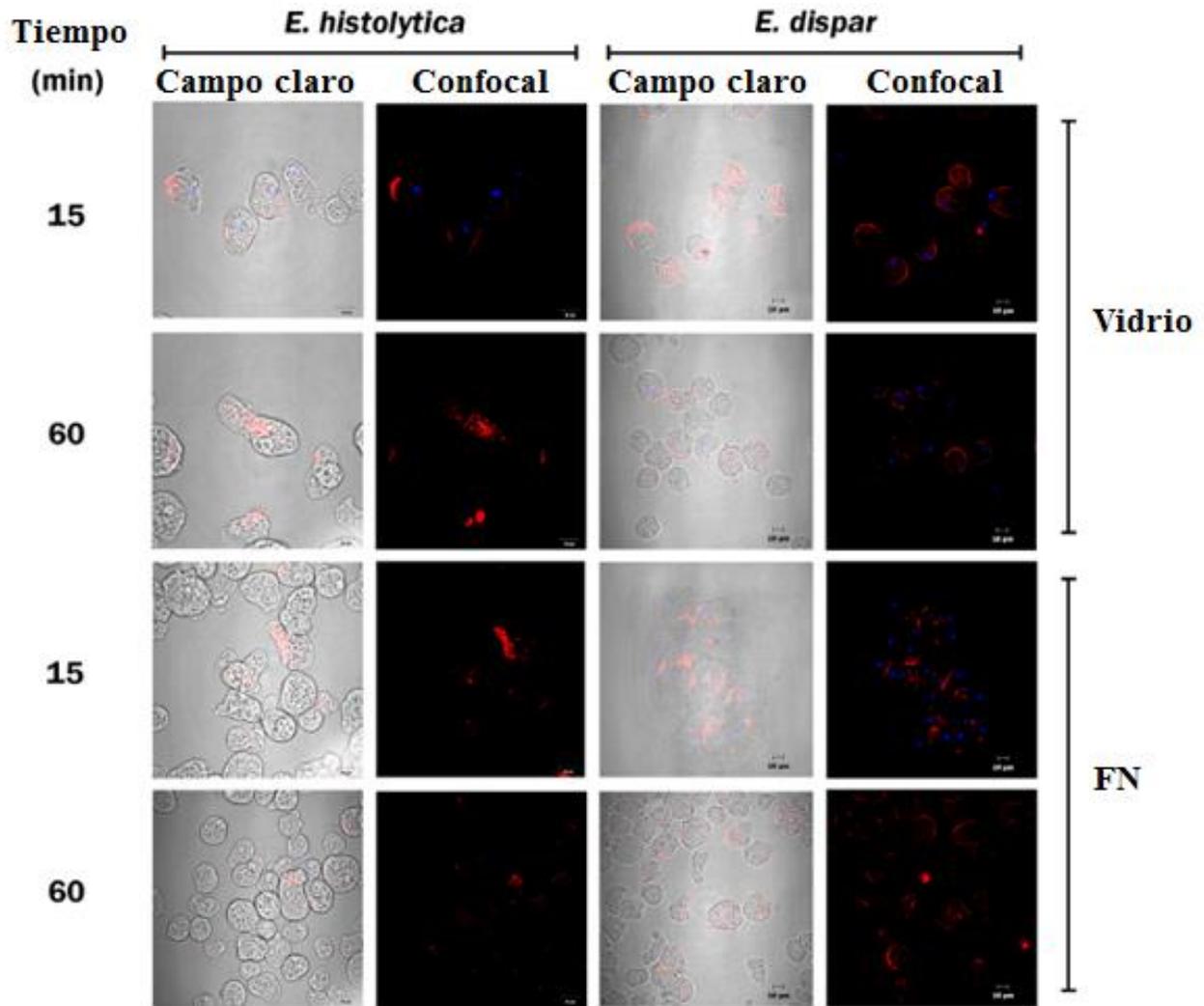


Figura 1. Cinética de estructuración de actina a tiempos cortos y largos entre *E. histolytica* y *E. dispar* en un sustrato inerte (vidrio) y otro biológico (FN).

6.4.2 Comparación de la cinética de adhesión a fibronectina entre *E. histolytica* y *E. dispar*.

La estructuración de actina en *E. histolytica* se induce en áreas extremadamente cercanas al sitio de contacto con el sustrato, mostrando puntos de nucleación, fibras de estrés y “bocas fagocíticas”; en comparación, *E. dispar*, incluso a tiempos más largos mostró una estructuración limitada del citoesqueleto de actina. La marca fluorescente en *E. dispar* se percibió como cúmulos amorfos distribuidos en todo el volumen citoplasmático sin

mostrar un patrón definido de localización específica; por otro lado para *E. histolytica*, se apreció la marca fluorescente solamente en el sitio de contacto con el sustrato. Análisis en Z-stack, cortes en ortho y la cuantificación de la intensidad de fluorescencia en cada corte (gráfica 4 (izquierda) y 5 (derecha)), permitió delimitar los sitios específicos dónde estaba ocurriendo la re-estructuración de actina filamentosa en ambas especies (figura 2).

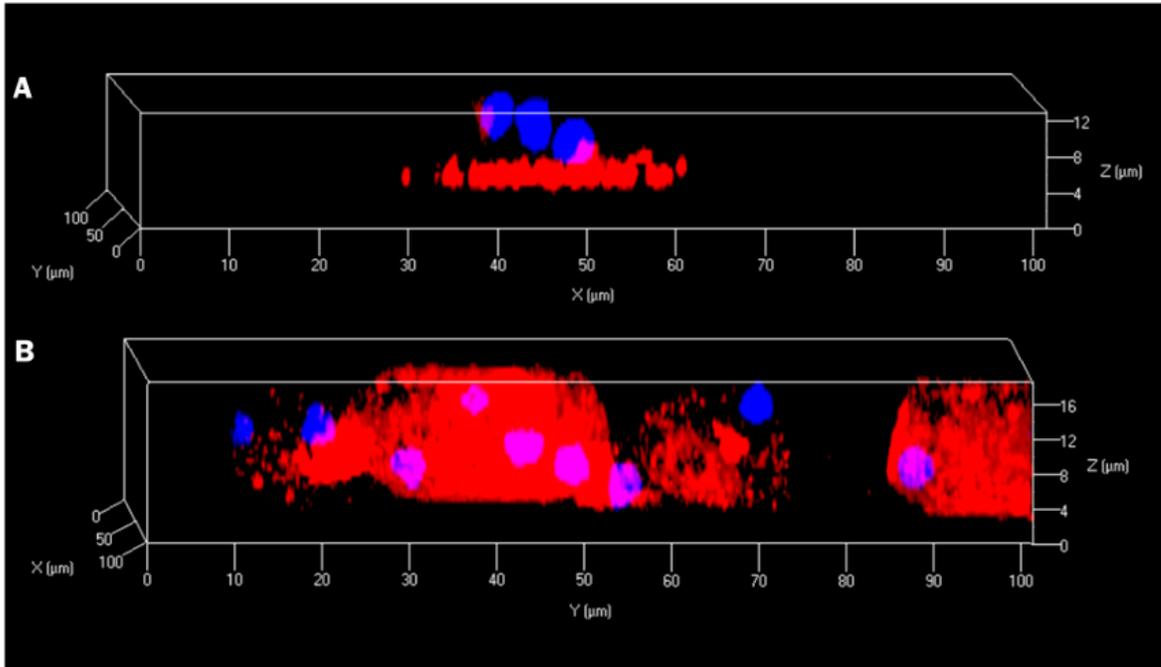
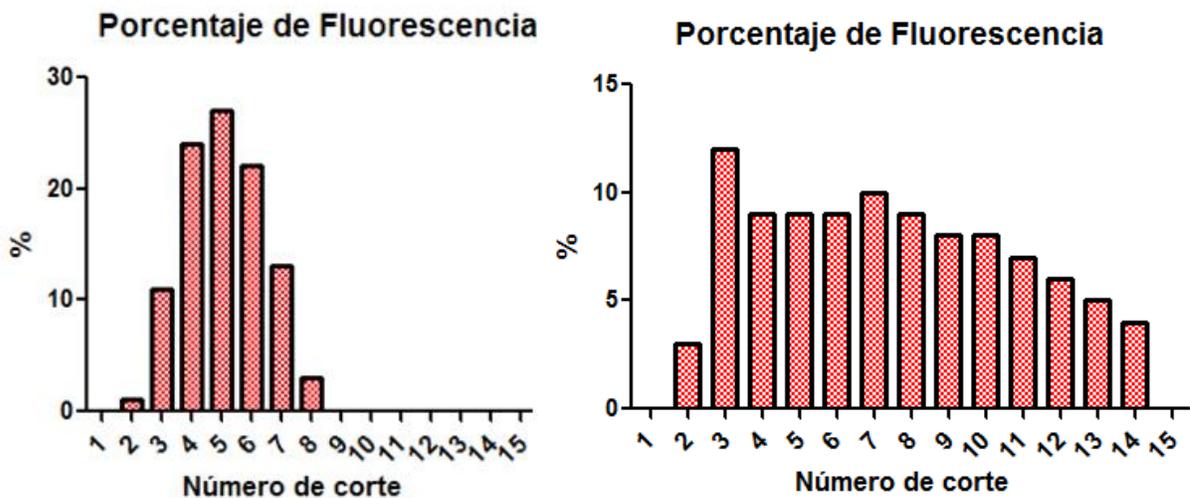


Figura 2. Comparación de adhesión fibronectina entre *E. histolytica* (A) y *E. dispar* (B). Núcleos teñidos con Dapi



Gráficas 4 y 5. Medida de la intensidad de fluorescencia (en porcentaje) en los cortes obtenidos en el análisis "Z stack" para *E. histolytica* (gráfica 4) y *E. dispar* (gráfica 5).

6.5 Biología molecular

6.5.1 Comparación del perfil de proteínas entre *E. histolytica* y *E. dispar* en fracciones solubles e insolubles bajo condiciones de adhesión a vidrio y fibronectina

Una característica importante de la actina polimerizada, es que ésta se vuelve insoluble cuando se prepara un lisado celular aún en presencia de detergente. Esta característica permite entonces lograr una separación entre la actina polimerizada (fracción insoluble al detergente) y la actina globular (fracción soluble al detergente). A su vez, esta separación permite valorar el nivel de polimerización del citoesqueleto de actina al cuantificar la actina asociada a cada una de estas fracciones. Los perfiles de proteínas entre ambas cepas a tiempo de 1 hora de adhesión mostraron diferencias respecto una con la otra tanto en la fracción soluble como en la fracción insoluble; desde la aparición de bandas que no correlacionan con otra, disminución o aumento de intensidad en las bandas respecto al sustrato que se utilizó así como la característica de que si bien se cargó la misma concentración de proteína en cada condición, *E. dispar* mostró un patrón más intenso en cualquiera de las condiciones en las que se corrió el gel. Los resultados se muestran en la figura 3.

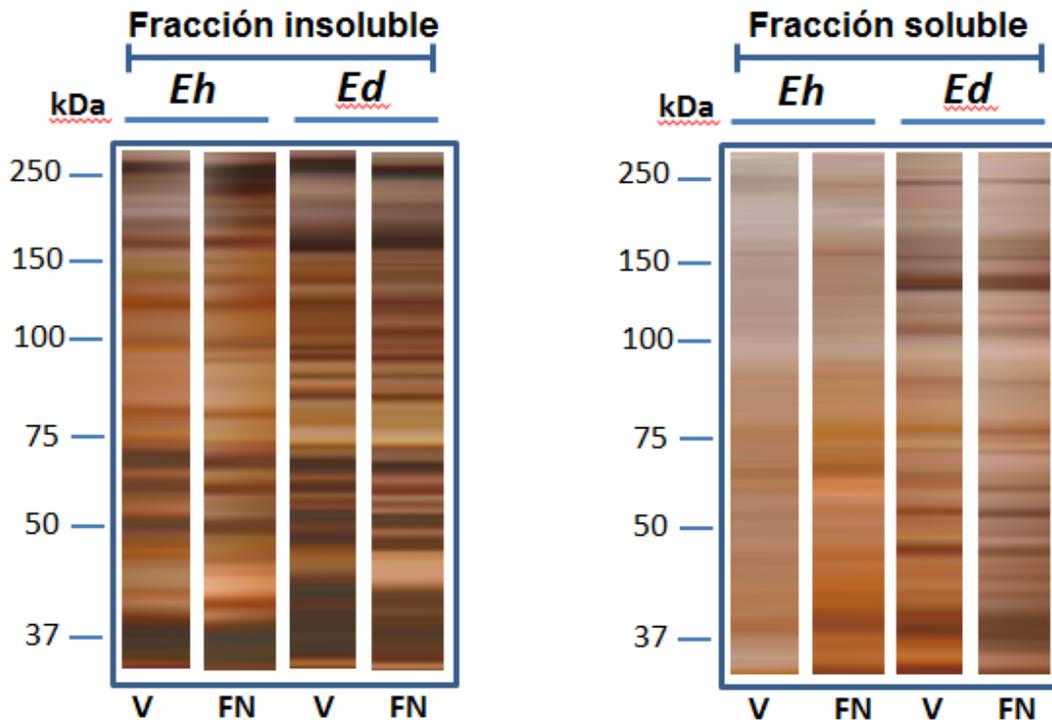


Figura 3. Perfil de proteínas de las fracciones insolubles y fracciones solubles entre *E. histolytica* y *E. dispar* a 1 h adheridas a vidrio y a fibronectina teñidas con plata.

6.5.2 Comparación de actina filamentosa (fracción insoluble) y actina globular (fracción soluble) en *E. histolytica* y *E. dispar* bajo condiciones de adhesión a vidrio y fibronectina por Western blot

Para determinar el porcentaje de distribución de la actina entre las fracciones polimerizada y no polimerizada, fue necesario determinar la cantidad de actina total para cada especie (100%), la cual resultó de la suma de los valores densitométricos obtenidos en cada fracción (fracción soluble más fracción insoluble); esto de manera independiente de la cantidad de actina total presente en cada una de estas especies. Los análisis realizados por Western blot revelaron que la cantidad de actina total (fracción soluble más fracción insoluble) es mayor en *E. dispar* que en *E. histolytica*.

Aunque se observó que la cantidad de actina polimerizada y globular en *E. histolytica* es menor con respecto a *E. dispar*, en porcentajes, la actina polimerizada de *E. histolytica* en relación a la no polimerizada es mayor que en *E. dispar*.

Cepa/Condición	% Actina Polimerizada	% Actina Globular
<i>E.h.</i> Vidrio	70	30
<i>E.h.</i> Fibronectina	63	37
<i>E.d.</i> Vidrio	52	48
<i>E.d.</i> Fibronectina	56	44

Entre los porcentajes de cada condición adherente (vidrio o fibronectina) no se encontraron diferencias significativas entre cada una de las especies por separado. Los resultados se esquematizan en la figura 4 y los porcentajes de actina polimerizada y globular analizados por densitometría se graficaron y se muestran en la gráfica 6.

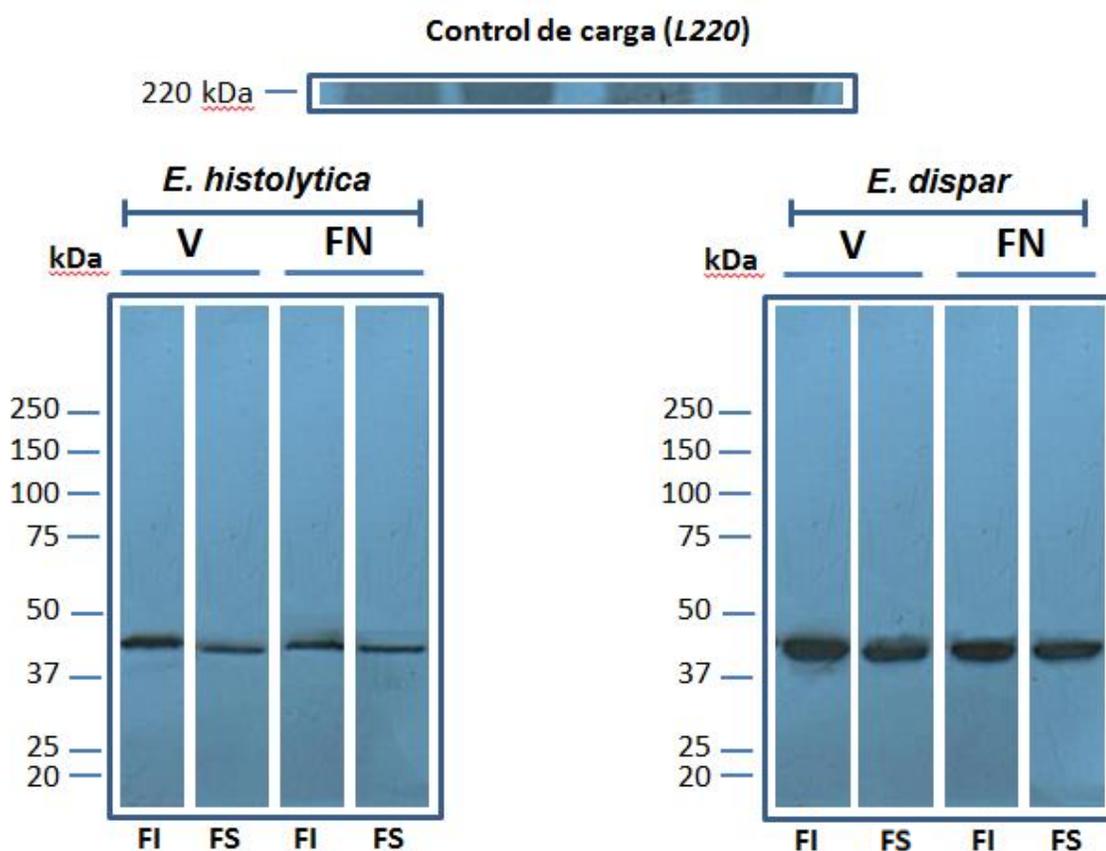
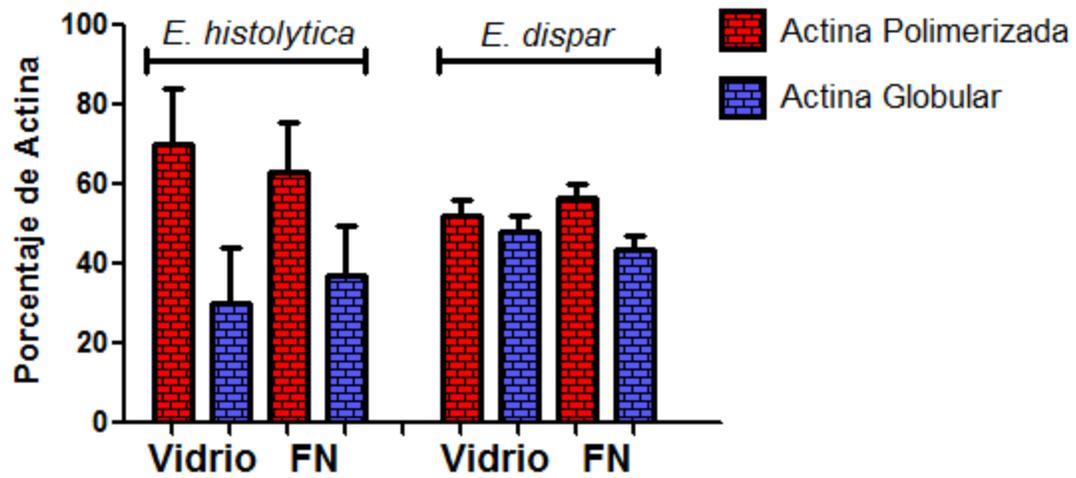


Figura 4. Análisis de Western blot para comparar la cantidad de actina polimerizada (FI) y actina globular (FS) en la condición de vidrio (V) y fibronectina (FN) entre las cepas *E. histolytica* y *E. dispar*. Las fracciones se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% y se transfirieron a membranas de nictrocelulosa; éstas se incubaron con un anticuerpo primario anti-actina (dil 1:5000) y otro anti-lectina de 220kDa para el control de carga (dil 1:2000); y se revelaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado a Peroxidasa (dil 1:1000). El revelado se hizo por el método de quimioluminiscencia.



Gráfica 6. Porcentaje de actina polimerizada (rojo) y actina globular (azul) en cada especie, adheridas a vidrio y a fibronectina. Los porcentajes de distribución de la actina se calcularon con base en los valores densitométricos de la detección de actina por ensayos de Western blot.

7. Discusión

La infección amibiana causada por *E. histolytica* es un problema de salud pública. No todas las cepas de este parásito tienen el mismo grado de virulencia y el entendimiento de los mecanismos y las causas de la virulencia es un objetivo importante en la investigación del género *Entamoeba*. La evidencia inequívoca de la existencia de *E. dispar*, una amiba estrechamente relacionada con *E. histolytica*, pero no invasiva, abre el camino para estudiar las diferencias y similitudes que ambas comparten debido a que estas 2 especies de amibas pueden colonizar el intestino humano. En las últimas décadas se han realizado estudios comparativos tratando de explicar las diferencias entre estas especies (Espinosa y col., 1998; Pimenta y col., 2002; Mitra y col., 2005; Boettner y col., 2005, Chávez-Munguía y col., 2012) para dilucidar los factores que determinen la virulencia de *E. histolytica* y la deficiente virulencia de *E. dispar*.

A pesar de que estos resultados han generado mucha información, siguen ignorándose algunas características de *E. dispar* que han sido ampliamente estudiadas, desde hace más de 40 años en *E. histolytica*, como la fagocitosis (Chávez y col., 1972), la intervención de especies reactivas de oxígeno (Aust-Kettis y col., 1982; Kumar y col., 1992) y la capacidad de re-estructuración del citoesqueleto de actina (Meza y col., 2006).

7.1 Eritrofagocitosis

Durante el desarrollo del presente proyecto se consideró la importancia de hacer un estudio morfológico del evento de la eritrofagocitosis, similar al realizado por Trissl y col., (1978) utilizando 2 diferentes cepas de *Entamoeba*. Sin embargo, este evento es un proceso altamente asincrónico con muchas variaciones que generan desviaciones

estándar muy altas haciendo que los valores no evidencien diferencias significativas; es por eso que el análisis estadístico en el presente estudio se realizó con diagramas de caja y bigote, pudiendo recolectar información individual de cada amiba y no tratarlas como una población conjunta. Los asteriscos mostrados en la gráfica 1 son conocidos como valores aberrantes. Los valores que no entran en ninguno de los porcentajes de los cuartiles, dan la pauta para postular acontecimientos difíciles de apreciar por otras técnicas. Estos acontecimientos en amibas que pudieron fagocitar más de 20 eritrocitos son valores atípicos que pueden deberse a diversas explicaciones como por ejemplo a) que existan amibas altamente dinámicas que empiecen a fagocitar primero que las demás, b) que al momento de adicionar la suspensión eritrocitaria, los eritrocitos que empiezan a bajar por gravedad, tengan contacto con amibas que aun estén suspendidas y que no se hayan adherido, es decir, que estas amibas se encuentren en ventaja con respecto a las otras a empezar a adherir o fagocitar eritrocitos o, c) una contabilización inexacta por error humano. Estos son los elementos que se tienen que tomar en cuenta para darle una explicación a estos valores atípicos que no simbolizan un cambio drástico en el número de eventos que se contabilizaron, pero que si dispararían las desviaciones estándar. Para los cálculos por espectrofotometría no se obtuvo este tipo de valores debido a que en este caso se trataban las muestras como poblaciones totales y se ignoraron acontecimientos como los antes mencionados. Aunque esta técnica es más sensible, no nos permite apreciar con exactitud qué es lo que en verdad está sucediendo en una población donde todo ocurre asincrónicamente y es por eso que las diferencias en el tiempo requerido para la fagocitosis entre cada una de las especies, no fueron tan significativas en comparación con las obtenidas de los resultados que se presentan en la gráfica 1. Es importante resaltar que la cepa de *Entamoeba* obtenida de un portador asintomático utilizada por Trissl y col., (1978), probablemente pertenecía a la especie *E. dispar*. Sin embargo, por falta de pruebas bioquímicas que avalaran su identificación, la especie no fue

reconocida. Fue hasta 1997 que un comité de expertos integrado por la “World Health Organization” reconoció a *E. dispar* como una especie de ameba capaz de habitar el intestino humano pero incapaz de causar una enfermedad invasiva. (Este reconocimiento se hizo oficial durante el XIII seminario de amebiasis realizado en la ciudad de México.)

La eritrofagocitosis ha sido clasificada como un factor importante en la virulencia de *E. histolytica* (Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1983; Bhattacharya y col., 2002). No obstante se ha planteado que la eritrofagocitosis es más bien un indicador cualitativo de la patogenicidad y no un indicador cuantitativo del grado de virulencia (Tsutsumi y col., 1992). Respecto a lo anterior, los datos obtenidos en este trabajo respaldan los resultados obtenidos por Sateriale, y col. (2012) a partir de ensayos en los que pudieron separar de un cultivo de *E. histolytica*, sub poblaciones de amebas con alto índice de fagocitosis y amebas que no habían logrado fagocitar. Al realizar ensayos de microarreglos, estos autores encontraron que las amebas altamente fagocíticas mostraron el encendido de al menos 121 genes más con respecto a las amebas no fagocíticas. Esto confirma la existencia de amebas con diferente grado de virulencia incluso en la misma población y de esta manera es posible dar una explicación más asertiva con respecto a los valores aberrantes mostrados en la gráfica 1.

Actualmente, la disponibilidad de las secuencias de los genomas de *E. histolytica* y de *E. dispar* ha permitido realizar análisis completos a escala de divergencia genética y de expresión diferencial de genes. Estos estudios han ayudado a aclarar los mecanismos de virulencia y han permitido la identificación de genes expresados diferencialmente entre parásitos virulentos y no virulentos (Wilson y col., 2012).

7.2 Estallido respiratorio

Respecto al estallido respiratorio, el NBT es utilizado es un ensayo particularmente efectivo para el diagnóstico de enfermedad granulomatosa crónica y de otras enfermedades causadas por desórdenes en el mecanismo del estallido respiratorio de las células fagocíticas (Freeman y col., 1972). En estas enfermedades existe un defecto en la NADPH oxidasa, por el cual las células fagocíticas son incapaces de producir especies reactivas de oxígeno (H_2O_2 , HO_2) o los radicales (HO^\cdot), necesarios para eliminar a los microorganismos fagocitados. Como resultado de lo anterior, los microorganismos continúan vivos dentro del fagocito, lo que causa infecciones recurrentes y la formación de granulomas (Nathan y col., 1969). De antemano se sabe que *E. histolytica* es un parásito altamente fagocítico y al observar en este estudio que *E. dispar* también fagocita aunque en menor proporción, se decidió hacer ensayos fagocíticos en ambas especies utilizando la técnica del NBT y proporcionándoles levaduras patógenas del género *Candida albicans*. Trabajos realizados por Mukhopadhyay y col., en 1996 utilizaron el metabolismo oxidativo de *E. histolytica* como un factor de viabilidad para medir la capacidad de supervivencia de *E. histolytica* cuando era retada con diferentes drogas anti-amébicas y de igual manera posteriormente se hizo otro estudio donde incluyeron a una cepa de *E. dispar* (Bansal y col., 2004). Sin embargo, a la fecha no se cuenta con ningún estudio en el que se haya caracterizado la capacidad de óxido-reducción de estas 2 amibas como posible factor de virulencia. Por lo que los resultados presentados en este trabajo son consistentes en el hecho de que *E. dispar*, al ser considerada una especie no invasiva, mostrara un menor rango en la producción de especies reactivas de oxígeno con respecto a *E. histolytica*. Además, es importante resaltar que en estudios recientes se ha sugerido que la generación de especies reactivas de oxígeno, así como la presencia de la NADPH oxidasa, son elementos necesarios para la formación de estructuras especializadas llamadas invadosomas (módulos adhesivos mecano-

sensoriales compuestos de un núcleo denso de actina filamentosa rodeado por un anillo de moléculas de adhesión capaces de infiltrarse en tejido en condiciones fisiológicas y patológicas) en células transformadas o cancerígenas que permiten una invasión más eficiente (Díaz y col., 2009; Gianni y col., 2010).

7.3 Re-arreglo del citoesqueleto de actina

Se sabe que el contacto especializado con componentes de la matriz extracelular como fibronectina, vitronectina, laminina, etc., proveen a las células señales químicas y mecánicas que les permiten tener un comportamiento direccionado. Estas señales le permiten censar vía integrinas las propiedades de la matriz extracelular, como rigidez, dimensión, la naturaleza del ligando así como la inducción de la reestructuración del citoesqueleto de actina (Destaing y col., 2011).

Los trofozoítos de *E. histolytica* interactúan con los componentes de la matriz extracelular para invadir y destruir el tejido. La interacción se lleva a cabo por la unión de una molécula membranal tipo integrina $\beta 1$ de 140 kDa que se une a la fibronectina (Talamás-Rohana y col., 1998). Esta molécula tipo integrina corresponde a la cadena intermedia de la molécula Gal-GalNAc y no se encuentra en amibas de la especie *dispar* e *invadens* (Sengupta y col., 2009). Tal vez sea esta la razón por la cual la actina polimerizada en *E. dispar* se encuentre distribuida a través de todo el citoplasma y no localizada hacia el sustrato como en *E. histolytica*. Cualquier cambio en la unión con una integrina puede apagar la modulación de señales intracelulares (del Pozo y col., 2005).

Para que ocurra la polimerización de actina en la fagocitosis se sabe que necesitan ocurrir una serie de cascadas de señalización en las que intervienen tirosin cinasas, proteínas adaptadoras, enzimas lipídicas, factores nucleotídicos intercambiadores de guanina, GTPasas, factores promotores de nucleación y complejos de nucleación de actina (Flannagan y col., 2012). El trabajo de López-Contreras y col. (2013) mostró que al utilizar inhibidores

contra la protein cinasa Src, se veía afectado el re-arreglo del citoesqueleto de actina. Haciendo una integración de los resultados previos, la familia de las cinasas Src pueden estar reguladas por la oxidación de residuos de cisteína ocasionado por especies reactivas de oxígeno, tales como el peróxido de hidrógeno (Giannoni y col., 2005; Kemble y Sun, 2009; Yoo y col., 2011).

Capítulo VIII

8. Resumen de Resultados

Los resultados indican que:

- *E. dispar* fagocita eritrocitos con menor eficiencia que *E. histolytica*.
- *E. dispar* tiene una menor producción de especies reactivas de oxígeno comparado con *E. histolytica*.
- *E. dispar* muestra un re-arreglo del citoesqueleto de actina menos elaborado que el de *E. histolytica*.

Capítulo IX

9. Conclusión del Trabajo

Todas estas diferencias de *E. dispar*, pudieran deberse a que las cascadas de señalización en esta especie, no se llevan a cabo de manera tan eficiente como en *E. histolytica*, debido a ausencias o diferencias conformacionales en receptores, o bien a diferencias en la transducción de señales por falta de componentes celulares, lo que podría explicar su comportamiento no invasivo.

10. Perspectivas del trabajo

- Determinar sí la capacidad fagocítica correlaciona con el tamaño celular.
- Estudiar el re-arreglo de actina en condiciones fagocíticas.
- Analizar el tipo de polimerización de actina.
 - Caracterizar el tipo de filamentos.
- Buscar en *E. dispar* genes homólogos a *E. histolytica* en función con el citoesqueleto y proteínas de unión a actina.

11. Referencias

Anderson D, Schmalsteig F, Finegold M, Hughes B, Rothlein R, Miller L. The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J. Infect. Dis.* 152, 668-689, 1985.

Anderson KV. Toll signalling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 13-19 2000.

Archibald JM, Teh EM, Keeling PJ. Novel ubiquitin fusion proteins: Ribosomal protein P1 and actin. *J. Mol. Biol.* 328, 771-778, 2003.

Arhets P, Olivo JC, Gounon P, Sansonetti P, Guillen N. Virulence and functions of myosin II are inhibited by overexpression of light meromyosin in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biol. Cell.* 6, 1537-1547, 1998.

Asbury CL. Kinesin: world 's tiniest biped. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 17, 89-97, 2005.

Aust-Kettis A, Jarstrand C, Urban T. The nitroblue tetrazolium (NBT) reduction of *Entamoeba histolytica* during endocytosis of *E. coli* and homologous antibodies. *Arch. Invest. Med. (Mex)*. Suppl 3:261-264, 1982.

Bahener R, Nathan D. Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *New. Engl. J Med.* 278, 971-976, 1968.

Bainton D. Neutrophilic granules. *British J. Haematol.* 29, 17-22, 1975.

Bainton DF, Ullot JL, Farquhar MG. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J. Exp. Med.* 134, 907-939, 1971.

Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Mahajan RC, Malla N. In vitro activity of antiamebic drugs against clinical isolates of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 21, 3-27, 2004.

Bhattacharya S, Bhattacharya A, Petri WA Jr. Examining *Entamoeba*. *Trends. Parasitol.* 18 (5), 196-197, 2002.

Boettner D, Huston C, Sullivan J, Petri W Jr. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* utilize externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of erythrocytes. *Infect. Immun.* 73 (6) 3422-3430, 2005.

Chávez-Munguía B, Talamás-Rohana P, Castañón G, Salazar-Villatoro L, Hernández-Ramírez V, Martínez-Palomo A. Differences in cap formation between invasive *Entamoeba histolytica* and non-invasive *Entamoeba dispar*. *Parasitol. Res.* 111(1) 215-221, 2012.

Chávez A, Iturbe-Alessio I, Segura M, Corona D. Phagocytosis of human erythrocytes by *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex).* 2 Suppl 2: 275-286, 1972.

Chávez A, Segura M, Díaz J, Sepúlveda J. Erythrophagic activity of *E. histolytica* trophozoites on red blood cells of different animal species. *Arch. Invest. Med. (Mex).* 5 Suppl 2: 365-372, 1974.

Costa AO, Gomes MA, Rocha OA, Silva EF. Pathogenicity of *Entamoeba dispar* under xenic and monoxenic cultivation compared to a virulent *E. histolytica*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 48, 245-250, 2006.

de Chastellier C, Thilo L. Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. *Eur. J. Cell. Biol.* 74, 49-62, 1997.

del Pozo MA, Balasubramanian N, Alderson NB, Kiosses WB, Grande-García A, Anderson RG, Schwartz MA. Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat. Cell. Biol.* 7(9), 901-908, 2005.

Destaing O, Block MR, Planus E, Albiges-Rizo C. Invadosome regulation by adhesion signaling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 23(5), 597-606, 2011.

Dolabella SS, Serrano-Luna J, Navarro-García F, Cerritos R, Ximénez C, Galván-Moroyoqui JM, Silva EF, Tsutsumi V, Shibayama M. Amoebic liver abscess production by *Entamoeba dispar*. *Ann. Hepatol.* 11, 107-117, 2012.

Dutcher SK. The tubulin fraternity: Alpha to eta. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13, 49-54, 2001.

Eichinger L, Pachebat JA, Glockner G, Rajandream MA, Sucgang R, Berriman M, Song J, Olsen R, Szafranski K, Xu Q, Tunggal B,

Kummerfeld S, et al. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*. 435, 43-57, 2005.

Espinosa-Cantellano M, Castañón G, Martínez-Palomo A. In vivo pathogenesis of *Entamoeba dispar*. *Arch. Med. Res.* 28, 204-206, 1997.

Espinosa-Cantellano M, Gonzáles-Robles A, Chávez B, Castañón G, Argüello C, Lázaro-Haller A, Martínez-Palomo A. *Entamoeba dispar*: ultrastructure, surface properties and cytopathic effect. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45, 265-272, 1998.

Flannagan RS, Jaumouillé V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.* 7, 61-98, 2012.

Fonzi WA, Irwin MY. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetic.* 134, 717-728, 1993.

Freeman R, King B. Technique for the performance of the nitro-blue tetrazolium (NBT) test. *J. Clin. Pathol.* 25(10), 912-914, 1972.

Frenette P, Wagner D. Adhesion molecules-Part II: blood vessels and blood cells. *N. Engl. J. Med.* 335, 43-48, 1996.

Gallin J. Leukocyte adherence-related glycoproteins LFA-1, Mo-1, and p150, 95: A new group of monoclonal antibodies, a new disease, and a possible opportunity to understand the molecular basis of leukocyte adherence. *J. Infect. Dis.* 152, 661-664, 1985.

Giannoni E, Buricchi F, Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P. Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 25(15), 6391-6403, 2005.

Gitler C, Calef E, Rosenberg I. Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 307, 79-85, 1984.

Greenberg S. Signal transduction of phagocytosis. *Trends. Cell. Biol.* 5, 93-99, 1995.

Hellum KB. Standardization of the nitroblue tetrazolium test. Influence of pH, dye concentrations and sample storage. *Scand. J. Infect. Dis.* 9, 125-130, 1977.

Higgs HE, Peterson KJ. Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. *Mol. Biol. Cell.* 16, 1-13, 2005.

Janmey P. Mechanical properties of cytoskeletal polymers. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 3, 4 -11, 1991.

Jeoung-Sook S, Zhimin G, Soman N. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science.* 289, 785-788, 2000.

Kemble DJ, Sun G. Direct and specific inactivation of protein tyrosine kinases in the Src and FGFR families by reversible cysteine oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106(13), 5070-5075, 2009.

Kumar S, Tripathi LM, Sagar P. Oxido-reductive functions of *Entamoeba histolytica* in relation to virulence. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86(3), 239-248, 1992.

Kwiatkowska K, Sobota A. The clustered Fcγ receptor II is recruited to Lyn-containing membrane domains and undergoes phosphorylation in a cholesterol-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* 31, 989–98, 2001.

Lazarides E, Weber K. Actin antibody: The specific visualization of actin filaments in non-muscle cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71, 2268-2272, 1974.

Lejeune A, Gicquaud C. Evidence for two mechanisms of human erythrocyte endocytosis by *Entamoeba histolytica*-like amoebae (Laredo strain). *Biol. Cell.* 59(3), 239-45, 1987.

Léung CL, Green KJ, Liem RK. Plakins: A family of versatile cytolinker proteins. *Trends. Cell. Biol.* 12, 37-45, 2002.

Lynch E, Rosenberg I, Gitler C. An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica* *EMBO J.* 1, 801-804, 1984.

Lesh (Lösch) FD. (1875). Massive development of amebas in large intestine. Translated and reprinted in *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 24, 383-392, 1975.

Mallik R, Gross SP. Molecular motors: strategies to get along. *Curr. Biol.* 14, R971-R982, 2004.

Marion S, Laurent C, Guillen N. Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: A proteomic approach. *Cell. Microbiol.* 7, 1504-1518, 2005.

Marion S, Wilhelm C, Voigt H, Bacri JC, Guillen N. Overexpression of myosin IB in living *Entamoeba histolytica* enhances cytoplasm viscosity and reduces phagocytosis. *L. Cell Sci.* 117, 3671-3678, 2004.

Martínez-Palomo A, Gonzales-Robles A, De La Torre M. Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced Con A. *Nat. New. Biol.* 245(145), 186-187. 1973.

Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 343, 338-344, 2000.

Meza I, Talamás-Rohana P, Vargas MA. The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: structure, function, and regulation by signaling pathways. *Arch. Med. Res.* 37(2), 234-243, 2006.

Mitra BN, Yasuda T, Kobayashi S, Saito-Nakano Y, Nozaki T. Differences in morphology of phagosomes and kinetics of acidification and degradation in phagosomes between the pathogenic *Entamoeba histolytica* and the non-pathogenic *Entamoeba dispar*. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 62, 84-99, 2005.

Modlin R, Brightbill H, Godowski P. The Toll of innate immunity on microbial pathogens. *N. Engl. J. Med.* 340, 1834-1835, 1999.

Mora-Galindo J, Anaya-Velazquez F. Intracellular digestion of human erythrocytes by *Entamoeba histolytica*: a kinetic study in vitro. *Arch. Med. Res.* 24(4), 347-51, 1993.

Mukhopadhyay RM, Chaudhuri SK. Rapid in vitro test for determination of anti-amoebic activity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 90(2), 189-191, 1996.

Nathan DG, Baehner RL, Weaver DK. Failure of Nitro Blue Tetrazolium reduction in the phagocytic vacuoles of leukocytes in chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* 48(10), 1895-1904, 1969.

Olmsted J, Borisy G. Microtubules. *Annu. Rev. Biochem.* 42, 507-540, 1973.

Orozco E, Guarneros G, Martinez-Palomo A, Sánchez T. *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *J. Exp. Med.* 158(5), 1511-1521, 1983.

Pacheco-Yépez J, Campos-Rodríguez R, Rojas-Hernández S, Serrano-Luna JJ, Rivera-Aguilar V, Villa-Treviño S, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V, Shibayama M. Differential expression of surface glycoconjugates on *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Parasitol. Int.* 58, 171-177, 2009.

Pimenta PF, Diamond LS, Mirelman D. *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925: differences in their cell surfaces and in the bacteria-containing vacuoles. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49, 209-219, 2002.

Ravdin J, Croft B, Guerrant R. Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 152, 377-390, 1980.

Ravdin J, Guerranr R. Role of adherence in cytopatogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* 68, 1305-1313, 1981.

Ravdin J, Sperelakis N, Guerranr R. Effect of ion channel inhibitors on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Diseases.* 146, 335-340, 1982.

Ravetch J. Fc receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 121-125, 1997.

Rojas-Espinosa O, Arce-Paredes P. Fagocitosis: Mecanismos y consecuencias. *Bioquimia.* 28(4), 19-28, 2003.

Rollet-Labelle E, Marois S, Barbeau K, Malawista SE, Naccache PH. Recruitment of the crosslinked opsonic receptor CD32A (FcγRIIA) to high-density detergent-resistant membrane domains in human neutrophils. *Biochem. J.* 381(Part 3), 919–28, 2004.

Sarndahl E, Lindroth M, Bengtsson T, Farllman M, Gustavsso J, Stendahl O. Association of ligand-receptor complexes with actin filaments in human neutrophils: A possible regulatory role for a G-protein. *J. Cell Biol.* 109, 2791-2799, 1990.

Sateriale A, Vaithilingam A, Donnelly L, Miller P, Huston CD. Feed-Forward regulation of phagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 80(12), 4456-4462, 2012.

Schlegel A, Lisanti M. Caveolae and their coat proteins, the caveolins: from electron microscopy novelty to biological launching pad. *J. Cell Physiol.* 186, 329-337, 2001.

Sbarra AJ, Karnovsky ML. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 234(6) 1355-62, 1959.

Sbarra AJ, Karnovsky ML. The biochemical basis of phagocytosis. 2. Incorporation of C14-labeled building blocks into lipid, protein, and glycogen of leukocytes during phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 235, 2224-2229, 1960.

Sengupta K, Hernández-Ramírez VI, Rosales-Encina JL, Mondragón R, Garibay-Cerdenares OL, Flores-Robles D, Javier-Reyna R, Pertuz S, Talamás-Rohana P. Physical, structural, and functional properties of the beta1 integrin-like fibronectin receptor (beta1EhFNR) in *Entamoeba histolytica*. *Infect. Genet. Evol.* 9(5), 962-970, 2009.

Siddiqui R, Khan NA. *Acanthamoeba* is an evolutionary ancestor of macrophages: A myth or reality? *Exp. Parasitol.* 130(2), 95-97, 2011.

Strugill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix P, Collins P, Fok A. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*. 263, 678-681, 1994.

Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 14(6), 691-699, 2011.

Talamás-Rohana P, Hernández-Ramírez VI, Perez-García JN, Ventura-Juárez J. *Entamoeba histolytica* contains a beta 1 integrin-like molecule similar to fibronectin receptors from eukaryotic cells. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45(3), 356-360, 1998.

Trissl D, Martínez-Palomo A, de la Torre M, de la Hoz R, Pérez de Suárez E. Phagocytosis of human erythrocytes by *Entamoeba histolytica*. Quantitative study. *Arch. Invest. Med. (Mex)*. 9 SUPPL 1: 219-222, 1978.

Trissl D, Martínez-Palomo A, de la Torre M, de la Hoz R, Pérez de Suárez E. Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *J. Exp. Med.* 148(5), 1137-1143, 1978.

Tsutsumi V, Martínez-Palomo A, Tanikawa K. Scanning electron microscopy of erythrophagocytosis by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Arch. Med. Res.* 23(2), 173-175, 1992.

Tsutsumi V, Ramírez-Rosales A, Lanz-Mendoza H, Shibayama M, Chávez B, Rangel-López E, Martínez-Palomo A. *Entamoeba histolytica*: erythrophagocytosis, collagenolysis, and liver abscess production as virulence markers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86(2) 170-172, 1992.

Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis. *Nat. Rev. Immunol.* 12(7), 492-502, 2012.

Unkeless J, Jin J. Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 338-343, 1997.

Vargas M, Sansonetti P, Guillen N. Identification and cellular localization of the actin-binding protein ABP-120 from *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* 22, 849-857, 1996.

Vartiainen MK, Machesky LM. The WASP-Arp2/3 pathway: Genetic insights. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 174-181, 2004.

Vayssié L, Vargas M, Weber C, Guillen N. Double-stranded RNA mediates homology-dependent gene silencing of gamma-tubulin in the human parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138, 21-28, 2004.

Vicente-Manzanares M, Sancho D, Yañez-Mó, M, Sánchez-Madrid M. The leukocyte cytoskeleton in cell migration and immune interactions. *Internat. Rev. Cytol.* 216, 233-289, 2002.

Walenta JH, Didier AJ, Liu X, Kramer H. The Golgi-associated hook3 protein is a member of a novel family of microtubule-binding proteins. *J. Cell Biol.* 152, 923-934, 2001.

Weber K, Groeschel-Stewart U. Antibody to myosin: the specific visualization of myosin-containing filaments in nonmuscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 4561-4564, 1974.

Wilson IW, Weedall GD, Hall N. Host-Parasite interactions in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: what have we learned from their genomes?. *Parasite Immunol.* 34(2-3), 90-99, 2012.

Winder SJ, Ayscough KR. Actin-binding proteins. *J. Cell Sci.* 118, 651-654, 2005.

World Health Organization. Amoebiasis. *Weekly Epidem. Record*, 72:97-98, 1997.

Yoo SK, Starnes TW, Deng Q, Huttenlocher A. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature.* 480(7375), 109-112, 2011.