



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Efecto del esteviósido en *Entamoeba histolytica* y la amibiasis experimental”

Tesis que presenta

IBT. Karla Jocelyn Ortega Carballo

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

en Infectómica y Patogénesis Molecular

Directores de Tesis

Dr. Víctor K. Tsutsumi Fujiyoshi

Dr. Pablo Muriel de la Torre

Ciudad de México

Agosto, 2019

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio 2 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Este proyecto se realizó bajo la dirección del Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (DIPM) y del Dr. Pablo Muriel de la Torre del Departamento de Farmacología de esta institución y la asesoría del Dr. José Luis Rosales Encina y la Dra. Bibiana Chávez Munguía de DIPM.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CVU 767773).

AGRADECIMIENTOS

Gracias a CONACyT por el apoyo económico otorgado, sin el cual no habría sido posible el desarrollo de este proyecto.

En primer lugar, te agradezco a ti Dios, por acompañarme y guiarme a lo largo de este camino, por tomarme en tus brazos, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y desesperanza. Yo te doy gracias Señor por no soltar mi mano y mantenerme a tu lado en todo momento.

Agradezco infinitamente al Dr. Víctor Tsutsumi Fujiyoshi, por todo el apoyo brindado desde la licenciatura, por confiar en mí, por darme la oportunidad de ser parte de su laboratorio y sobre todo porque gracias su entusiasmo, fortaleza, conocimiento y toda su experiencia hoy puedo concluir un sueño más. Gracias por las pláticas amenas, por enseñarme que el querer es poder y por mostrarme que más allá del conocimiento, la experiencia y los grados académicos, los valores personales y la actitud ante la vida son lo que te hace mejor persona. Toda mi gratitud, cariño y admiración para usted.

Agradezco al Dr. Pablo Muriel de la Torre por todo el apoyo brindado, por compartirme sus conocimientos y por su gran colaboración con el material necesario, por su tiempo, comentarios y críticas constructivas para la mejora del proyecto. También agradezco al Dr. José Luis Rosales Encina por su importante apoyo con reactivos y recomendaciones para la mejora del proyecto, así como a la Dra. Bibiana Chávez Munguía, por su apoyo técnico en microscopia electrónica de transmisión y barrido, así como su asesoría.

Agradezco a la M. en C. Karla Montserrat Gil Becerril, por su apoyo técnico en biología molecular, cultivo celular y por sus recomendaciones para la realización de este proyecto; a la Q.F.B Silvia Galindo Gómez, por su apoyo técnico en el manejo de animales de experimentación, cultivo e histología, así como por todos sus consejos para la mejora del proyecto; a la Bióloga Lidia Baylón Pacheco, por su apoyo brindado en la asesoría de técnicas en biología molecular; a la M. en C. Patricia Espíritu Gordillo, por su apoyo técnico en la obtención de proteína., a la Bióloga Anel Edith Lagunes Guillen por su apoyo técnico en el procesamiento de muestras para microscopia electrónica y a la Q.F.B Claudia Márquez Dueñas por su amable colaboración en el uso de equipos de biología molecular y a la Lic. Jessica Márquez Dueñas por su apoyo secretarial.

Finalmente agradezco a MVZ. Benjamín Emmanuel Chávez Álvarez y MVZ. Alberto Rojo García por su valioso apoyo técnico en el manejo, cuidado y practica de cirugías de animales de experimentación.

Gracias a mis queridos amigos Yosehandy, Pau, Nadia, Fabiana y Emilio y compañeros de laboratorio Suilma, Víctor y Kristal por todo su cariño y apoyo, por alentarme a seguir adelante, por su paciencia, amistad y cariño, siempre serán una parte importante en mi vida.

Finalmente, agradezco enormemente a mis padres Sara y Carlos ya que sin ellos yo no hubiera podido cumplir este sueño, gracias por todo el amor, paciencia y comprensión durante toda esta etapa, por impulsarme en todo momento a ser mejor persona, por ser mí principal motivo de inspiración. Gracias por todos sus esfuerzos, sé que fueron muchos y hoy espero poder darles una nueva satisfacción. A mis hermanas Sara e Itzel por todo su apoyo en momentos difíciles y sobre todo por su amor, confianza y paciencia. A mi compañero de vida, Omar; por ser una parte importante y fundamental para mí, por su amor, paciencia, cariño y apoyo durante todo este camino, gracias por creer en mí y por la confianza que depositas en mí día con día.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a cada uno de los integrantes de mi familia, mi tesoro máspreciado y por quienes tengo un amor inmenso. Al hombre más importante en mi vida, mi padre; a quien le tengo un amor y agradecimiento infinito por todo su sacrificio, esfuerzo y desvelos para que yo pudiera cumplir mis sueños, por su apoyo incondicional, por motivarme y darme la mano cuando más lo he necesitado, a ti por siempre mi corazón, agradecimiento y admiración. A mi madre que, sin su inmenso amor, comprensión, cariño y apoyo, yo no hubiese podido seguir adelante, a ti por siempre todo mi amor, agradecimiento y admiración.

Con Amor: Karla

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I.- INTRODUCCIÓN	3
1.1 Amibiasis.....	3
1.1.1 Generalidades.....	3
1.2 Biología de <i>E. histolytica</i>	4
1.2.1 Trofozoíto	4
1.2.2 Prequiste	5
1.2.3 Quiste.....	5
1.2.3 Ciclo de vida.....	6
1.3 Mecanismos de patogenicidad.....	8
1.3.1 Adherencia	8
1.3.2 Citolisis.....	9
1.3.2.1 Proteasas de cisteína.....	9
1.3.2.2 Amebaporos	10
1.3.3 Fagocitosis	11
1.4 Patología de la amibiasis	12
1.4.1 Amibiasis intestinal.....	12
1.4.2 Amibiasis hepática	14
1.5 Diagnostico de la amibiasis.....	15
1.6 Tratamiento de la amibiasis	16
1.7 <i>Stevia rebaudiana</i>	16
1.7.1 Esteviósido.....	17
1.7.1.1 Biosíntesis del esteviósido	19
1.7.1.2 Absorción y metabolismo del esteviósido.	23
II.- ANTECEDENTES	25
III.- JUSTIFICACIÓN	28
IV.- HIPÓTESIS.....	29
V.- OBJETIVOS.....	30
5.1 General	30

5.2 Específicos.....	30
VI.- MATERIAL Y MÉTODOS	31
6.1 Estrategia experimental general.....	31
6.2 Microorganismo.....	32
6.3 Esteviósido.....	32
6.4 Ensayos de viabilidad de trofozoítos.....	32
6.5 Microscopía electrónica de transmisión	33
6.6 Microscopía electrónica de barrido.	33
6.7 Efecto del esteviósido sobre la capacidad de adhesión de <i>E. histolytica</i>	33
6.8 Evaluación del efecto del esteviósido sobre el citoesqueleto de actina por microscopía con focal.	34
6.9 Virulencia de <i>E. histolytica</i>	34
6.9.1 Perfil de proteína y actividad proteolítica.	34
6.9.2 Efecto citopático.....	36
6.9.3 Expresión diferencial.....	36
6.9.3.1 Extracción de RNA total	36
6.9.3.2 Obtención de cDNA.	37
6.9.3.3 RT- PCR.....	37
6.10 Inducción de AHA.	38
VII.-RESULTADOS	39
7.1 Viabilidad de trofozoítos expuestos a esteviósido.....	39
7.2 Evaluación de cambios morfológicos mediante microscopia electrónica.	42
7.2.1 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).....	42
7.2.2 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).	43
7.3 Evaluación de la capacidad de adhesión de trofozoítos.	44
7.4 Evaluación del efecto del esteviósido sobre el citoesqueleto de actina.	45
7.5 Evaluación de factores de virulencia de trofozoítos tratados con esteviósido.....	46
7.5.1 Actividad proteolítica.	46
7.5.2 Efecto citopático.....	48
7.5.3 Expresión de genes.	51
7.6 Efecto de la virulencia <i>in vivo</i> en el modelo de AHA.	52
VIII.- DISCUSIÓN.....	55
IX.-CONCLUSIONES	61
X.-PERSPECTIVAS	62

XI.-REFERENCIAS	63
-----------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i>	7
Figura 2. Amibiasis intestinal, colitis ulcerativa.	13
Figura 3. Absceso hepático amibiano. Lesión en hígado de hámster.	15
Figura 4. Estructura química del esteviol y el esteviósido.	19
Figura 5. Biosíntesis del esteviósido a partir de la vía metileritrol-4-fosfato.	22
Figura 6. Metabolismo de glucósidos de esteviol en humanos.	24
Figura 7. Efecto del esteviósido sobre la morfología de <i>E. histolytica</i>	42
Figura 8. Cambios ultraestructurales en los trofozoítos tratados con esteviósido.	43
Figura 9. Efecto del esteviósido sobre el citoesqueleto de actina de <i>E. histolytica</i>	45
Figura 10. Perfil de proteína.	46
Figura 11. Actividad proteolítica de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	48
Figura 12. Análisis microscópico del efecto citopático.	50
Figura 13. Gel de agarosa al 2%.	51
Figura 14. Evaluación del desarrollo del AHA.	54

ÍNDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. Porcentaje de viabilidad de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> expuestos a concentraciones micromolares de esteviósido	39
Gráfica 2. Porcentaje de viabilidad de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> expuestos a concentraciones milimolares de esteviósido.	40
Gráfica 3. Determinación de la (IC ₅₀).....	41
Gráfica 4. Porcentaje de trofozoítos adheridos.....	44
Gráfica 5. Análisis densitométrico.	48
Gráfica 6. Evaluación del Efecto citopático de trofozoítos tratados con esteviósido	49
Gráfica 7. Expresión diferencial de genes.	52
Gráfica 8. Porcentaje de AHA.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de amplificación para los diferentes genes.....	38
---	----

RESUMEN

Entamoeba histolytica es el agente causal de la amibiasis en el humano. El fármaco de elección es el metronidazol, cuyos efectos secundarios conducen a la interrupción del tratamiento, evitando la eliminación de la infección. Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas, entre las que puedan incluirse productos naturales con actividad anti-amibiana efectiva. Se ha demostrado que diversas preparaciones tradicionales a partir de plantas poseen un efecto antiparasitario, basados a la presencia de algunos compuestos fitoquímicos como alcaloides, flavonoides, saponinas, terpenos y taninos. El esteviósido, un glucósido diterpénico presente en las hojas de *Stevia rebaudiana* posee actividad antiinflamatoria, antioxidante, antineoplásica y antiviral; sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito su efecto como antiparasitario. En este trabajo se evaluó el efecto del esteviósido sobre trofozoítos de *E. histolytica*. Los trofozoítos fueron tratados con diferentes concentraciones de esteviósido, la IC₅₀ determinada a partir de ensayos de viabilidad fue de 9.53 mM a las 24 h. Los trofozoítos tratados con esta concentración de esteviósido mostraron cambios en su morfología evidenciados mediante la disminución de estructuras esenciales para su movilidad y adherencia al sustrato como filopodios y pseudópodos, así como cambios en su ultraestructura en donde se observó la pérdida de regularidad de la membrana, aumento en la granularidad citoplásmica y vacuolas de tipo autofágicas. El esteviósido indujo cambios en el citoesqueleto de actina, causando una disminución en la capacidad de amiba para adherirse, además de tener un efecto en la disminución de la expresión génica de cistein proteasas y la actividad proteolítica lo que indujo una menor capacidad de los trofozoítos para degradar una monocapa celular. Los estudios del efecto *in vivo* de los trofozoítos tratados con el esteviósido en el modelo de absceso hepático amibiano (AHA), mostró que macroscópicamente el hígado no presentó diferencias significativas comparado con el hígado control inoculado con trofozoítos sin tratamiento. Sin embargo, el análisis histológico sugiere la existencia de cambios y diferencias en las lesiones granulomatosas hepáticas entre estos dos grupos, por lo que se requiere un análisis más detallado utilizando marcadores específicos de daño celular. Los resultados obtenidos en el presente trabajo constituyen las primeras bases para el posible uso del esteviósido como una alternativa terapéutica en la amibiasis en el futuro.

ABSTRACT

Entamoeba histolytica is the causative agent of amoebiasis humans. The treatment of choice of this infection is the metronidazole. However; this drug may produce secondary side effects that lead to the interruption of treatment, therefore it is essential for searching for new pharmacological alternatives. Among these, may include natural products that have antiparasitic activity. Various traditional preparations from plants that possess an antiparasitic effect are due to the presence of some phytochemical compounds, such as alkaloids, flavonoids, saponins, terpenes and tannins. The stevioside, a glycoside diterpenic present in the leaves of *Stevia rebaudiana* is known to have anti-inflammatory, antioxidant, antiviral and antineoplastic activities, however; up to the present it has not described any anti-amebic activity. In this work, we evaluated the effect of stevioside on trophozoites of *E. histolytica*. The trophozoites were treated with different concentrations of stevioside and the IC₅₀ determined from viability tests was 9.53 mM at 24 h. The trophozoites treated with this concentration showed changes in its morphology evidenced by changes of motility structures and adhesion capacity to the substrates. Lamellipodia and filopodia formation were reduced, as well as changes in the ultrastructure where noted the loss of regularity of the membrane, increase in the granularity cytoplasmic and vacuoles of autophagic type. Stevioside induced changes in the actin cytoskeleton, causing a decrease in the ability of amoeba to adhere. In addition, effect on the decrease of gene expression of cistein proteases and the lower proteolytic activity to degrade a cell monolayers. On the other hand, the *in vivo* analysis of the hamster liver inoculation of trophozoites previously treated with stevioside, showed non-significant macroscopic difference in the development of AHA as compared with animals inoculated with untreated trophozoites (to control). However, histological analysis of liver lesions showed changes in the inflammatory granulomatous lesions. Although these changes require more detailed analysis, including the use of specific markers of tissue damage. The results obtained up to the present suggest that stevioside may constitute an alternative therapy of amebiasis in the future.

I.- INTRODUCCIÓN

1.1 Amibiasis

1.1.1 Generalidades

Entamoeba histolytica es el parásito protozooario anaerobio causante de la amibiasis en el humano, que ocupa el tercer lugar entre las causas de muerte por parásitos a nivel mundial, después de la malaria y la esquistosomiasis (Pinilla, López y Viasus, 2008). Es transmitida por vía fecal-oral al ingerir alimentos o bebidas contaminadas con los quistes de este parásito. Se estima que alrededor de 40 a 50 millones de personas son infectadas anualmente por este protozooario; sin embargo, solo el 10% de la población desarrolla la enfermedad, registrándose entre 50,000 y 100,000 muertes anuales (Shirley *et al.*, 2018). Actualmente esta patología continúa siendo frecuente en países en vías de desarrollo, afectando principalmente a poblaciones con pobreza extrema, hacinamiento, falta de servicios de salud, suministro inadecuado del agua y saneamiento deficiente (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).

La manifestación clínica de la amibiasis varía desde la colonización asintomática en la mucosa del colon, hasta la amibiasis intestinal invasiva, caracterizada por la producción de úlceras en la pared intestinal, acompañada de daño al tejido con necrosis y hemorragias. En algunas ocasiones cuando se involucran los vasos sanguíneos, de la submucosa del intestino, se origina la llamada amibiasis extraintestinal, siendo la invasión del hígado la complicación más frecuente, generando la formación del absceso hepático amibiano (AHA) (Stanley, 2003b).

En México, la Dirección General de Epidemiología registró un total de 227,409 nuevos casos de amibiasis intestinal y 558 casos de AHA en el 2017, de los cuales el mayor número corresponde a pacientes entre 25 y 44 años, siendo los estados de Colima, Sinaloa, Tabasco, Chiapas, Hidalgo, Nayarit, Yucatán y Oaxaca, los más afectados (Secretaría de Salud, 2017).

El Metronidazol es el fármaco de elección establecido para el tratamiento de la amibiasis en niños y adultos (Marie y Petri, 2013). Sin embargo, este fármaco ha mostrado tener efectos adversos como diarrea, vómito, sabor metálico en la boca, dolor de cabeza, náuseas y pérdida del apetito, causando frecuentemente que no se concluya el tratamiento y por lo tanto que no se elimine completamente la infección. Estos trastornos colaterales se han asociado principalmente a la dosis y largo tiempo de administración del tratamiento (Martínez-Castillo *et al.*, 2018). Actualmente, se han buscado medicamentos alternativos, inocuos y confiables, que tengan un efecto antiparasitario efectivo. Las plantas representan una fuente importante en la búsqueda de nuevos compuestos terapéuticos. Se ha demostrado que diversas preparaciones tradicionales a partir de plantas medicinales poseen actividad contra *E. histolytica*. Estos efectos amebicidas han sido asociados principalmente a la presencia de diversos fitoquímicos tales como flavonoides, terpenos y taninos (Tona *et al.*, 1998) lo que ha representado una alternativa para el tratamiento contra este parásito.

1. 2 Biología de *E. histolytica*

E. histolytica es un organismo unicelular con un ciclo de vida bifásico; ya que presenta dos etapas biológicas en las cuales su forma es diferente. Estas dos etapas corresponden al trofozoíto, que es la forma invasiva y móvil, el cual habita y se multiplica dentro del intestino del hospedero humano; y el quiste, la forma infectiva del parásito y capaz de resistir en ambientes fuera del hospedero (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).

1. 2.1 Trofozoíto

Los trofozoítos representan la forma invasiva y móvil del parásito, habitan en la luz del intestino grueso donde se multiplican (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000). Los trofozoítos que se encuentran en la materia fecal, principalmente en heces disentéricas o lesiones hepáticas, llegan a medir de 20 a 40 μm , a diferencia de aquellas mantenidas en cultivo las cuales miden de 7 a 30 μm de diámetro. Estos son destruidos rápidamente fuera del hospedero y si son ingeridos son incapaces de resistir la acción de los ácidos gástricos y por lo tanto no generan infección

(Ximénez *et al.*, 2007). Son pleomórficos, ya que tienen la capacidad de cambiar su forma continuamente por la fluidez de su citoplasma y la plasticidad de su membrana. Se desplazan mediante la formación de pseudópodos, que además le confieren un potencial invasivo. Presentan un núcleo esférico que mide de 4 a 7 μm de diámetro, en la periferia se localiza el ácido ribonucleico (RNA), mientras que el ácido desoxirribonucleico (DNA) se encuentra localizado en posición central sin formación aparente de cromosomas (Chávez y González, 2013).

El citoplasma se encuentra constituido por dos zonas que no se encuentran separadas físicamente, pero se observan bien diferenciadas: un ectoplasma y un endoplasma. El ectoplasma que en general es claro y hialino, libre de estructuras membranosas o vacuolares, mientras que en el endoplasma se encuentran múltiples vacuolas o vesículas de diferentes tamaños rodeadas por una matriz citoplásmica homogénea y organelos del parásito (Campos-Peralta *et al.*, 2011). Su membrana plasmática está constituida por lípidos específicos, receptores y moléculas involucradas en la adhesión a la célula blanco; su espesor es de 10 nm, y la superficie externa está conformada por una capa fina llamada glucocálix, constituida principalmente por carbohidratos (Chávez y González, 2013).

1. 2. 2 Prequiste

Pertenece a la forma quística inicial. Este estadio suele presentarse cuando las condiciones del medio ambiente en las cuales se encuentra el trofozoíto, alteran la vida del parásito. Son esféricos e inmóviles, el citoplasma carece de ectoplasma y endoplasma a diferencia del trofozoíto, presentan una pared fibrilar externa gruesa y poseen un solo núcleo, que después de dos divisiones sucesivas por fisión binaria, da origen al quiste maduro tetranucleado (Campos-Peralta *et al.*, 2011).

1. 2. 3 Quiste

Los quistes, son la forma del parásito mediante la cual se disemina la infección. Poseen una forma esférica o discretamente oval y miden de 8 a 20 μm de diámetro. Está constituido por una pared que le confiere protección frente a la desecación y otras condiciones adversas cuando se encuentra fuera del conducto intestinal del huésped. Posee una forma esférica e inmóvil, presenta cuatro núcleos y una pared

externa gruesa (Campos-Peralta *et al.*, 2011) formada por material fibrilar que mide de 125 a 150 μm , cuyo principal constituyente es la quitina, un polímero de carbohidratos formado por unidades de N-acetil-D glucosamina (Ximénez *et al.*, 2007; Chávez y González, 2013). Una de sus principales características es su alta capacidad de sobrevivencia a ambientes húmedos hasta por una semana si la temperatura se mantiene en un intervalo de 28 - 34°C (Campos-Peralta *et al.*, 2011).

1. 2. 3 Ciclo de vida

La infección inicia con la ingesta de agua o alimentos contaminados con los quistes provenientes de heces de personas infectadas (MacFarlane, Shah y Singh, 2005). Una vez ingeridos, los quistes viajan a través del tubo digestivo, hasta llegar al estómago en donde son sometidos a la acción de los ácidos gástricos, enzimas intestinales y ácidos biliares, los cuales permiten el reblandecimiento de la pared (Ximénez *et al.*, 2007). Posteriormente, el desenquistamiento se lleva a cabo entre la parte final del intestino delgado (íleon terminal) y el inicio del intestino grueso quedando libres los trofozoítos, los cuales se multiplican por fisión binaria, se adhieren a la superficie mucosa del colon y se alimentan de detritus y bacterias (Tsutsumi y Chávez, 2002). El ciclo se completa cuando los trofozoítos sufren cambios morfológicos y bioquímicos en la luz del intestino transformándose en prequistes mononucleados que sintetizan y secretan una cubierta superficial que por medio de una serie de divisiones nucleares dan origen a los quistes tetranucleados que son eliminados a través de las heces. Sin embargo, en algunos pacientes, los trofozoítos son capaces de dañar la pared del intestino grueso, lo que permite la invasión de la mucosa y submucosa intestinal, ocasionando la formación de úlceras amibianas, en las cuales los trofozoítos se multiplican y a través del torrente sanguíneo logran invadir sitios extraintestinales, principalmente el hígado, y con menos frecuencia pulmones y cerebro (Haque *et al.*, 2003) causando lo que se conoce como amibiasis extraintestinal (Haque *et al.*, 2000). En otros casos, los trofozoítos permanecen en la luz intestinal (infección no invasiva), sin causar ningún tipo de síntomas, lo que los hace portadores asintomáticos y responsables de transmitir la infección por medio de sus heces (Marie y Petri, 2014; Shirley *et al.*, 2018), como se muestra en la figura 1.

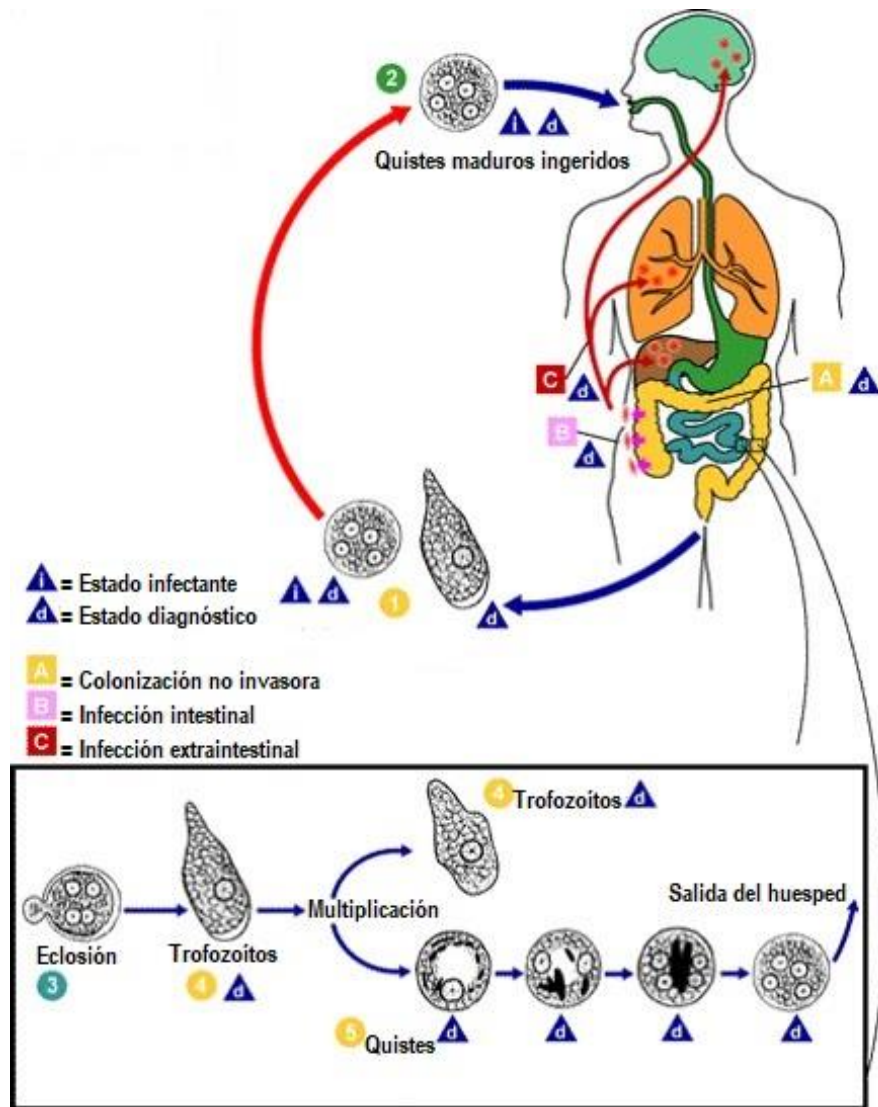


Figura 1. Ciclo biológico de *E. histolytica*.

1. 3 Mecanismos de patogenicidad

Se considera que la amibiasis es un proceso de múltiples pasos, en donde la amiba logra invadir la pared intestinal, resiste a la respuesta inmune del hospedero, destruye el tejido e invade otros órganos. En estos procesos se encuentran involucrados diversos factores de virulencia y pueden distinguirse tres etapas: adhesión, citólisis y fagocitosis (Marie y Petri, 2014); las cuales representan el mecanismo patogénico de la amiba sobre la célula blanco (Haque *et al.*, 2003) relacionados principalmente con tres tipos de moléculas: lectinas, amebaporos y proteasas (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).

1. 3. 1 Adherencia

Uno de los primeros pasos en la invasión intestinal por amibas es su contacto o adhesión a las células del hospedero. En la adhesión participan moléculas específicas del parásito conocidas como adhesinas y sus receptores presentes en la célula blanco (Ximénez *et al.*, 2007). La adhesión de los trofozoítos a la mucina colónica, células blanco y bacterias se produce principalmente a través de una lectina de unión a galactosa abundante en la superficie de las células (Frederick y Petri, 2005) conocida como lectina Gal/GalNac (Campos-Peralta *et al.*, 2011). Esta lectina está compuesta por un heterodímero, que presenta un peso molecular de 260 kDa, constituida por una subunidad pesada de 170 kDa caracterizada por su dominio de reconocimiento de carbohidratos (crd) y su alta capacidad de unión a residuos de Gal y Gal/Nac sobre la mucosa de la célula blanco (Marie y Petri, 2014), esta subunidad se encuentra unida mediante un enlace disulfuro a la subunidad ligera de 35 kDa, asociada de manera no covalente con la subunidad intermedia de 150 kDa. Por otra parte, se conoce la importancia de esta subunidad en la citólisis, ya que, al inhibir su actividad, se reduce la capacidad lítica que tiene la amiba sobre la célula, sin afectar la adherencia (Saffer y Petri, 1991).

Además de la participación de la lectina Gal/GalNac, se conocen diversas moléculas involucradas en el contacto con las células blanco. Entre estas moléculas, se encuentra la lectina de 220 kDa, el complejo EhCPADH112 de 112 kDa conformado por una adhesina y una proteasa de cisteína, lo cual podría conferirle actividad en

la degradación de moléculas durante la invasión de tejidos; y finalmente la proteína rica en serina (SREHP) de 52 kDa. Todas ellas han sido una importante fuente de estudio, como posibles candidatos para la producción de vacunas (Talamás-Rohana *et al.*, 1995; García-Rivera *et al.*, 1999; Betanzos *et al.*, 2013).

1. 3. 2 Citolisis

Una de las principales características de *E. histolytica* es su capacidad de destrucción de tejidos, en donde la adherencia representa un paso indispensable para causar el daño; en dicho mecanismo intervienen principalmente las proteasas de cisteína y los péptidos formadores de poros (Campos-Peralta *et al.*, 2011).

1. 3. 2.1 Proteasas de cisteína

Las proteasas de cisteína de *E. histolytica* juegan un papel importante en la disrupción de la barrera epitelial; son enzimas proteolíticas de secreción, críticas para la invasión del tejido y degradación de componentes de la matriz extracelular como la fibronectina, laminina y colágeno, además son capaces de interferir en la respuesta inmune y en la inducción de la apoptosis, todo esto con la finalidad de facilitar la invasión celular (Que y Reed, 2000). Hasta la fecha han sido identificados 20 genes que codifican para proteasas, sin embargo, los trofozoítos expresan solo ocho de estos genes, entre los que se encuentran *ehcp1*, *ehcp2*, *ehcp3*, *ehcp4*, *ehcp5*, *ehcp6*, *ehcp7* y *ehcp112*, con un peso molecular de 16 a 96 kDa, mientras que las formas predominantes, pertenecen a enzimas maduras de 27 a 37kDa (Que y Reed, 2000; Stanley, 2005) de las cuales EhCP1, EhCP2 y EhCP5 son las que representan aproximadamente el 90% de la actividad. Los patrones de expresión de estas proteasas han demostrado un porcentaje diferencial entre sí, sobre todo en comparación con *Entamoeba dispar*, una especie no patógena (Bruchhaus *et al.*, 2003).

La EhCP1 de *E. histolytica* se encuentra localizada en la superficie celular de la amiba, presenta un peso molecular de 48 kDa con mayor actividad proteolítica a pH de 4.4. Una de sus principales características es su alta capacidad para digerir colágena tipo I (Scholze y Schulte, 1988; Hellberg *et al.*, 2001; Kissoon-Singh, Mortimer y Chadee, 2011). Por otra parte, la EhCP2 se encuentra localizada en la

superficie celular y membranas internas de los trofozoítos, presenta un peso molecular de 35 kDa y posee actividad contra proteoglicanos de cartílago y colágeno con una óptima actividad proteolítica en un amplio intervalo de pH de 5.5 a 9.5 (Hellberg *et al.*, 2001).

Una de las proteasas de cisteína más estudiadas es la EhCP5, la cual se encuentra localizada en la membrana de los trofozoítos. Es la proteasa secretada y expresada mayormente en la superficie celular de la amiba, está involucrada directamente en la degradación de la mucina en el colon y en la invasión de los tejidos mediante la degradación de la matriz extracelular, además de participar en la evasión de la respuesta inmune al degradar inmunoglobulinas y tener la capacidad de unirse a proteínas efectoras del complemento (C3 y C5) (Jacobs *et al.*, 1998; Moncada *et al.*, 2006). Se ha confirmado que EhCP5 tiene la capacidad de degradar un amplio espectro de sustratos biológicos y sintéticos como mucina, fibrinógeno, colágeno, hemoglobina, albumina de suero bovino y gelatina (Serrano-Luna *et al.*, 2013). Presenta un peso molecular de 29 kDa con actividad optima a pH de 5.5 a 8 (Hellberg *et al.*, 2001). Además se ha considerado que la sobreexpresión de esta proteasa incrementa la expresión de EhCP1 y EhCP2 mientras que la eliminación de su expresión disminuye la degradación de la mucina, destrucción celular, capacidad fagocítica y reduce el tamaño de abscesos hepáticos *in vivo* (Ankri, Stolarsky y Mirelman, 1998).

1. 3. 2. 2 Amebaporos

Entre los mecanismos involucrados en la lisis tisular se encuentran las enzimas proteolíticas “formadoras de poros”, las cuales facilitan la invasión de los tejidos y poseen capacidad para insertarse en la bicapa lipídica de la membrana de la célula mediante la unión con fosfolípidos aniónicos a pH bajo; dando origen a la formación de oligómeros. Los oligómeros se expanden hasta dar origen a una molécula más grande, para posteriormente llevar a cabo la formación de canales iónicos o microporos, por donde difunden iones permitiendo la entrada de Ca^{2+} y la salida de Na^+ , K^+ y agua (Trejos-Suárez y Castaño-Osorio, 2009; Ralston y Petri, 2011)

produciendo lisis celular, por un mecanismo parecido al complemento (Leippe, 1997).

Sin embargo, más allá de su actividad lítica en contra de las células blanco, estas enzimas proteolíticas representan un factor importante en la eliminación de bacterias ingeridas que se encuentran presentes dentro de vacuolas digestivas (Winkelmann, Leippe y Bruhn, 2006). Además tienen la capacidad de inducir necrosis en células epiteliales y leucocitos durante la invasión (García-Zepeda *et al.*, 2007).

Estas enzimas proteolíticas pertenecen a una familia de pequeños péptidos (5 a 10 kDa), que se encuentran contenidos en las vesículas del citoplasma y han sido identificados como amebaporos A, B y C, de los cuales la forma A es considerada como la más abundante de las tres isoformas. La forma A se encuentra conformada por 77 residuos de aminoácidos que incluyen seis residuos de cisteína, los cuales han sido aislados y caracterizados bioquímicamente, debido a su importante capacidad de insertarse en la membrana de bacterias y células blanco causando su lisis (Leippe *et al.*, 2005).

1.3.3 Fagocitosis

En organismos multicelulares, la fagocitosis representa el último paso de la vía apoptótica, llevando a cabo la eliminación de las células muertas, evitando la generación de la respuesta inflamatoria originada por aquellos compuestos tóxicos liberados; de forma similar, la amiba tiene la capacidad de fagocitar todas aquellas células apoptóticas de manera inmediata, lo que le confiere protección al impedir la salida del contenido tóxico al medio, dando paso a la evasión de la inflamación y como consecuencia la prolongación de la infección (Begum, Quach y Chadee, 2015).

La fagocitosis de la amiba se caracteriza por la ingesta de bacterias, fragmentos celulares, células vivas e ingesta de glóbulos rojos y representa un proceso muy activo, el cual inicia con el reconocimiento y la unión de la amiba a la célula blanco mediante receptores, lo que da lugar a una serie de eventos que incluyen la

reorganización del citoesqueleto y la formación de seudópodos que posteriormente se cierran alrededor del fragmento a ingerir, dando como resultado la formación de un fagosoma (Voigt y Guillén, 1999).

Durante mucho tiempo ha sido considerado como un indicador de virulencia (Trejos-Suárez y Castaño-Osorio, 2009) ya que su papel en la patogénesis ha sido evidenciado en amibas deficientes en fagocitosis, las cuales mostraron una disminución en su virulencia (Orozco *et al.*, 1983). Sin embargo, se ha sugerido que la eritrofagocitosis no es un proceso representativo de la capacidad de virulencia de la amiba en modelos *in vivo*, ya que al utilizar cepas con alta capacidad eritrofagocítica, éstas pueden producir abscesos hepáticos amibianos (AHA) muy pequeños en comparación con una cepa que posee un bajo nivel de eritrofagocitosis, pero una alta capacidad para generar abscesos hepáticos (Tsutsumi *et al.*, 1992).

1. 4 Patología de la amibiasis

Se sabe que cuando el parásito invade el intestino grueso, puede comportarse como un comensal o bien en algunos casos puede llegar a invadir la mucosa intestinal causando la destrucción del tejido, lo que da origen a la colitis amibiana ulcerativa. Por otra parte, aunque con menor frecuencia, el parásito puede llegar a invadir otros órganos por vía hematógena, afectando principalmente el hígado, en donde se produce el AHA, el cual representa la complicación extraintestinal más común de la lesión intestinal invasiva (Olivos-García, *et al.*, 2011).

1. 4. 1 Amibiasis intestinal

La mayoría de las infecciones con *E. histolytica* son asintomáticas, los trofozoítos habitan en el lumen, y/o la pared del colon. Ante la presencia de diarrea, salen en el contenido fecal, frecuentemente con eritrocitos fagocitados. Sin embargo, cuando no existe diarrea, los trofozoítos suelen enquistarse antes de abandonar el intestino. Por otra parte, la amibiasis sintomática es primariamente una enfermedad intestinal que se manifiesta con una variedad de alteraciones como la colitis ulcerativa amibiana, disentería amibiana fulminante y la enfermedad extraintestinal (Haque *et al.*, 2003). La más común de estas enfermedades intestinales, es la colitis ulcerativa

amibiana, presente en el ciego, colon sigmoideas y el recto; caracterizada por la presencia de úlceras circulares con un tamaño aproximado de 0.1-0.5 centímetros (Shibayama y Tsutsumi, 2013). El daño a la mucosa se presenta con zonas de necrosis dando origen a la formación de lesiones en forma de botón de camisa como se muestra en la figura 2. Conforme la invasión progresa, las úlceras en la mucosa se extienden profundamente y pueden llegar a cubrir la mayor parte de la mucosa del colon, causando edema y eritema en las áreas mucosas que no se encuentran involucradas (Olivos-García *et al.*, 2011). Las úlceras presentan en su contenido trofozoítos, bacterias y células inflamatorias, por lo que, al invadir la lámina propia, los trofozoítos logran entrar al torrente sanguíneo, diseminándose con frecuencia al hígado causando los llamados AHA (Tannich, Mirelman y Petri, 2003; Marie y Petri, 2014). Los pacientes con colitis amibiana presentan dolor abdominal con cólicos, pérdida de peso y diarrea acuosa con abundante moco y poca materia fecal acompañada o no de sangre, cuando ésta existe se habla de disentería amibiana (Ximénez *et al.*, 2007).



Figura 2. Amibiasis intestinal, colitis ulcerativa. Tomada de (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).

1. 4. 2 Amibiasis hepática

La infección causada por *E. histolytica* puede provocar colitis amibiana e incluso complicaciones extraintestinales, cuando el trofozoíto invade la pared intestinal y se disemina por vía hematogena (Anesi y Gluckman, 2015). El hígado es el principal órgano extraintestinal afectado por la amibiasis invasiva, y en el que se origina el AHA, el cual representa la complicación extraintestinal más común (Tsutsumi *et al.*, 1984). Las amibas llegan al hígado a través del sistema portal, afectando principalmente el lóbulo izquierdo, debido a que éste es el que recibe la mayor parte de la circulación portal. Los pacientes desarrollan síntomas, incluyendo fiebre, dolor abdominal en el cuadrante superior derecho e incluso, pero con menos frecuencia síntomas gastrointestinales hasta después de 2 a 4 semanas de infección (Prakash y Bhimji, 2018).

El AHA se presenta como un área en la que el parénquima hepático ha sido sustituido por material necrótico amarillento de consistencia cremosa limitada por tejido hepático congestivo como se muestra en la figura 3. Las complicaciones de la infección extraintestinal, se encuentra asociada a la ruptura del absceso con extensión al peritoneo, la cavidad pleural o el pericardio (Haque *et al.*, 2003).

Los estudios sobre el AHA *in vivo* han sido desarrollados en hámster (*Mesocricetus auratus*) ya que representa un buen modelo de estudio por sus características que semejan a las presentadas en el humano (Tsutsumi y Shibayama, 2006). Tsutsumi y col., en 1984 realizaron un estudio sobre la secuencia morfológica durante la formación del AHA, mediante la inoculación intraportal de trofozoítos de *E. histolytica*, desde la etapa aguda, hasta el desarrollo de la necrosis hepática extensa. Estos investigadores observaron que al inocular trofozoítos de alta virulencia, la respuesta inflamatoria aguda y la formación de lesiones granulomatosas, conllevan a la necrosis hepática, la cual se va extendiendo progresivamente hasta llevar al animal a la muerte, debido no solo a la presencia de los trofozoítos, sino también a la lisis de leucocitos, principalmente polimorfonucleares.

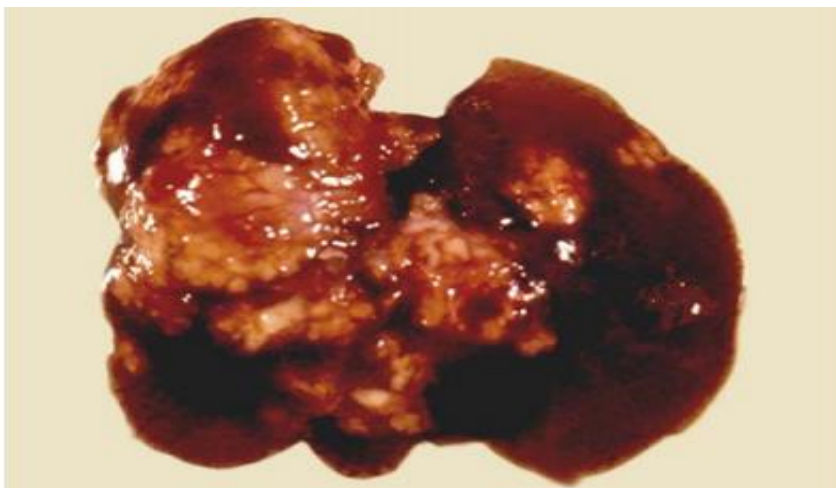


Figura 3. Absceso hepático amibiano. Lesión en hígado de hámster. Tomada de (Tsutsumi y Shibayama, 2006).

1. 5 Diagnostico de la amibiasis

La detección del parásito *E. histolytica*, representa un objetivo importante debido a que la amibiasis sigue siendo una de las tres causas más comunes de muerte por enfermedad parasitaria (Tanyuksel y Petri, 2003). El diagnóstico de la amibiasis intestinal se puede realizar mediante exámenes de microscopía, basados en la identificación de los estadios del parásito en las muestras obtenidas de pacientes (López, Quiroz y Pinilla, 2008). Sin embargo, existen algunos otros métodos como la identificación de isoenzimas (Ali, Clark y Petri, 2008) y la determinación de algunos componentes antigénicos como las adhesinas, mediante el uso de técnicas de biología molecular (Shirley *et al.*, 2018).

Existen estudios que han revelado que los pacientes con AHA, no necesariamente presentan colitis amibiana concomitante y con frecuencia no tienen síntomas intestinales (Ali, Clark y Petri, 2008), por lo que la microscopía de heces no es eficiente para su diagnóstico. Por lo tanto, ha sido necesaria la utilización de diferentes alternativas para el diagnóstico de la amibiasis extraintestinal, como los estudios de imagen que incluyen radiografía de abdomen, ecografía hepática, tomografía y resonancia magnética (López, Quiroz y Pinilla, 2008).

1.6 Tratamiento de la amibiasis

Los medicamentos empleados contra la amibiasis se encuentran clasificados en lumbinales, entre ellos: las 8-hidroxiquinolonas halogenadas (yodoquinol) y las amidas (teclozan, etofamida y quinfamida); o tisulares como nitroimidazoles (metronidazol, secnidazol y ornidazol), de los cuales únicamente el metronidazol presenta acción mixta, es decir tanto luminal como tisular (Guerrant *et al.*, 2001).

Actualmente no existe una vacuna eficaz para la amibiasis, por lo que la prevención se ha centrado en el saneamiento, acceso al agua potable y servicios de salud (Shirley *et al.*, 2018). El metronidazol es el fármaco de elección para tratar esta infección y es conocido por su alta efectividad amebicida. Sin embargo, se ha detectado la inducción de efectos adversos como vómito, diarrea, náuseas, dolor de cabeza y sabor metálico en la boca (Martínez-Castillo *et al.*, 2018), así como actividad teratogénica, mutagénica y resistencia (Sisson *et al.*, 2000) lo cual, ha llevado a la búsqueda de nuevas terapias eficientes y seguras que logren resolver la infección intestinal y extraintestinal. Entre las nuevas alternativas terapéuticas se han encontrado compuestos presentes en diversas plantas como los flavonoides, terpenos, taninos y tiofenos, los cuales han presentado una importante actividad amebicida.

1.7 Stevia rebaudiana

Stevia rebaudiana Bertoni es un arbusto perenne, perteneciente a la familia Asteraceae (Compositae), nativo de Sudamérica, especialmente de regiones subtropicales de Brasil y Paraguay. Este pequeño arbusto es conocido como “Stevia” u “Hoja de miel” debido a su alto contenido de diterpeno dulce (Ferrazzano *et al.*, 2015), lo que la ha convertido en una nueva alternativa como edulcorante para su uso en alimentos y bebidas. Sus hojas han sido utilizadas desde épocas antiguas, en América Latina y Oriente durante siglos como tratamiento medicinal (Rizzo *et al.*, 2013). Forma parte de las 230 especies pertenecientes al género estevia, y es una de las dos únicas especies *S. rebaudiana* y *S. phlebophylla* que producen esteviol, el metabolito activo. En 1899 fue descubierta y clasificada

botánicamente por Moisés Santiago Bertoni, inicialmente su nombre fue *Eupatorium rebaudianun* el cual se cambió a *Stevia* en 1905 (Barriocanal *et al.*, 2008).

Actualmente se ha llevado a cabo la caracterización de los principales compuestos presentes en los extractos de *Stevia*, y han sido identificados 89 compuestos, clasificados en diferentes familias (Molina-Calle, Priego-Capote y Luque de Castro, 2017). Estos extractos además de presentar propiedades terapéuticas, contienen un alto nivel de compuestos edulcorantes, conocidos como glucósidos de esteviol, que poseen actividad antioxidante, antimicrobiana, y antifúngica (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012), además de beneficios que incluyen acciones antihiper glucémicas, antihipertensivas, antiinflamatorias, antitumorales, antidiarréicas, diuréticas, antioxidantes y antifibróticas (Ferrazzano *et al.*, 2015; Ramos-Tovar *et al.*, 2018). El contenido natural de la planta son glucósidos diterpénicos, entre los que se encuentra el esteviósido (STV), rebaudiósido A, B, C, D y E, dulcósido A y esteviolbiósido. De los cuales el STV y el rebaudiósido A representan los compuestos de mayor contenido en las hojas de esta planta (Gupta *et al.*, 2017) con un sabor más dulce que la sacarosa correspondiente a 143 y 242 veces respectivamente (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). El sabor del rebaudiósido A es mejor, debido a que es más dulce y menos amargo que el STV (Brandle y Telmer, 2007).

1.7.1 Esteviósido.

El STV es un glucósido diterpénico de sabor dulce, que se encuentra presente en las hojas de *Stevia*. Ha sido utilizado durante muchos años en Japón y Brasil como sustituto de azúcar, además de su uso como antidiarreico (Lee *et al.*, 2001). En 1909, Ovidio Rebaudi fue el primero en aislar el ingrediente activo de la estevia, el "STV" (Hossain *et al.*, 2017) y en 1931 se llevó a cabo la purificación del extracto para su obtención.

En el año 1952 se estableció su estructura química como un glucósido diterpeno, con un peso molecular de 804.80 g/mol, en forma pura se presenta como un material cristalino de color blanco, presenta un punto de fusión de 196-198 °C, su fórmula molecular es $C_{38}H_{60}O_{18}$ y su estructura se encuentra formada por tres moléculas de

glucosa unidas por enlaces β -glucosídicos a la molécula de esteviol, correspondiente a la fracción de aglicona de los glucósidos (Chan *et al.*, 2001; Lemus-Mondaca *et al.*, 2012; Rizzo *et al.*, 2013) el cual participa en la construcción de un enlace éster en el C19 de su grupo carboxilo y una unidad de glucosa, junto con la formación de enlaces éter utilizando su grupo hidroxilo en el carbono 13 con combinaciones de restos de glucosa (Gupta *et al.*, 2017) como se muestra en la figura 4.

El estudio sobre los efectos benéficos que presenta el STV frente a diferentes padecimientos es muy reciente, y se ha demostrado que éste tiene importantes efectos benéficos para personas con obesidad, diabetes mellitus, enfermedades del corazón y caries dentales (Ghanta *et al.*, 2007). Los estudios toxicológicos muestran que el STV no presenta efectos mutagénicos, teratogénicos, carcinogénicos y alérgicos mediante su uso como edulcorante (Pól, Hohnová y Hyötyläinen, 2007), y que además tiene una alta capacidad para inhibir la proliferación de líneas celulares (López *et al.*, 2016) e inducir apoptosis en células de cáncer de colon, ovario y mama a través de la generación de especies reactivas de oxígeno. Adicionalmente ha mostrado efectos benéficos en respuesta a la deprivación de suero (Paul *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2017), y en infecciones virales (Takasaki *et al.*, 2009; Alfajaro *et al.*, 2014) y antibacterianas (Nunes *et al.*, 2006; Puri y Sharma, 2011). Asimismo, se ha descrito que este glucósido presenta una importante capacidad para disminuir la expresión de distintas moléculas involucradas en la inflamación, lo que le confiere una buena capacidad como antiinflamatorio mediante la regulación a la baja de la expresión del factor nuclear NF- κ B y diversas citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 (Fengyang *et al.*, 2012; Boonkaewwan y Burodom, 2013; Wang *et al.*, 2014; Potočnjak *et al.*, 2017). Por otro lado, también ha mostrado propiedades antioxidantes regulando positivamente al factor Nrf2, contrarrestando el estrés oxidativo y la necrosis en un modelo de cirrosis hepática en rata (Casas-Grajales *et al.*, 2019).

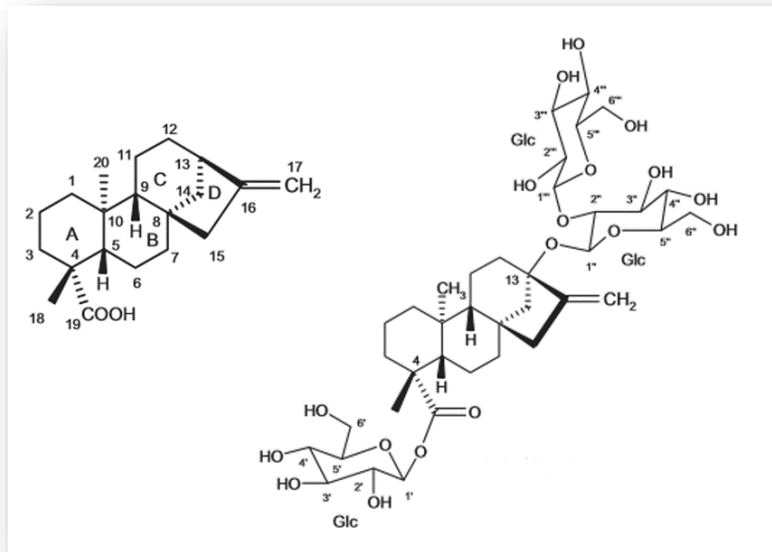


Figura 4. Estructura química del esteviol y el estevióside.

1.7.1.1 Biosíntesis del estevióside.

Los isoprenoides o terpenos son moléculas esenciales, sintetizadas por diversos organismos, sin embargo, la mayor diversidad de estos compuestos se presenta en las plantas. Los isoprenoides se derivan de dos unidades básicas, el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero el dimetilalil difosfato (DMAPP). En las plantas estos precursores son sintetizados mediante dos vías que actúan en distintos compartimentos celulares. La vía mevalónica (MVA), presente en el citoplasma y la vía del metileritritol-4-fosfato (MEP) presente en los plástidos, son responsables de la síntesis de isoprenoides que incluyen fitohormonas, pigmentos fotosintéticos, acarreadores de electrones, antioxidantes y moléculas de defensa ante patógenos (Lange *et al.*, 2000). Los isoprenoides han sido clasificados con base al número de unidades básicas que los constituyen, entre los que se pueden encontrar los diterpenos, formados por cuatro unidades isoprenicas con 20 carbonos, (León y García, 2007).

El dulzor presente en las hojas de *Stevia* se debe a la presencia de sus metabolitos secundarios, llamados glucósidos de esteviol, entre los que se encuentra el STV un glucósido diterpeno. La ruta biosintética de los glucósidos de esteviol está conformada por diversos pasos los cuales son catalizados por diversas enzimas. Los 7 pasos iniciales sintetizan el IPP y el DMAPP, que participan en la vía (MEP), conocida en la biosíntesis de los isoprenoides. Los siguientes 5 pasos involucran la síntesis del ácido kaurenico a partir del geranylgeranyl difosfato (GGDP) el cual comparte similitud con la vía de síntesis de las giberelinas y finalmente los 4 pasos restantes son específicos de la biosíntesis de los glucósidos de esteviol (Brandle y Telmer, 2007; Gupta y col., 2017; Kumar y col., 2012; León y García, 2007; Totté y col., 2000; Yadav y Guleria, 2012) como se muestra en la Figura 5. La primera reacción de esta vía involucra la condensación de una molécula de piruvato con el gliceraldehido-3-fosfato mediante la enzima 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintetasa (DXS), produciendo 1-desoxi-D-xilulosa 5 fosfato. En el segundo paso biosintético 1-desoxi-D-xilulosa 5 fosfato es convertida a 2-C-Metil-D-eritrol-4-fosfato (MEP), por la acción de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reducto isomerasa (DXR). A continuación 2-C-Metil-D-eritrol-4-fosfato da origen al 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol mediante la acción de la enzima 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 4-fosfosintasa (CMS), 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol da origen al 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol 2-fosfato mediante la enzima 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 4-fosfato cinasa (CMK), 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol 2-fosfato produce 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato por la acción enzimática de 2C-metil-D-eritritol 2-4 difosfato sintasa (MCS), para que finalmente este producto de origen al 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4 difosfato (HMBPP) por la enzima 2C-metil-D-eritritol ciclo difosfato sintasa (HDS). En el último paso de la vía de MEP, la enzima 1-hidroxi-2-metil-butenil 4-difosfato reductasa (HDR) convierte al HMBPP en IPP y DMAPP. Posteriormente el IPP se convierte en geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) por la acción enzimática de la geranylgeranyl difosfato sintasa (GGDPS), para posteriormente dar origen al copalil difosfato por medio de la acción de la enzima copalil difosfato sintasa (CDPS). En seguida por medio de la ent-kaureno sintasa (KS) se produce el kaureno. La enzima ent-kaureno oxidasa (KO) es la encargada

de producir el ácido kaurenico el cual es hidroxilado por medio de la enzima ácido kaurenico-13 hidroxilasa (KAH) para la producción del esteviol. Los tres pasos restantes son específicos para la biosíntesis de los glucósidos de esteviol, los cuales son catalizados por UDP-glicosiltransferasas (UGT). UGT85C2 cataliza la adición de glucosa al carbono 13 del esteviol produciendo esteviolmonosido. Posteriormente este es glicosilado para formar esteviolbiósido sin embargo aún no se ha logrado identificar la UGT que cataliza este paso. Finalmente, el esteviolbiósido es glicosilado en el carbono 19 por la UGT74G1 lo que da origen a la producción del STV (Totté *et al.*, 2000; J. E. Brandle y Telmer, 2007; León y García, 2007; Kumar *et al.*, 2012; Yadav y Guleria, 2012; Gupta *et al.*, 2017).

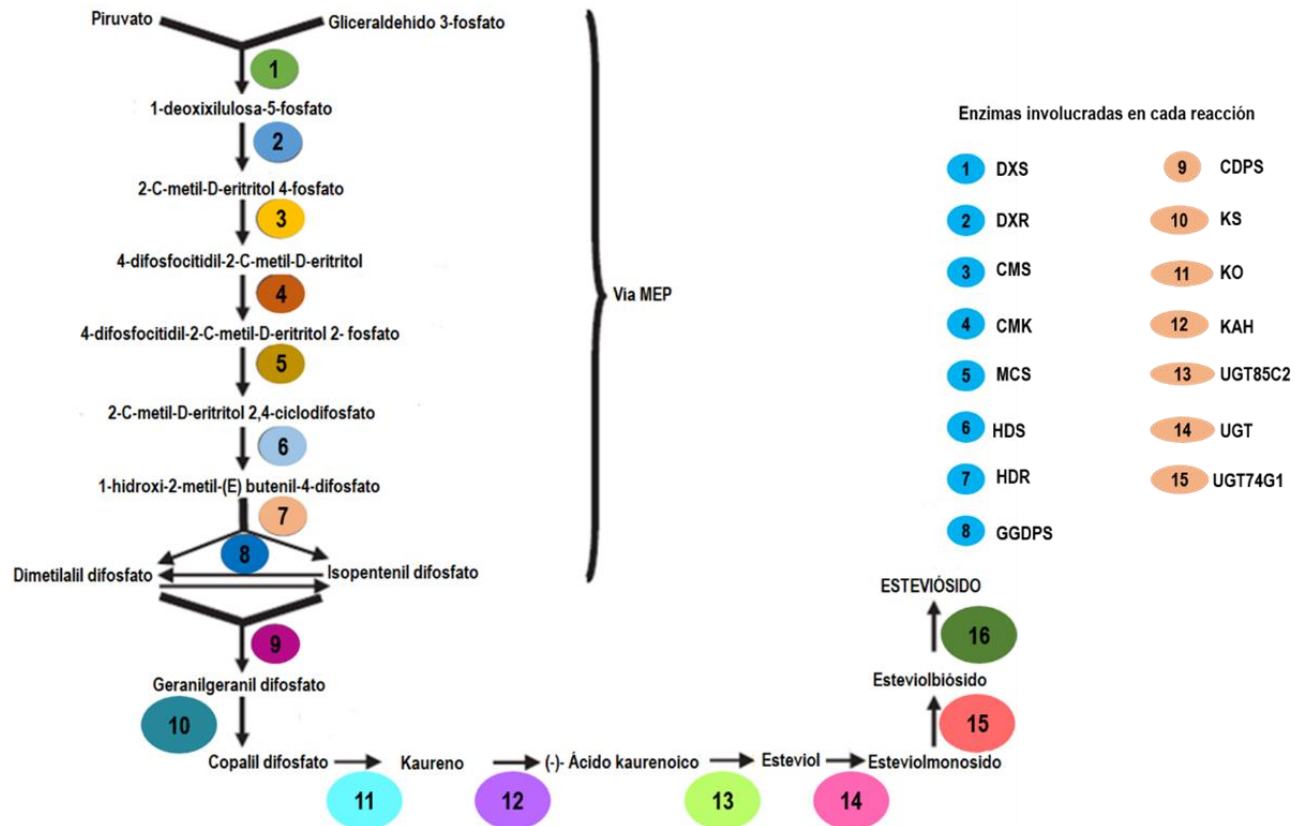


Figura 5. Biosíntesis del esteviósido a partir de la vía metileritrol-4-fosfato. Esquema tomado y modificado de (Kumar et al., 2012).

1.7.1.2 Absorción y metabolismo del esteviósido.

El STV posee un alto peso molecular, por lo tanto, no es absorbido fácilmente en el intestino delgado y ninguna de las enzimas del tracto gastrointestinal puede llevar a cabo la hidrólisis de los glucósidos de esteviol (Geuns, 2003; Brahmachari *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha demostrado mediante estudios *in vitro* e *in vivo* que éste logra ser hidrolizado a esteviol mediante la acción de la microflora presente en el colon, a través de la ruptura de enlaces glucosídicos, eliminando las unidades de glucosa, antes de la absorción (Wheeler *et al.*, 2008). La diversidad de microorganismos que habitan el intestino humano, complementa la actividad enzimática y confiere funciones esenciales para la digestión, particularmente involucradas en el metabolismo de componentes de la dieta y sus sustancias generadas (Rowland *et al.*, 2018). La microbiota intestinal se encuentra caracterizada por una diversa población de microorganismos, aproximadamente el 90% de estas especies están clasificadas principalmente como *Firmicutes* y *Bacteroidetes* y en menor porcentaje filos comunes como *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Fusobacteria* (Samuel *et al.*, 2018). El género de *Bacteroides* es el principal responsable de la hidrólisis de los glucósidos de esteviol por medio de su actividad de β -glucosidasa, por lo que los restos de azúcar no son absorbidos, ya que lo más probable es que estos microorganismos los utilicen como fuente de energía, convirtiéndolo en un edulcorante sin calorías (Carakostas *et al.*, 2008).

Posterior a la biotransformación, el esteviol es liberado para su absorción y transporte al hígado a través de la bilis. En el hígado el esteviol, se conjuga con el ácido glucurónico para dar lugar a la producción de glucurónido de esteviol. Una pequeña parte del ácido glucurónico, permanece en el colon, por lo que es excretado mediante las heces. Mientras que el glucurónido de esteviol recién unido es liberado en la sangre y filtrado por medio de los riñones hasta ser excretado por la orina, como se muestra en la figura 6 (Gupta *et al.*, 2017; Ramos-Tovar y Muriel, 2017; Samuel *et al.*, 2018).

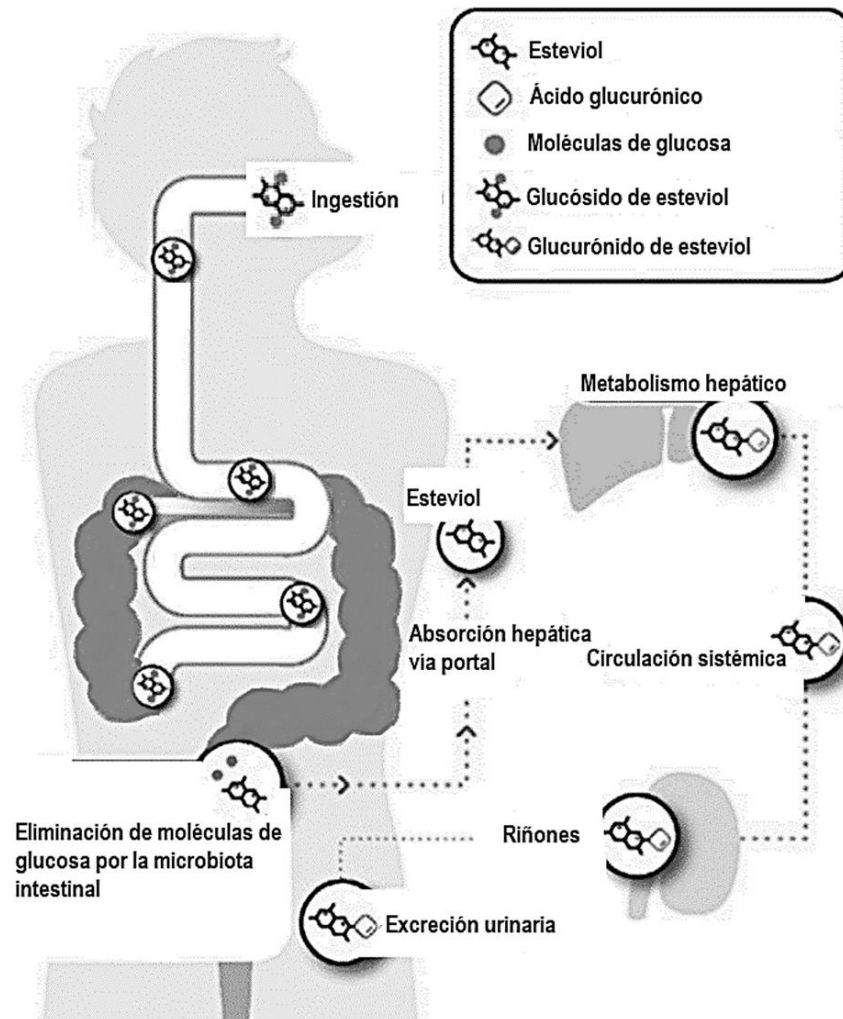


Figura 6. Metabolismo de glucósidos de esteviol en humanos. Tomado y modificado de (Samuel et al., 2018).

II.- ANTECEDENTES

La amibiasis causada por *E. histolytica*, se encuentra asociada a una alta mortalidad y morbilidad, lo que la ha convertido en un problema importante de salud pública. Actualmente el metronidazol es el fármaco terapéutico de elección para el tratamiento de esta infección, sin embargo, se han presentado casos de resistencia al medicamento, lo que resulta en la necesidad del aumento en las dosis de ingesta, causando efectos secundarios como dolor de cabeza, náuseas, sequedad y sabor metálico en la boca, así como, neurotoxicidad. Por lo que se ha recurrido a la búsqueda de nuevos agentes antiprotozoarios eficaces para resolver la infección.

Las plantas representan una fuente importante en la búsqueda de nuevos agentes para el tratamiento de infecciones parasitarias. La actividad de estas plantas se encuentra asociada principalmente a la actividad de sus compuestos fitoquímicos entre los cuales se han identificado flavonoides, saponinas, esteroides, terpenos y taninos. En México, se cuenta con alrededor de 25,000 especies de flora, las cuales son utilizadas como tratamientos naturales con importantes beneficios para la salud, que representan alternativas potenciales en la obtención de nuevas terapias (Herrera-Martínez *et al.*, 2016).

Entre los antecedentes documentados con base a la actividad de los terpenos, se ha demostrado que la linearolactona, la cual pertenece a la clasificación de los diterpenos y que se encuentra presente en las hojas de la *Salvia polystachya* posee actividad antiprotozoaria no solo con *E. histolytica* sino también con el parásito *G. lamblia*, lo cual fue demostrado a partir de la producción de extractos de las hojas de esta planta (Calzada *et al.*, 2009a). Por otra parte, Velázquez-Domínguez *et al* (2013), reportaron los resultados obtenidos a partir del estudio de la actividad antiprotozoaria de la incomptina A un sesquiterpeno extraído de la planta *Dacachaeta incompta* usada comúnmente en la medicina tradicional como tratamiento contra la diarrea. Los datos obtenidos en este estudio sugirieron que este compuesto podría afectar el crecimiento de la amiba mediante la alteración de su metabolismo energético, en donde se observó la expresión diferencial de

enzimas involucradas en la glucólisis, además de que este sesquiterpeno mostró un aumento en el número de gránulos de glucógeno de la amiba.

En cuanto a los estudios realizados con extractos de *Stevia rebaudiana*, se ha demostrado que, entre sus principales compuestos activos, se encuentran, flavonoides, fenoles, alcaloides y glucósidos diterpénicos de esteviol. Entre estos glucósidos se encuentra el STV, que representa el porcentaje más alto de contenido en las hojas de esta planta, por lo que este compuesto podría jugar un papel importante dentro de los beneficios terapéuticos. Se ha demostrado que las hojas de *Stevia* poseen una importante actividad en el tratamiento de diversas patologías como cáncer y enfermedades inflamatorias (Rojas *et al.*, 2018), también se ha reportado su efecto como hepatoprotector (Ramos-Tovar y Muriel, 2017; Ramos-Tovar *et al.*, 2018; Ramos-Tovar *et al.*, 2019). Además ha sido útil en el tratamiento de algunos padecimientos que involucran agentes etiológicos como bacterias (Moselhy, Ghoneim y Khan, 2016; Sansano *et al.*, 2017), virus (Takahashi *et al.*, 2001) y parásitos (Beer *et al.*, 2016), indicado la participación del STV y algunos flavonoides, como los posibles metabolitos responsables en los efectos benéficos.

En un estudio realizado por Achucarro *et al* (2011), se llevó a cabo la evaluación clínica preliminar del efecto antiparasitario de *Stevia*, en donde se administraron comprimidos de esta planta a niños y adultos previamente diagnosticados con parásitos, entre los cuales se encontraba *E. histolytica*. Los resultados obtenidos mostraron que las personas tratadas con mebendazol-tinidazol y *Stevia rebaudiana* redujeron de forma similar la infección por protozoarios y helmintos, además estos resultados demostraron que las dosis administradas de comprimidos de *Stevia* no provocan efectos secundarios en los pacientes a diferencia de los efectos presentados en pacientes a los cuales se les administró mebendazol-tinidazol, sugiriendo su posible participación como agente antiparasitario con poca actividad tóxica.

Hasta el momento se sabe que el STV tiene una importante participación sobre la inhibición de la proliferación de diversas líneas celulares, además de mostrar actividad antioxidante, hepatoprotectora y apoptótica (Paul *et al.*, 2012; Takahashi

et al., 2012; Ren *et al.*, 2017; Casas-Grajales *et al.*, 2019) sin embargo, aún no se conoce su efecto sobre parásitos. Por lo tanto, al no tener estudios previos sobre la actividad de este glucósido en la actividad antiparasitaria, hemos propuesto el estudio de este compuesto para determinar si posee algún efecto sobre *E. histolytica*.

III.- JUSTIFICACIÓN

La amibiasis continúa siendo un problema importante de salud pública. El fármaco de elección es el metronidazol, cuyos efectos adversos conocidos llevan a la interrupción del tratamiento evitando la eliminación de la infección, por lo que resulta indispensable la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas seguras y con actividad anti-amibiana efectiva, como los terpenos. Se sabe que el esteviósido, un diterpeno presente en las hojas de *Stevia rebaudiana* posee actividad antiinflamatoria, antioxidante, antineoplásica y antiviral; sin embargo, hasta la fecha no ha sido estudiado su efecto como antiparasitario. Por lo anterior proponemos la caracterización *in vitro* e *in vivo* de los efectos causados por el esteviósido sobre la viabilidad y virulencia de trofozoítos de *E. histolytica*, lo que podría constituir las primeras bases para su uso como una nueva alternativa terapéutica.

IV.- HIPÓTESIS

El esteviósido afecta la viabilidad, morfología y virulencia de trofozoítos de *E. histolytica* en cultivo y disminuye el desarrollo de lesiones hepáticas amibianas en un modelo *in vivo*.

V.- OBJETIVOS

5.1 General

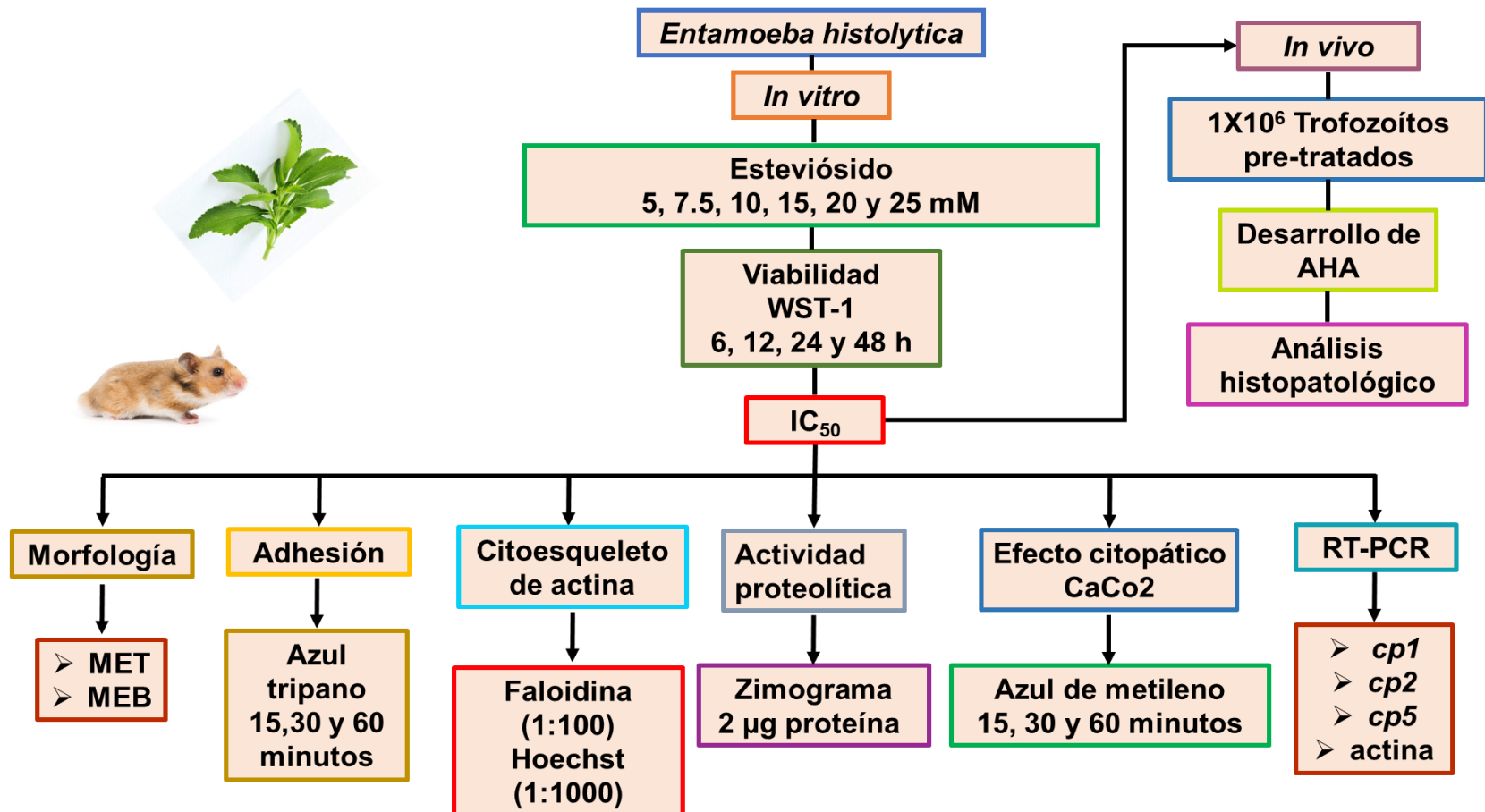
Evaluar el efecto del esteviósido sobre los trofozoítos de *E. histolytica* *in vitro* e *in vivo*.

5.2 Específicos

- ✚ Determinar el efecto del esteviósido sobre la viabilidad de trofozoítos de *E. histolytica* y obtener la IC₅₀.
- ✚ Identificar los cambios morfológicos de los trofozoítos tratados con esteviósido.
- ✚ Evaluar los efectos del esteviósido sobre algunos factores de virulencia de los trofozoítos de *E. histolytica*.
- ✚ Analizar el efecto *in vivo* sobre la virulencia de trofozoítos de *E. histolytica* expuestos a esteviósido en el modelo de absceso hepático amibiano en hámster.

VI.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Estrategia experimental general



6.2 Microorganismo.

Los trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS fueron cultivados axénicamente a 37°C en medio TYI-S-33, suplementado con suero bovino al 10% y vitaminas. Para todos los experimentos realizados se utilizaron cultivos de trofozoítos en fase logarítmica, se enfriaron en agua hielo durante 15 minutos, y se contaron utilizando una cámara de Neubauer.

6.3 Esteviósido.

El STV utilizado en este proyecto fue adquirido en Sigma-Aldrich® con número de catálogo 50956. El vehículo utilizado para este compuesto fue el medio de cultivo TYI-S-33.

6.4 Ensayos de viabilidad de trofozoítos

Para determinar la actividad del STV sobre trofozoítos de *E. histolytica*, se realizaron ensayos de viabilidad. Se sembraron 10, 000 trofozoítos en placas de 96 pozos para la condición de control y tratamiento. Para ambas condiciones, los trofozoítos se dejaron adherir durante 2 h a 37°C con un volumen final de 300 µl de medio por pozo. Los trofozoítos pertenecientes al grupo tratado, a partir de una solución stock de STV se determinó el volumen correspondiente para cada concentración de esteviósido a probar, tanto concentraciones µM como mM a 6, 12, 24 y 48 h. Después del tiempo de exposición correspondiente, se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se realizaron 3 lavados con PBS 1X estéril y temperado para evitar que las amibas adheridas se desprendieran, posteriormente se colocaron 95 µl de PBS 1X estéril y 5 µl del reactivo WST-1 (Roche, No. Cat.05 015 944 001). Las placas se incubaron a 37°C durante 30 min, posteriormente, en un lector de microplacas, la absorbancia se midió a una longitud de onda de 450nm. A partir de los resultados de porcentaje de viabilidad se determinó la IC₅₀ mediante el uso del programa GraphPad Prism 6.0, mediante la obtención de una curva dosis-respuesta. El resultado de la IC₅₀ fue de 9.53 mM de STV después de 24 h de exposición, por lo que estas condiciones fueron utilizadas para los siguientes ensayos.

6.5 Microscopía electrónica de transmisión.

Los trofozoítos tratados con 9.53 mM de STV durante 24 h, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio pH 7.2, 0.1M durante 1 h, fueron post-fijados con tetróxido de osmio al 1% en el mismo amortiguador, en agitación por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se deshidrataron con etanol en concentraciones crecientes (25, 50, 70, 90 y 96%), alcohol absoluto y oxido de propileno. Fueron incluidas en resina epóxica durante 1 h y se polimerizó a 60°C durante 24 h. Se obtuvieron cortes ultrafinos, los cuales se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para finalmente ser examinados con el microscopio electrónico de transmisión.

6.6 Microscopía electrónica de barrido.

Los trofozoítos adheridos a cubreobjetos, fueron expuestos 9.53 mM de STV durante 24 h, se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en cacodilato de sodio al 0.1M durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados con amortiguador de cacodilato de sodio para retirar el exceso de fijador. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas con etanol en concentraciones crecientes (25, 50, 70 y 90%) y alcohol absoluto. Después de la deshidratación, las muestras se secaron a punto crítico y se cubrieron con oro para finalmente ser observadas en el microscopio electrónico de barrido.

6.7 Efecto del esteviósido sobre la capacidad de adhesión de *E. histolytica*.

Se incubaron trofozoítos durante 24 h a 37°C con 9.53 mM de STV y trofozoítos en condiciones normales de cultivo. Después del tiempo de incubación los trofozoítos se despegaron en agua hielo durante 15 min. Se sembraron 250,000 trofozoítos en caja de 24 pozos previamente tratadas con 100 µg de fibronectina y se dejaron adherir durante 15, 30 y 60 min. Posterior al tiempo de incubación se retiró el medio de cultivo y únicamente se trabajó con las amibas adheridas, se realizó un conteo viable de amibas con azul tripano para ambas condiciones y se determinó el porcentaje de células adheridas.

6.8 Evaluación del efecto del esteviósido sobre el citoesqueleto de actina por microscopía con focal.

Se sembraron 250,000 trofozoítos de *E. histolytica* en cubreobjetos previamente silanizados, se incubaron a 37° durante 1 h para que se adhirieran. Posteriormente se colocó el STV a una concentración de 9.53 mM y se incubó a 37°C durante 24 h. Las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% por 15 min y posteriormente se permeabilizaron con tritón al 0.2% por 10 min. Se incubaron con faloidina rodaminada (1:100) por 45 min a temperatura ambiente cubiertas con aluminio. Se realizaron tres lavados con PBS 1X estéril temperado y se colocó reactivo de Hoechst (1:1000) durante 30 min. Finalmente, las muestras se montaron con Vecta shield y se almacenaron a -20°C para su posterior observación mediante microscopía confocal en el microscopio Carl Zeiss LSM 700 (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

6.9 Virulencia de *E. histolytica*.

Para determinar el efecto del STV sobre la virulencia de la amiba se llevó a cabo, la determinación de la actividad proteolítica mediante zimogramas, análisis del efecto citopático sobre células CaCo2, y cambios moleculares en la expresión de mRNA de algunos de los factores de virulencia importantes en este parásito, como cisteín proteasas *cp1*, *cp2* y *cp5*. Para estos ensayos, los trofozoítos fueron expuestos 9.53 mM de STV durante 24 h a 37°C y trofozoítos sin exposición al compuesto fueron utilizados como control.

6.9.1 Perfil de proteína y actividad proteolítica.

Se obtuvieron extractos crudos de trofozoítos expuestos y sin exposición al STV, para determinar el perfil protéico y la actividad proteolítica mediante la degradación de sustrato.

Para obtener el perfil de proteína, 1×10^6 amibas de ambas condiciones (control y tratadas con STV) se colocaron en agua hielo durante 15 min para despegar, posteriormente se centrifugaron a 2,500 rpm por 5 min, y se desechó el sobrenadante. La pastilla obtenida se resuspendió en 1 ml de PBS 1X y se transfirió a un microtubo de 1.5 ml en donde se realizaron 3 lavados con PBS 1X a 2,500 rpm

5 min por cada lavado. Posteriormente se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en regulador de lisis (TRIS 10 mM, Tritón 2.5% e inhibidores de proteasas al 2X) y se incubó durante 10 min en hielo. A continuación, se centrifugó a 10,000 rpm 2 min y se recuperaron 100 µl del sobrenadante para cuantificar por el método de Bradford y 100 µl para precipitar. La proteína se precipitó agregando sulfato de zinc 4mM y se incubó a temperatura ambiente por 15 min, se centrifugó a 10,000 rpm 6 min, se recuperó la pastilla y se resuspendió en buffer de muestra, se colocó en agua hirviendo durante 8 min, se agregó β-mercaptoetanol y se centrifugó a 10,000 rpm 3 min para únicamente trabajar con el sobrenadante. Posteriormente las muestras se desarrollaron en un gel de poliacrilamida al 12% a 90 volts por 10 min y 120 volts por 90 min en baño de hielo, una vez finalizado el desarrollo electroforético, el gel se tiñó con Azul de Coomassie 1 h a 37°C con agitación y posteriormente se colocó solución desteñidora para observar el patrón de proteína.

Por otra parte, para determinar la actividad proteolítica de cada extracto mediante la obtención de zimogramas 1×10^6 amibas de ambas condiciones (control y tratadas con STV) se colocaron en agua hielo durante 15 min para despegar, posteriormente se centrifugaron a 2,500 rpm por 5 min, el sobrenadante se recuperó, se centrifugó y se filtró con una membrana de 0.2 µm para posteriormente realizar los zimogramas de medio condicionado. La pastilla obtenida se resuspendió en 1 ml de PBS 1X y se transfirió a un microtubo de 1.5 ml en donde se realizaron 3 lavados con PBS 1X a 2,500 rpm 5 min por cada lavado. Posteriormente se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en regulador de lisis (Tris-HCl 10 Mm y Tritón 2.5%) y se incubó durante 10 min en hielo. A continuación, se centrifugó a 10,000 rpm 2 min y se recuperaron 100 µl del sobrenadante para cuantificar por el método de Bradford y 100 µl para cargar la muestra en geles de poliacrilamida al 15% co-polimerizados con gelatina de piel porcina al 0.1% con regulador de muestra. El desarrollo electroforético se llevó a cabo con las mismas condiciones que el perfil de proteínas. Al término de la electroforesis, los geles se lavaron dos veces en una solución de tritón X-100 al 2.5% para posteriormente incubarlos durante toda la noche en regulador de activación pH 7 (Tris-HCl 100 mM CaCl₂ 10 mM) a 37°C en agitación.

Los geles se lavaron con agua tridestilada y se tiñeron con solución de azul de Coomassie 1 h a 37°C. Finalmente los resultados (áreas claras) fueron analizados mediante el escaneo de los geles, y su posterior análisis por densitometría utilizando el programa ImageJ.

6.9.2 Efecto citopático

Para medir el efecto citopático se cultivó una monocapa de la línea celular CaCo2 (500,000 células), en medio DMEM 1X, suplementado con suero fetal bovino al 10%, y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Las células CaCo2 fueron interaccionadas con trofozoítos (250,000) expuestos a STV y sin exposición a STV durante 15, 30 y 60 min. Transcurrido el tiempo de interacción se retiró el medio de cultivo, la placa se colocó sobre hielo para eliminar la mayor cantidad de trofozoítos y se realizaron 3 lavados con PBS 1X frío. Posteriormente estas células fueron fijadas con paraformaldehído al 2.5% durante 15 min y lavadas con PBS 1X. Los restos de la monocapa fueron teñidos con azul de metileno y posteriormente se realizó una lisis química de las células con 1 ml de HCl al 0.1N a cada pozo. La placa se incubó a 37°C durante 15, 30 y 60 minutos para la extracción de colorante. El colorante extraído se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 660 nm. El efecto citopático se determinó mediante la comparación de las absorbancias de las monocapas interaccionadas con trofozoítos control (no tratados) y trofozoítos tratados con STV. Por otra parte, se crecieron células en cubreobjetos previamente silanizados, y se interaccionaron con trofozoítos como se mencionó anteriormente, se fijaron con paraformaldehído al 2.5% y se lavaron con PBS 1X, a continuación, las muestras se tiñeron con H & E para su análisis en el microscopio de luz.

6.9.3 Expresión diferencial.

6.9.3.1 Extracción de RNA total.

Para la extracción de RNA se utilizó el reactivo NZYol (nzytech genes & enzymes), se utilizó 1 ml de reactivo por cada 5x10⁶ células y se almacenó a -20°C durante toda la noche. Posteriormente las muestras (control y tratamiento) se incubaron a temperatura ambiente 5 min, se adicionaron 200 µl de cloroformo y se agitaron

vigorosamente por 15 seg, se incubaron a temperatura ambiente 3 min, se centrifugó a 12,000 xg durante 15 min, se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo. Se colocaron 500 µl de isopropanol y se incubaron 10 minutos en hielo, después se centrifugaron a 12,000 x g por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, y el pellet se lavó con 1ml de etanol-DEPC al 75%, se centrifugo a 7,500 x g por 5 min a 4°C, se eliminó el etanol, y se dejó secar la pastilla por evaporación durante 5 min en hielo. Finalmente, el RNA se resuspendió en 30 µl de agua libre de RNAsas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.9.3.2 Obtención de cDNA.

Se utilizó el kit de retrotranscripción NZY First Strand cDNA Synthesis (nzytech genes & enzymes), bajo las condiciones del proveedor, empleando Master mix 2X NZYRT, NZYRT enzyme mix, RNA y agua DEPC.

6.9.3.3 RT- PCR.

Después de llevar a cabo la síntesis de cDNA se realizó el ensayo de PCR con DNA polimerasa (NZYtaq II DNA polymerase) para cada molécula de interés, la mezcla de reacción consistió en regulador 10X, MgCl₂, dNTP's, oligonucleótidos sentido y antisentido, cDNA, NZYtaq II y agua, para posteriormente observar los productos obtenidos en geles de agarosa al 2% en el transiluminador Bio-Imaging systems miniBis pro, las bandas obtenidas se sometieron a un análisis de densidad óptica utilizando el programa ImageJ y se graficaron empleando el programa GraphPad Prism 6.0. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar las secuencias de factores de virulencia de la amiba, correspondientes a los genes de proteasas de cisteína (*cp1*, *cp2* y *cp5*), como control interno para evaluar la expresión de estos factores de virulencia se utilizó *actina*. Las condiciones de amplificación de los oligonucleótidos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de amplificación para los diferentes genes

Gen	Secuencia	Tm (C°)	Amplicon (pb)	MgCl₂ (mM)
cp1	F: 5'ACAGCAGTTGAGTCACTCCG 3' R: 5'ACTGCTTTGGGTGCTTGGAT 3'	55°C	212 pb	1mM
cp2	F: 5'TGGACCATTTGCTGCTATGA 3' R: 5'TAACATGATCCGCATTGTGC 3'	52°C	177 pb	1 mM
cp5	F: 5'CGCTGCTATTGATGCTTCTG 3' R: 5'CTCCCCAAATAGTTCCCAT 3'	52°C	173 pb	1.5 mM
actina	F: 5'GCACTTGTTGTGGATCCTGGA3' R: 5'CTCGAGTTAGAAGCATTTTCT3'	55°C	1200 pb	1.5 mM

6.10 Inducción de AHA.

Se utilizaron 2 grupos de 9 animales para cada condición (control y tratamiento). Se inocularon 1×10^6 trofozoítos de *E. histolytica* por vía intrahepática y se permitió que la infección evolucionara 5 días. Las amibas fueron tratadas previamente con una concentración de 9.53 mM de STV por 24 h antes de ser inoculadas. Las muestras obtenidas de hígado se procesaron para su posterior análisis macroscópico e histopatológico mediante la tinción con H&E.

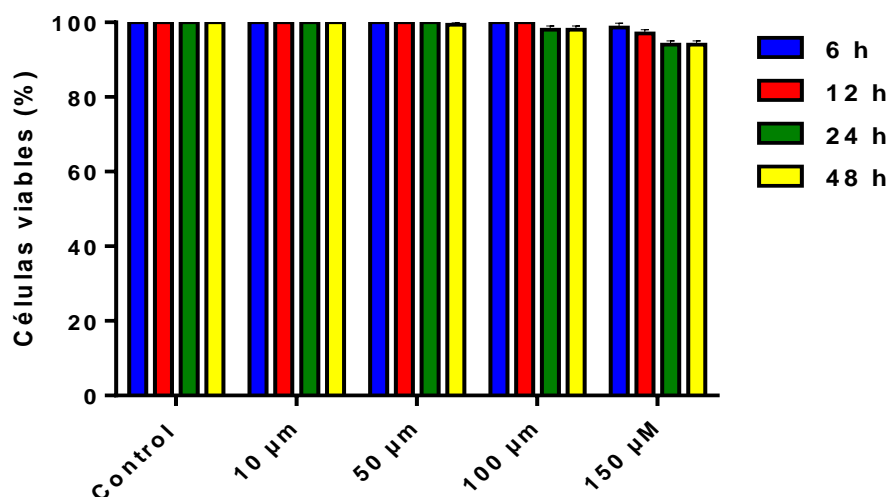
VII.-RESULTADOS

7.1 Viabilidad de trofozoítos expuestos a esteviósido.

El análisis de la viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica* expuestos a diversas concentraciones de STV, se llevó a cabo mediante el uso del reactivo WST-1 el cual es una sal de tetrazolio que, mediante la acción de enzimas principalmente deshidrogenasas de células activas metabólicamente es reducida a sal de formazán emitiendo un color amarillo el cual es leído mediante espectrometría a 450 nm, por lo que el resultado de las absorbancias emitidas es directamente proporcional al porcentaje de células viables.

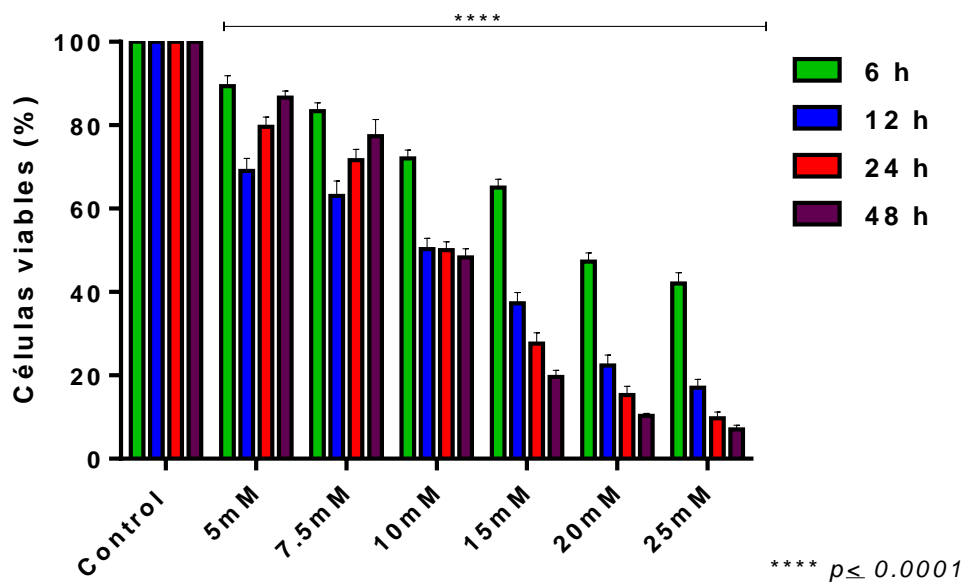
Para determinar el efecto del STV sobre la viabilidad de trofozoítos de *E. histolytica*, se realizaron ensayos de dosis respuesta, incubando los parásitos con concentraciones μM (10, 50, 100 y 150) y mM (5, 7.5, 10, 15, 20 y 25) de STV durante 6, 12, 24 y 48 h a 37°C, como control se utilizaron amibas sin tratamiento.

En los ensayos realizados con concentraciones μM , observamos que la viabilidad de los trofozoítos no se afecta de manera significativa en ninguna de las condiciones analizadas, como se observa en la gráfica 1.



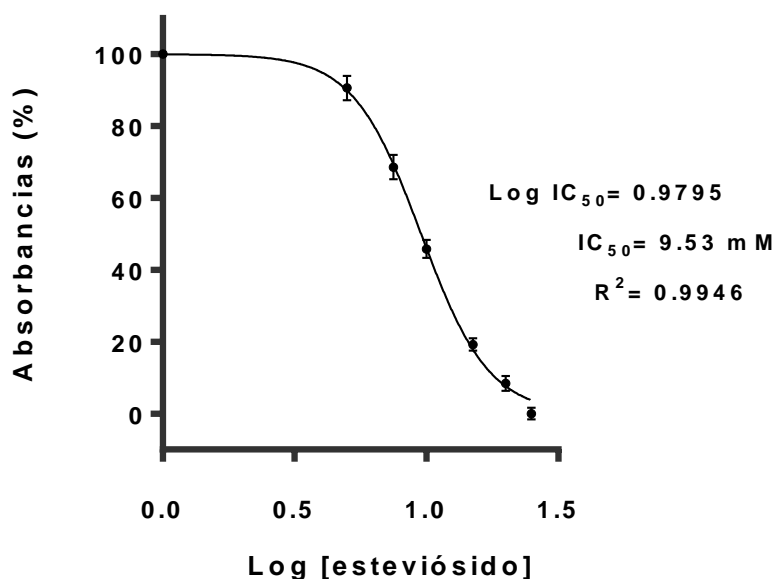
Gráfica 1. Porcentaje de viabilidad de trofozoítos de *E. histolytica* expuestos a concentraciones micromolares de esteviósido $p \leq 0.05$.

Por otra parte, los resultados obtenidos mediante la exposición de los trofozoítos a concentraciones mM de STV, presentaron efectos sobre la disminución de la viabilidad de los trofozoítos. Las concentraciones de 5 y 7.5 mM mostraron una disminución en la viabilidad celular únicamente a las 6 y 12 h, mientras que a las 24 y 48 h el cultivo comenzó a recuperarse, demostrando de esta manera que ambas concentraciones no presentan un efecto sobre la viabilidad de la amiba. Por otra parte, la concentración de STV de 10 mM mostró un efecto amebostático ya que la viabilidad disminuyó a partir de las 6 h de tratamiento aproximadamente un 20% mientras que a partir de las 12 hasta las 48 h la viabilidad celular se mantuvo en aproximadamente el 50%. Las concentraciones de 15, 20 y 25 mM mostraron un efecto tóxico para las amibas a partir de las 6 h de exposición, siendo la concentración de 25 mM la concentración que presenta un mayor efecto sobre el cultivo en todos los tiempos evaluados. De esta manera se logró determinar que el STV posee un efecto dependiente de la dosis y el tiempo a partir de la concentración de 10 mM hasta 25 mM, como se observa en la gráfica 2.



Gráfica 2. Porcentaje de viabilidad de trofozoítos de *E. histolytica* expuestos a concentraciones milimolares de esteviósido. Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. **** $p \leq 0.0001$.

A partir de la determinación del porcentaje de viabilidad celular, se observó que la concentración de 10 mM presentó un efecto inhibitorio de aproximadamente el 50% de la población en todos los tiempos evaluados, sin embargo, para comprobar si esta concentración era la adecuada para realizar los siguientes experimentos, determinamos la concentración inhibitoria del 50% de la viabilidad celular (IC_{50}) a 24 h de exposición. Se realizó un análisis dosis-respuesta con el programa GraphPad Prism 6.0. en donde los datos obtenidos de las absorbancias a 24 h se normalizaron y se obtuvieron los porcentajes para cada condición, tomando al control como el 100% de viabilidad, posteriormente se realizó una regresión no lineal de todos los porcentajes y se obtuvo el resultado de la IC_{50} el cual fue de 9.53 mM de STV como se muestra en la gráfica 3. La IC_{50} del STV se utilizó para todos los ensayos posteriores presentados en esta tesis.



Gráfica 3. Determinación de la concentración que inhibe el 50% de la viabilidad celular (IC_{50}).

7.2 Evaluación de cambios morfológicos mediante microscopia electrónica.

7.2.1 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

Con el propósito de determinar cambios en la morfología de la amiba inducidos por el STV, se realizó un análisis mediante microscopia electrónica de barrido. Los trofozoítos en condiciones normales de cultivo poseen distintas características, descritas previamente por diversos autores. Los trofozoítos control presentaron pleomorfismo, en general una forma ovoide alargada, con emisión de filopodios y pseudópodos prominentes de diversas dimensiones, una superficie de aspecto rugoso con pequeñas invaginaciones circulares correspondientes a bocas fagocíticas como se muestra en la figura 7 A, B y C. Por otra parte, los trofozoítos tratados con STV, mostraron el mismo pleomorfismo que una amiba control, aparentemente con una menor formación de pseudópodos y filopodios, así como una superficie de aspecto menos rugoso y una disminución en la formación de bocas fagocíticas como se observa en la figura 7 D, E y F lo cual podría estar asociado a una disminución en su capacidad de invasión y adhesión.

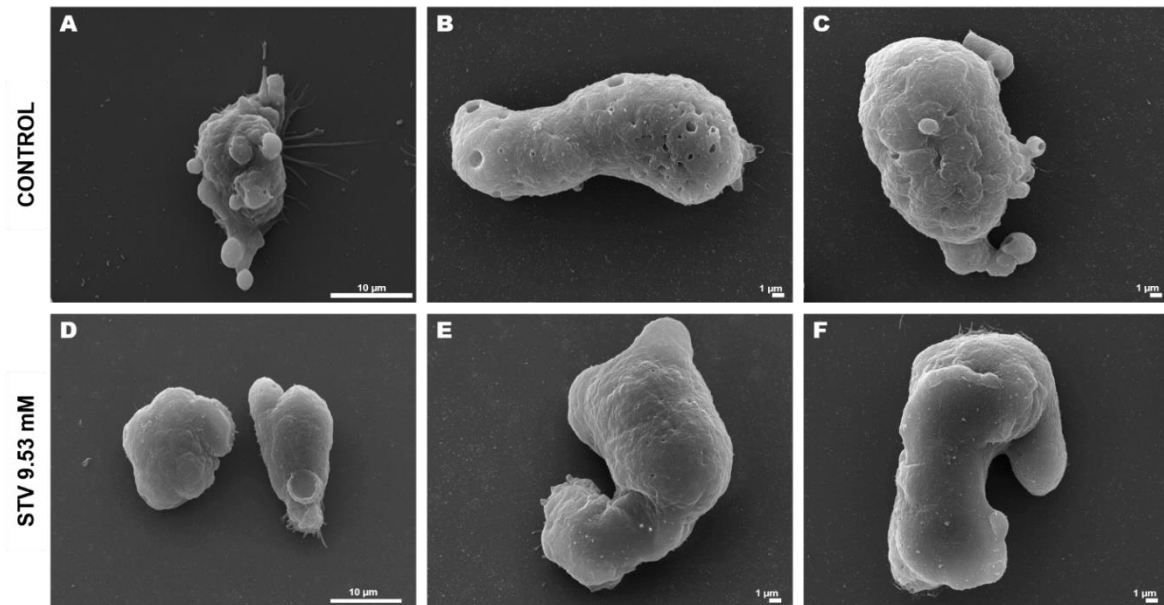


Figura 7. Efecto del esteviósido sobre la morfología de *E. histolytica*. Los trofozoítos control mostraron una morfología ovoide alargada, emisión de pseudópodos y filopodios, así como una superficie de aspecto rugoso con formación de bocas fagocíticas. Los trofozoítos tratados con STV se mantuvieron pleomórficos, sin embargo, mostraron una superficie menos rugosa, así como la disminución de bocas fagocíticas, pseudópodos y filopodios.

7.2.2 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).

El análisis ultraestructural de los trofozoítos se realizó mediante microscopia electrónica de transmisión. Los trofozoítos control mostraron una membrana plasmática bien definida y uniforme, en el citoplasma se observaron abundantes vacuolas de diversos tamaños con apariencia esférica las cuales, en su mayoría no presentan contenido, depósitos de glucógeno dispersos en el citosol y un núcleo totalmente definido con cromatina de aspecto normal ubicada periféricamente dentro del núcleo como se observa en la figura 8 A, B y C. Sin embargo, las amibas expuestas al STV presentaron una membrana plasmática de apariencia irregular, se observó una disminución en el número de vacuolas, las cuales en su mayoría presentaban desechos celulares como fragmentos de citoplasma, contenido granular y membranas rotas. El citoplasma se observó más electrodensito y con un mayor aumento de granularidad celular de origen desconocido, mientras que el núcleo mostró una apariencia similar al control como se muestra en la figura 8 D, E y F. El resultado obtenido mediante este análisis sugiere que la presencia de contenido membranal y citoplásmico en el interior de las vacuolas podría estar asociado a autofagia.

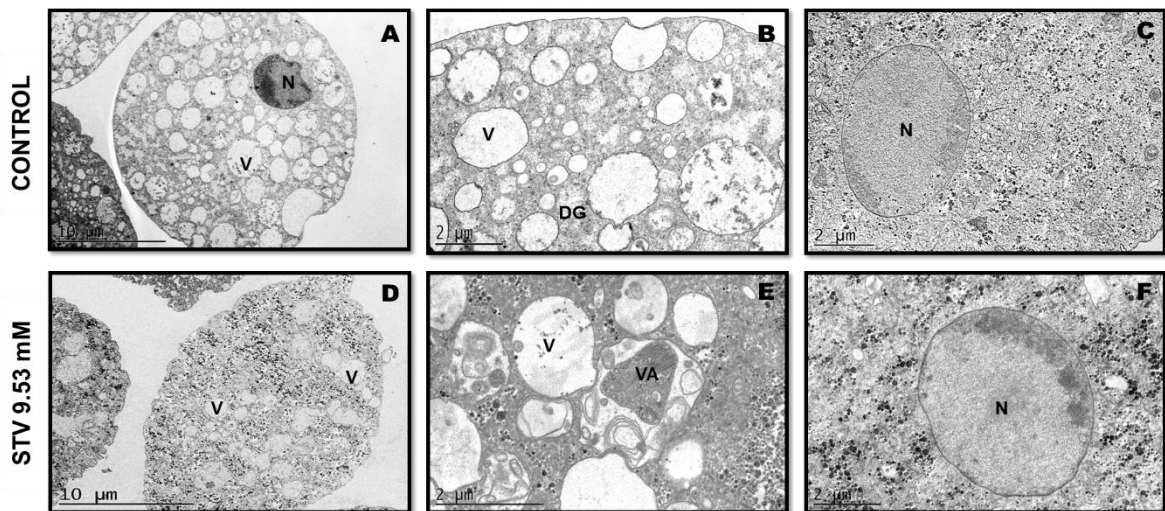
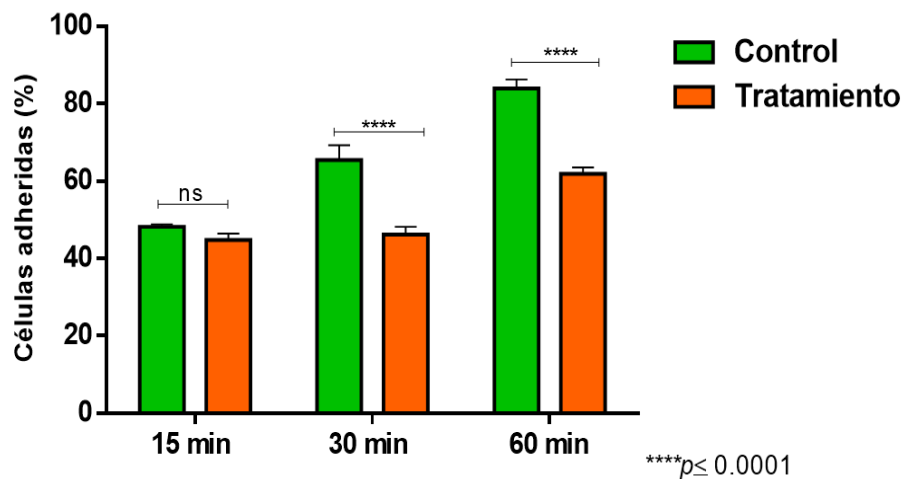


Figura 8. Cambios ultraestructurales en los trofozoítos tratados con estevósido. Los trofozoítos control mostraron una membrana plasmática bien definida, una gran parte del volumen citoplásmico ocupada por vacuolas esféricas (V), depósitos de glucógeno (DG) y un núcleo totalmente definido (N). Los trofozoítos tratados con STV mostraron una membrana irregular, disminución en el número de vacuolas (V), vacuolas de tipo autofágico (VA) con evidente contenido citoplásmico, aumento en la granularidad citoplásmica y un núcleo bien definido (N).

7.3 Evaluación de la capacidad de adhesión de trofozoítos tratados con esteviósido.

Debido a que en el análisis morfológico de la amiba presentó una disminución en la emisión de pseudópodos y filopodia los cuales están asociados tanto al movimiento como a la capacidad de adhesión de la amiba, se realizaron ensayos de adhesión a fibronectina mediante un conteo viable con azul tripano. Se sembraron 250,000 trofozoítos sin tratamiento y tratados previamente durante 24 h con STV en placas de 24 pozos recubiertas con fibronectina y la evaluación se llevó a cabo a los 15, 30 y 60 min. El porcentaje de adhesión se obtuvo con relación al número de trofozoítos sembrados inicialmente.

El porcentaje de adhesión a los 15 min en ambas condiciones no mostró diferencia significativa, mientras que a los 30 y 60 min el porcentaje de trofozoítos tratados con STV mostró un menor porcentaje de trofozoítos adheridos como se observa en la gráfica 4. Con base a estos resultados se sugiere que el STV tiene un efecto sobre la capacidad de los trofozoítos para adherirse a fibronectina.



Gráfica 4. Porcentaje de trofozoítos adheridos. Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. **** $p \leq 0.0001$.

7.4 Evaluación del efecto del esteviósido sobre el citoesqueleto de actina.

El citoesqueleto de actina representa una función esencial en la división celular y la patogenicidad de *E. histolytica*, participa en la interacción célula-célula y célula-sustrato, endocitosis, adhesión y secreción, (Defilippi *et al.*, 1999; Meza, Talamás-Rohana y Vargas, 2006; Chávez-Munguía *et al.*, 2008). Para evidenciar si el STV es capaz de alterar la estructuración del citoesqueleto de actina, amibas control y tratadas con STV durante 24 h, se tiñeron con Faloidina rodaminada (rojo) y los núcleos se contra tiñeron con Hoechst (azul). Las amibas control presentaron puntos de nucleación, fibras de estrés y anillos contráctiles; mientras que los trofozoítos tratados con esteviósido presentaron una menor cantidad de fibras de estrés como se observa en la figura 9.

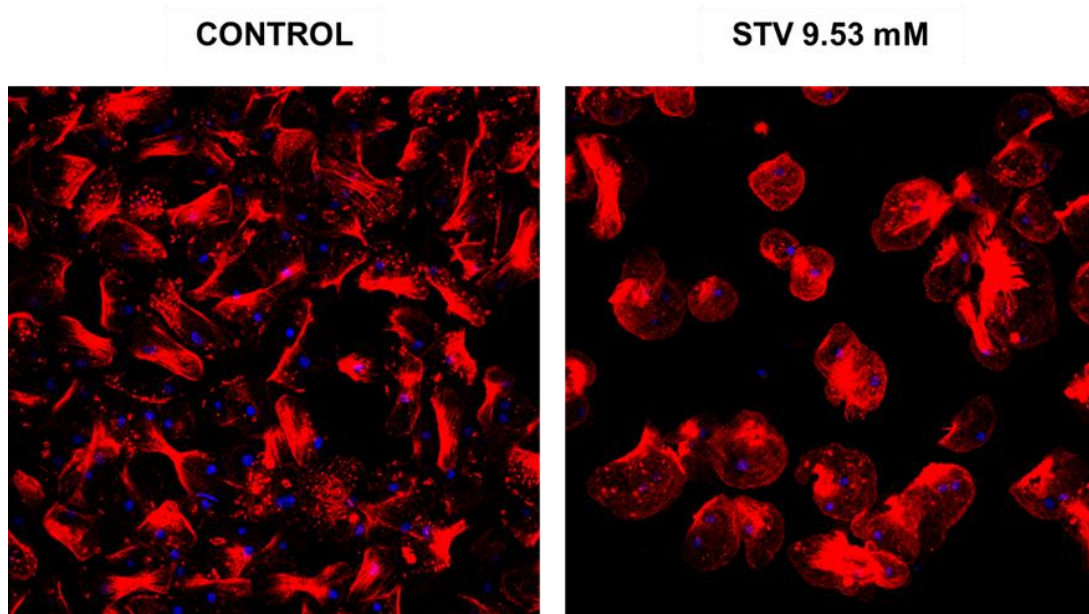


Figura 9. Efecto del esteviósido sobre el citoesqueleto de actina de *E. histolytica*. Los trofozoítos tratados durante 24 h con STV se tiñeron con faloidina rodaminada (Rojo) y los núcleos se contratiñeron con hoechst (Azul). En el control observamos estructuras características del citoesqueleto de actina como fibras de estrés, puntos de nucleación y formación de anillos contráctiles. Los trofozoítos tratados con esteviósido STV mostraron una menor formación de estructuras características del citoesqueleto como las fibras de estrés.

7.5 Evaluación de factores de virulencia de trofozoítos tratados con esteviósido.

7.5.1 Actividad proteolítica.

Se sabe que, durante diversas condiciones de estrés, los trofozoítos pueden llegar a exhibir cambios bioquímicos indicadores del daño sufrido, lo cual puede disminuir o aumentar la capacidad de virulencia de la amiba. Debido a los resultados obtenidos mediante MET y el análisis del citoesqueleto de actina, se consideró la posibilidad de que la amiba pudiera estar perdiendo su virulencia cuando es tratada con STV, por lo que se realizó un análisis sobre la actividad proteolítica que presenta este parásito a partir de la obtención de extractos crudos en condiciones de crecimiento normales y con tratamiento.

Primeramente, con la finalidad de verificar la integridad de los extractos obtenidos, se obtuvo un perfil de proteína, en el que se identificó un patrón diferencial entre los trofozoítos tratados y el control. Estas bandas diferenciales se encuentran aproximadamente en un peso molecular de 55, 49, 39,35 y 29 kDa, como se observa en la figura 10.

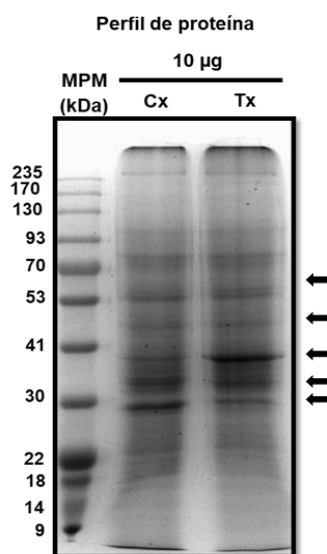


Figura 10. Perfil de proteína de trofozoítos control (Cx) y tratados (Tx) con 9.53 mM de STV por 24 h. Se observó la expresión diferencial de 5 bandas en los extractos obtenidos de los trofozoítos tratados con pesos moleculares de 55, 49, 39,35 y 29 kDa (flechas).

Posteriormente se realizaron geles de poliacrilamida co-polimerizados con gelatina de piel porcina para evaluar la actividad proteolítica, la cual es evidenciada mediante la presencia de diferentes cisteín proteasas (CP's). Se realizaron zimogramas con el medio de cultivo condicionado tanto de control como de tratamiento, para de esta manera identificar cambios en la secreción de proteasas en ambas condiciones. Para todas las condiciones se cargaron 2 µg de proteína total. El medio con suero no mostró ninguna actividad de proteasa, mientras que para los medios condicionados de control y tratamiento se evidenció un ligero aumento de la actividad proteolítica del control, lo que nos indica una mayor secreción de proteasas en el medio. Por otra parte, la actividad proteolítica en ambas condiciones estuvo evidenciada por la presencia de 3 bandas con un peso molecular de 48, 35 y 29 kDa, pesos moleculares correspondientes a CP1, CP2 y CP5 como se muestra en la figura 11, las cuales representan un 90% de la actividad proteolítica de la amiba. El análisis de estas bandas se llevó a cabo mediante la evaluación por densitometría en el programa ImageJ. Se logró detectar una diferencia significativa en la disminución de la capacidad proteolítica de CP1 y CP5 de los trofozoítos tratados con STV, sin embargo, la actividad de CP2 en los trofozoítos tratados no presentó cambios respecto a las amibas control, estos datos fueron evaluados mediante análisis densitométrico de las bandas de degradación presentes en el gel como se muestra en la gráfica 5.

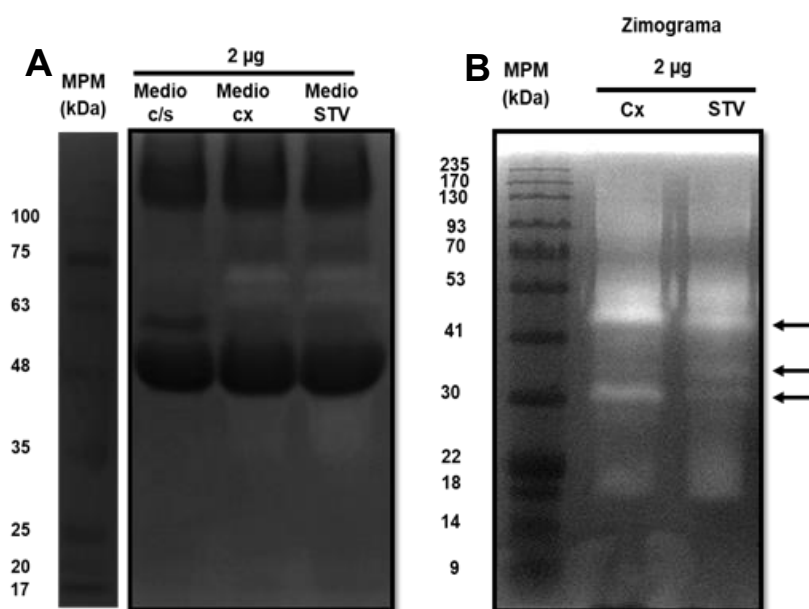
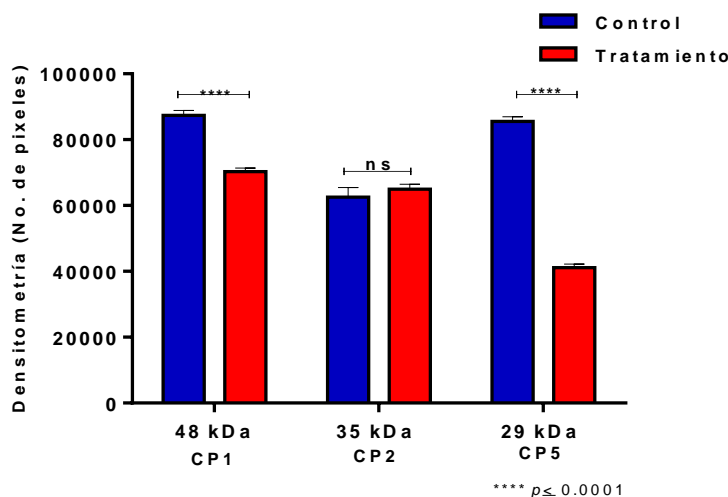


Figura 11. Actividad proteolítica de trofozoítos de *E. histolytica* tratados con esteviósido. A) Zimograma obtenido a partir del medio condicionado de trofozoítos control y tratados con STV. B) Se observa una disminución de la actividad proteolítica de los lisados de la amiba después de ser tratados con 9.53 mM de STV por 24 h. Se observó la actividad proteolítica diferencial de 3 bandas en los extractos obtenidos de los trofozoítos tratados con pesos moleculares de 48, 35 y 29 kDa (flechas).



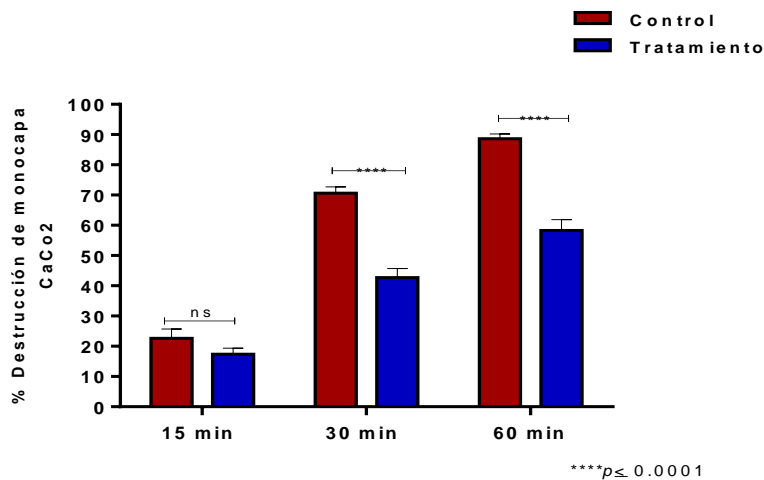
Gráfica 5. Análisis densitométrico de las bandas identificadas mediante la actividad proteolítica detectada en zimogramas. Se observa una disminución significativa en la actividad proteolítica de la CP1 y CP5 con respecto al control. Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. **** $p \leq 0.0001$.

7.5.2 Efecto citopático.

Los trofozoítos de *E. histolytica* viables suelen destruir monocapas celulares, este fenómeno llamado efecto citopático puede ser bloqueado por inhibidores específicos de cisteín proteasas, por lo que al observar una disminución en la actividad proteolítica de los trofozoítos tratados con STV, se decidió realizar un análisis del efecto citopático de estas amibas para evaluar su eficiencia en la destrucción de monocapas.

Utilizando la técnica con azul de metileno, se evaluó la capacidad de destrucción. Los trofozoítos en condición control y tratados con STV durante 24 h, se interaccionaron con una monocapa de células CaCo2 durante 15, 30 y 60 min. Posterior al tiempo de interacción las células fueron teñidas con azul de metileno y se realizó una lisis química con HCl para liberar el colorante, el porcentaje de

destrucción de monocapa fue determinado a partir de la lectura de las absorbancias del azul de metileno. Se observó que los trofozoítos expuestos al STV tienen una menor capacidad de destrucción de monocapa a los 30 y 60 min en comparación con el control, mientras que a los 15 min no se observaron cambios significativos entre las dos condiciones, como se muestra en la gráfica 6. Con estos resultados corroboramos que el tratamiento con STV tiene un efecto sobre la virulencia de *E. histolytica*.



Gráfica 6. Evaluación del Efecto citopático de trofozoítos tratados con STV. Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. **** $p \leq 0.0001$.

Para poder confirmar los datos obtenidos en el porcentaje de destrucción de la monocapa celular, se realizaron tinciones con hematoxilina y eosina de las interacciones de los trofozoítos y las monocapas celulares a 15, 30 y 60 min. De esta manera se logró visualizar las diferencias en el porcentaje de destrucción celular, observando que en la condición control se presentaron mayores áreas de destrucción con respecto al tratamiento; además en el tratamiento se aprecia una menor cantidad de trofozoítos sobre la monocapa celular lo que es congruente con los datos obtenidos mediante la evaluación de la capacidad de adhesión como se observa en la figura 12. Con estos datos, se demostró que el STV al producir una disminución en la actividad proteolítica del parásito, disminuye su capacidad de destrucción de una monocapa celular.

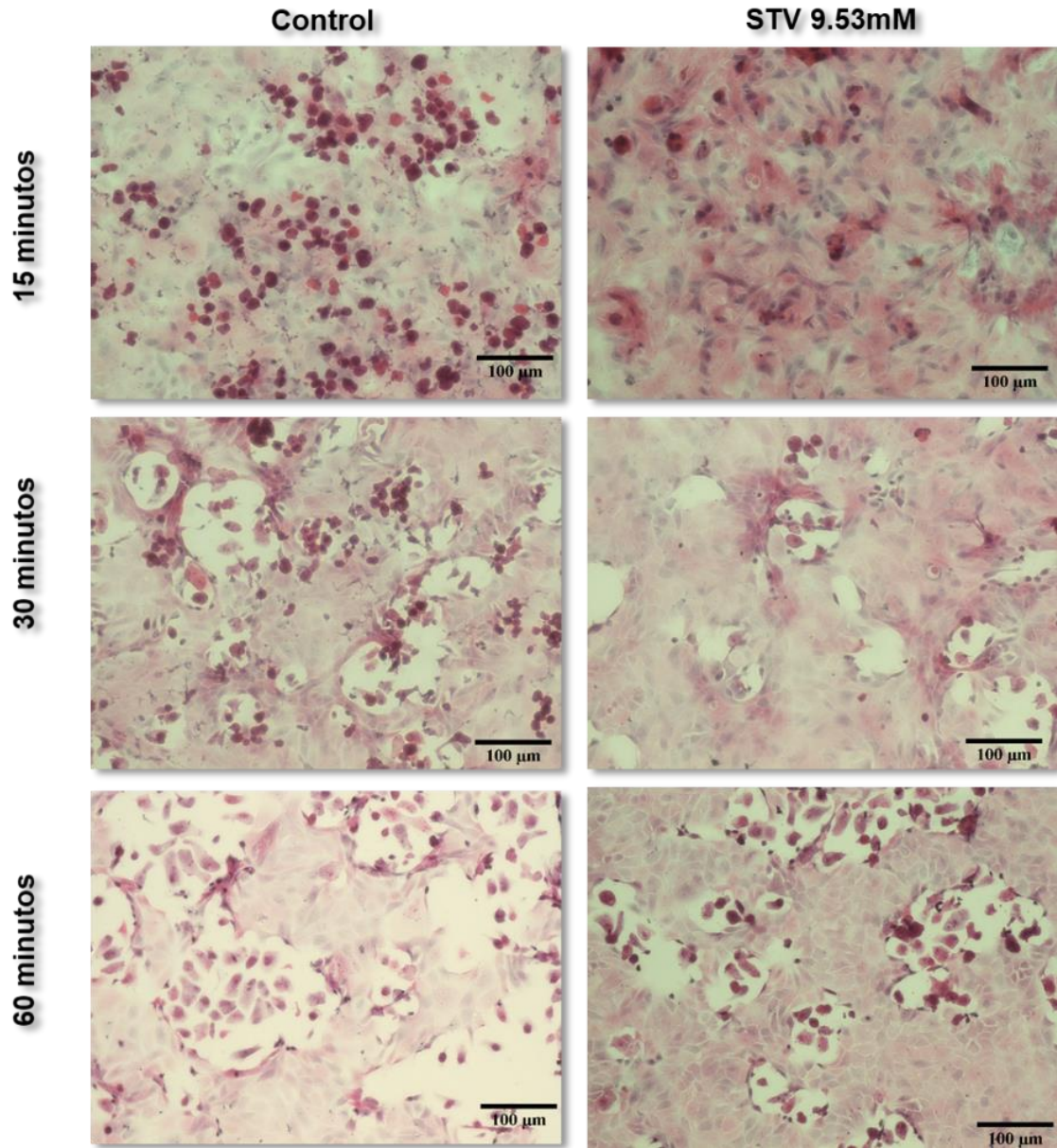


Figura 12. Análisis microscópico del efecto citopático. Se realizó una cinética de 15, 30 y 60 min para evaluar el daño en una monocapa de células CaCo₂, los resultados muestran mayores áreas de destrucción en los controles con respecto al tratamiento.

7.5.3 Expresión de genes.

Para determinar el efecto del STV sobre la expresión de *cp1*, *cp2* y *cp5* de *E. histolytica*, se realizaron ensayos de RT-PCR. Los amplicones esperados para los genes de interés en ambas condiciones son: *actina* 1200 pb, *cp1* 212 pb, *cp2* 177 pb y *cp5* 173 pb. Para este análisis se utilizaron trofozoítos sin tratamiento y tratados con estevósido 9.53 mM durante 24 h. Se realizó la cuantificación relativa de cada uno de los genes a través de un análisis densitométrico de los amplicones visualizados en gel de agarosa al 2% con el software ImageJ, tomando como referencia el gen endógeno (*actina*) los resultados se muestran en la gráfica 7.

Los resultados muestran que en los trofozoítos tratados con STV hay una menor expresión de *cp2* y *cp5* con respecto a los trofozoítos control, a diferencia de la expresión de *cp1*, para la cual no se encontraron cambios con respecto al control como se observa en la figura 13.

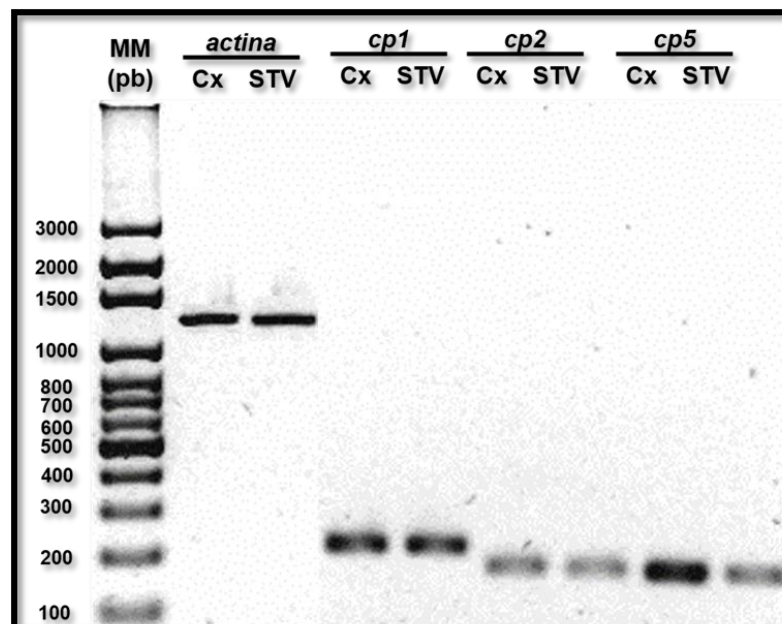
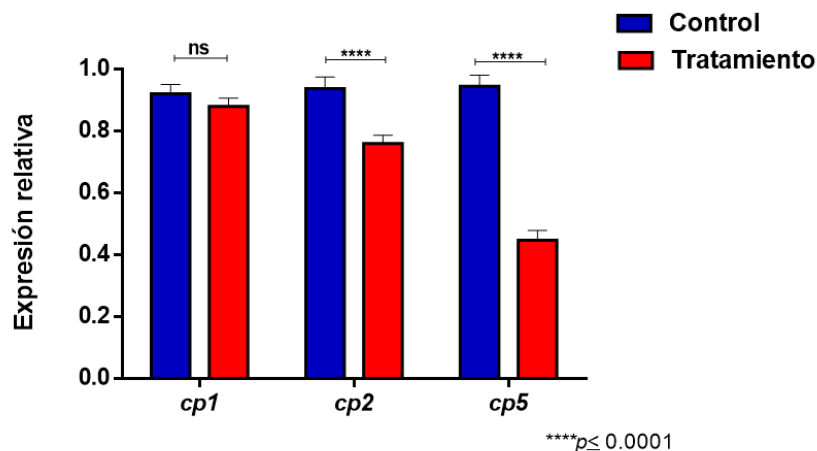


Figura 13. Gel de agarosa al 2%. Se muestran los productos de PCR del control (trofozoítos sin tratamiento) y tratamiento (STV) los tamaños de los amplicones son: (*actina*) carril 1 y 2 (1200 pb), *cp1* (212 pb), *cp2* (177 pb) y *cp5* (173 pb).

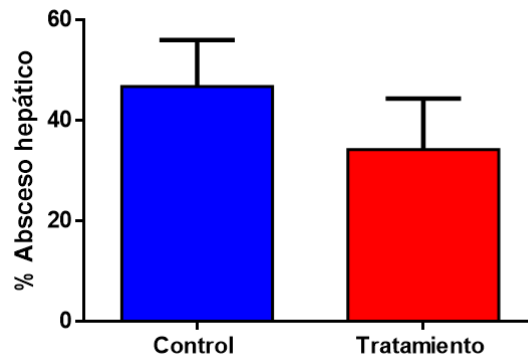


Gráfica 7. Expresión diferencial de genes. Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. **** $p \leq 0.0001$.

7.6 Efecto de la virulencia *in vivo* en el modelo de AHA.

Para determinar el efecto del STV sobre la virulencia de *E. histolytica in vivo*, los trofozoítos se incubaron con este compuesto durante 24 h, después del tiempo de incubación, se inocularon 1×10^6 trofozoítos por vía intrahepática en hámsteres machos de 80 a 100 g de peso. Cada grupo de estudio estuvo integrado por 9 animales. Se permitió el desarrollo del AHA durante 5 días. Los inóculos utilizados fueron: Control (hígado sano), medio condicionado de trofozoítos sin tratamiento, medio condicionado de trofozoítos con tratamiento, trofozoítos control (sin tratamiento) y trofozoítos tratados con STV. Se realizó el análisis macroscópico de las diferentes condiciones evaluadas, para el caso del hígado control, observamos un hígado con características normales en todos los lóbulos, tamaño, color y consistencia, las muestras tratadas con medio condicionado en ambas condiciones (control y tratamiento) mostraron condiciones macroscópicas características de un hígado normal. Por otra parte, el análisis macroscópico en los hígados tratados con trofozoítos sin tratamiento (control) desarrollaron AHA con un promedio del 42% de daño hepático, las cuales se observaron desde la cara diafragmática hasta la cara visceral. Los trofozoítos tratados con STV desarrollaron un AHA con un promedio del 35% de daño hepático, estas lesiones al igual que en los trofozoítos no tratados se pudieron observar tanto en la cara visceral como en la cara diafragmática, como

se observa en la figura 14. Los porcentajes de lesión se determinaron a partir del registro del peso del hígado total y la obtención del fragmento de la lesión, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las lesiones producidas por los trofozoítos con STV con respecto a los trofozoítos control, como se muestra en la gráfica 8.



Gráfica 8. Porcentaje de AHA. El porcentaje se determinó a partir del peso de la lesión respecto al peso total del hígado. El histograma muestra el promedio del porcentaje de daño hepático de cada grupo. Las barras indican la desviación estándar.

De los hígados disectados para todas las condiciones se tomaron fragmentos representativos del daño para analizar su histopatología. En la condición de hígado sano observamos un parénquima característico, con la presencia de una vena centrolobulillar (VC) y un espacio porta (EP) rodeado por cordones de hepatocitos y sinusoides sin ninguna alteración a nivel histológico. En cuanto a las muestras de los dos medios condicionados la arquitectura celular es la clásica de un tejido hepático sano, identificamos un espacio porta (EP). Por otra parte, observamos en las lesiones generadas por trofozoítos no tratados (control), la formación de granulomas (G) bien definidos y delimitados por células epitelioides en forma de empalizada, rodeados por zonas necróticas (N) extendidas en gran parte del parénquima hepático, así como la presencia de respuesta inflamatoria (RI) y trofozoítos en la periferia de las lesiones granulomatosas. En las lesiones producidas por los trofozoítos tratados con STV observamos una fuerte respuesta inflamatoria (RI) acompañada por la formación de múltiples granulomas (G) de menor tamaño delimitados mayormente por células inflamatorias, no se observa una

empalizada típica de granuloma, los trofozoítos presentes en las zonas de lesión se presentaron en menor cantidad con respecto a los observados en la condición control como se observa en la figura 14.

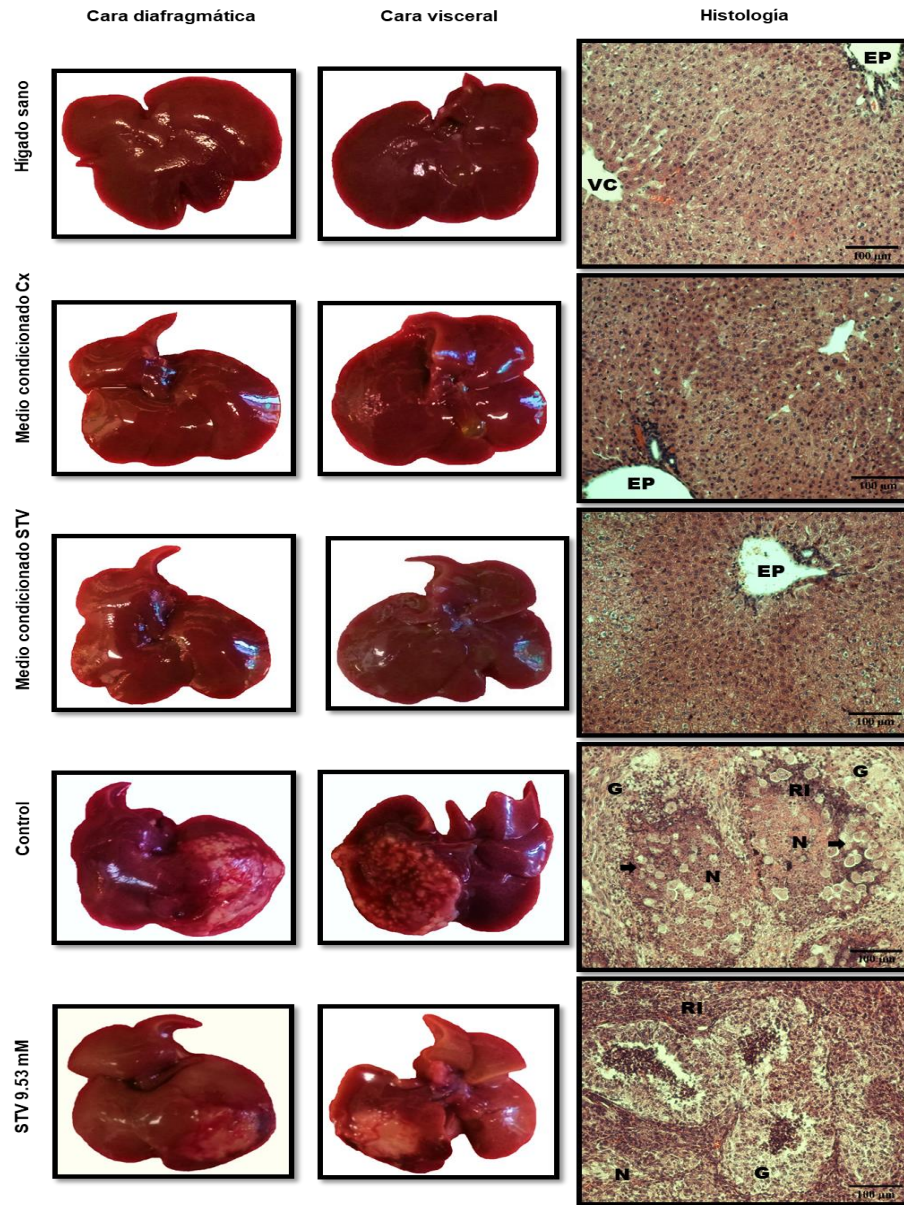


Figura 14. Evaluación del desarrollo del AHA. Se muestra el análisis macroscópico y microscópico realizado para las condiciones: hígado sano, medio condicionado (control y tratamiento), trofozoítos sin tratamiento (control) y trofozoítos tratados con STV.

VIII.- DISCUSIÓN

Las plantas han representado una fuente importante para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de algunos agentes parasitarios e infecciosos. Diferentes estudios han reportado la efectividad antiamebiana de diversos extractos y moléculas específicas como flavonoides, terpenos y tiofenos (Velázquez-Domínguez *et al.*, 2013; Herrera-Martínez *et al.*, 2016; Pais-Morales *et al.*, 2016). En la actualidad algunas de las moléculas con actividad antiamebiana, han sido aisladas de distintos miembros de la familia *Asteraceae* (*Compositae*), utilizadas principalmente en el tratamiento de diarrea, laringitis y dolor corporal, de las cuales sus principales metabolitos activos se encuentran constituidos por flavonoides y terpenos, siendo estos, los posibles involucrados en los efectos benéficos (Calzada *et al.*, 2009b). *Stevia rebaudiana* es una planta perteneciente a la familia de las *Asteraceae*, entre sus principales compuestos se encuentran los glucósidos diterpénicos de los cuales el STV y el rebaudiósido A representan los compuestos de mayor contenido en las hojas de esta planta (Gupta *et al.*, 2017). Actualmente han sido reportados diversos análisis sobre los efectos del STV, entre los que se ha encontrado una variedad de beneficios y su participación como antiinflamatorio, antihipertensivo, antitumoral y antiviral (Fengyang *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2012; López *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2017), sin embargo; hasta el momento no ha sido descrito su efecto como antiparasitario. Las concentraciones de STV probadas en estos estudios fueron de concentraciones μM a mM , las cuales han presentado diferentes resultados dependiendo de la línea celular utilizada. Se ha demostrado el STV puede inducir apoptosis en diversas líneas celulares mediante la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que ha sido evidenciado mediante cambios morfológicos en la célula principalmente basados en el tamaño y la forma, externalización de fosfatidil serina y la fragmentación de núcleos. Nuestros resultados revelaron que las amibas expuestas a concentraciones μM de STV no presentan una afectación en su viabilidad, mientras que al incubar trofozoítos con diferentes concentraciones mM , éstas mostraron un efecto diverso dependiente de la dosis y el tiempo de incubación. Al

determinar la IC₅₀, los trofozoítos expuestos al STV presentaron algunos cambios morfológicos ya que estos trofozoítos emitieron una menor cantidad de pseudópodos y filopodios, estructuras asociadas a la capacidad de la amiba para moverse e invadir, sin embargo, estas amibas no mostraron cambios en el tamaño y la forma asociados a una muerte celular por apoptosis. Por otra parte, el análisis mediante microscopia electrónica de transmisión mostró cambios ultraestructurales interesantes como la pérdida de regularidad de la membrana, aumento de la granularidad, disminución en el número de vacuolas y producción de vacuolas con contenido granular, membranal y citoplásmico. Los efectos a nivel ultraestructural observados con este tratamiento, han sido reportados previamente para diversas moléculas probadas como amebicidas, tal es el caso del sesquiterpeno linearolactona, en donde se observaron cambios a nivel ultraestructural evidenciados por el aumento de depósitos de glucógeno y vacuolas con mayor contenido granular lo cual podría estar asociado a la inhibición del metabolismo del glucógeno (Velázquez-Domínguez *et al.*, 2013). Este daño también fue evidenciado mediante el uso del resveratrol en donde los trofozoítos tratados con este flavonoide mostraron menos vacuolas citoplasmáticas, pero con un gran número de vacuolas con residuos, presentaron mayor granularidad y electrodensidad en el citoplasma, sugiriendo que estos trofozoítos se encuentran sometidos a un estrés metabólico y que la presencia de vacuolas con residuos sugiere una posible autofagia, (Pais-Morales *et al.*, 2016). Con base en estos resultados las alteraciones morfológicas y ultraestructurales producidas mediante el tratamiento con STV podrían sugerir una disminución en la capacidad de adherencia resultado de la alteración en el citoesqueleto de actina así como la presencia de autofagia debido al estrés generado en el microambiente de la amiba por la presencia del STV.

El comportamiento invasivo de esta amiba está basado en diferentes actividades, entre las que se encuentran la motilidad, adhesión y lisis celular, por lo que en este contexto, el citoesqueleto rico en actina es responsable de los cambios en diversos procesos fundamentales para la colonización e invasión a la célula blanco, tal es el caso de la adhesión, por lo que su reorganización es crucial en la patogénesis amibiana (Guillén, 1993). La adhesión a la matriz extracelular regula la organización

del citoesqueleto de actina por medio de diversas etapas que van desde la formación de lamelopodios y filopodios en fases tempranas, hasta la formación de adhesiones focales y fibras de estrés en células completamente adheridas (Defilippi *et al.*, 1999). Se ha demostrado que compuestos naturales derivados de plantas medicinales como la epicatequina y el kaempferol pueden desregular proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina, como miosina II y la cortexilina II, dando como resultado la alteración de los mecanismos de invasión (Bolaños *et al.*, 2014, 2015). Además se ha informado que las especies reactivas de oxígeno pueden afectar las funciones del citoesqueleto (Shahi *et al.*, 2016) y que la desregulación de GTPasas de la familia Rho como Rac y Cdc42 podrían alterar la formación de fibras de estrés (Ríos *et al.*, 2008).

Debido a los resultados observados mediante el análisis morfológico y ultraestructural se llevó a cabo el análisis de la capacidad de adhesión de los trofozoítos tratados con STV, los resultados mostraron mayor cantidad de trofozoítos sin tratamiento adheridos a fibronectina a diferencia de los trofozoítos tratados con esteviósido, lo que nos indicó una menor capacidad de estos para adherirse al sustrato. A partir de estos resultados, se evaluaron los cambios en el citoesqueleto de actina generados por el STV, en donde pudimos observar estructuras como fibras de estrés, anillos contráctiles y puntos de nucleación en los trofozoítos control, mientras que los trofozoítos tratados con STV mostraron un aumento en la polimerización de actina sin formación de fibras de estrés y adhesiones focales lo que podría estar asociado a la disminución de la capacidad de adhesión de la amiba ya que como mencionamos anteriormente estas estructuras son características de trofozoítos completamente adheridos, así como la ausencia de la formación de anillos contráctiles, lo que sugiere que la división celular podría estar siendo inhibida y como resultado la proliferación celular podría estar siendo afectada, (Herrera-Martínez *et al.*, 2016), en un estudio realizado por (Talamás-Lara *et al.*, 2015), se llevó a cabo un análisis morfológico y molecular del citoesqueleto de actina comparativo entre *E. histolytica* y *E. dispar*, en este estudio se evaluó la capacidad de adhesión en donde se pudo observar que *E. histolytica* se adhiere firmemente a la fibronectina, lo que forma un espacio muy estrecho entre

la unión de la membrana plasmática y el sustrato. Además en *E. histolytica* la actina se encuentra dirigida principalmente hacia el sustrato en forma organizada con estructuras bien definidas como adhesiones focales, mientras que *E. dispar* presenta una irregularidad en la capacidad de adhesión al sustrato, una mayor polimerización de actina distribuida en todo el compartimento citoplásmico sin formación de estructuras presentes en el citoesqueleto de actina de *E. histolytica*, por lo que estas diferencias en la estructuración del citoesqueleto puedan estar relacionadas a la baja capacidad de invasión de esta amiba no patógena. Nuestros resultados confirman que el STV es capaz de afectar el reordenamiento del citoesqueleto de actina evidenciado por el aumento de actina polimerizada, lo que disminuye la capacidad de adhesión de la amiba dando como resultado una menor capacidad de la amiba para causar daño.

Para confirmar si la amiba tratada con STV presentaba una menor capacidad para causar daño, se realizó la evaluación de la actividad proteolítica. Las proteasas de cisteína son enzimas proteolíticas secretadas por la amiba dentro de su microambiente, son factores importantes de virulencia en la patogénesis y se consideran esenciales en la habilidad de este parásito para destruir los tejidos humanos y para degradar distintos componentes de la matriz extracelular como la fibronectina, laminina y colágeno (Que y Reed, 2000; Hellberg *et al.*, 2001; Bruchhaus *et al.*, 2003; Stanley, 2003). Se evaluó la actividad de proteasas a partir de extractos crudos obtenidos a partir de trofozoítos no tratados y tratados con STV, la actividad proteolítica estuvo evidenciada por la presencia principalmente de 3 bandas para ambas condiciones (control y tratados) correspondientes a CP1, CP2 y CP5, se observó una disminución significativa en la actividad proteolítica de CP1 y CP5 en los trofozoítos tratados mientras que la actividad de CP2 no se vio afectada por el tratamiento. En un estudio realizado por (Hellberg *et al.*, 2001), se llevó a cabo el análisis de la sobreexpresión de CP2 en donde observaron que los trofozoítos que sobreexpresan esta cisteín proteasa no presenta diferencias en la eritrofagocitosis, desarrollo de AHA y efecto citopático en comparación con los trofozoítos control, mientras que la expresión de CP1 y CP5 juega un papel importante en su patogenicidad ya que al ser inhibidas el efecto citopático y el

desarrollo del AHA se ve afectado, Por lo que nuestros resultados sugieren que el STV tiene un efecto sobre la virulencia de los trofozoítos mediante la disminución de la actividad de CP1 y CP5.

In vitro, los extractos de *E. histolytica* viables destruyen monocapas de células de mamíferos, como las células de ovario de hámster chino (CHO). Este fenómeno, llamado efecto citopático, puede ser bloqueado por los inhibidores específicos de cisteín proteasas, como el E-64 (Hellberg *et al.*, 2001). Debido a que en los resultados de la actividad proteolítica observamos una disminución en CP1 y CP5 se esperaba una disminución en la capacidad de la amiba para destruir una monocapa de células CaCo2 para confirmar este efecto realizamos una cinética de 15, 30 y 60 min comparando la capacidad de trofozoítos no tratados y tratados con STV, el resultado fue favorable ya que pudimos comprobar que la disminución en la actividad proteolítica de estas CP, presenta un efecto sobre la capacidad de la amiba para destruir monocapas celulares.

Estudios cuantitativos de la expresión de los genes correspondientes a las cisteín proteasas de la amiba han demostrado que la *cp1* es una de las proteinasas de cisteína más expresadas y liberadas en los trofozoítos cultivados, además se determinó esta *cp* puede escindir sustratos fisiológicos como componentes de la respuesta inmunitaria del huésped, en ensayos *in vivo* demostraron que los inhibidores específicos de *c1p* bloquean la invasión en el colon humano (Meléndez-López *et al.*, 2007), otro estudio acerca de la expresión génica de esta *cp* en un modelo de ratón de colitis amebiana, demostró que la expresión de *cp1* aumentó casi dos veces después de la invasión, mientras que la expresión de *cp5*, no lo hizo, (Gilchrist *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en la expresión de genes correspondientes a la cisteín proteasas 1, 2 y 5 en este trabajo fueron evaluados mediante PCR punto final, en donde la expresión relativa fue analizada mediante densitometría, los resultados mostraron una disminución en la expresión de *cp2* y *cp5*, sin embargo, *cp1* no mostró diferencias con respecto al control, estos resultados nos sugieren que el STV afecta la expresión del gen de *cp2* y *cp5* pero

no de *cp1*. Es importante realizar el análisis de RT-qPCR, para confirmar lo anteriormente descrito.

En los ensayos de virulencia *in vivo*, macroscópicamente no se observaron cambios significativos en el tamaño de la lesión generada por los trofozoítos sin tratamiento y tratados con STV. Sin embargo; en los cortes histológicos, observamos que los trofozoítos control mostraron grandes áreas de necrosis, infiltrado inflamatorio y formación de granulomas extendidos en el parénquima hepático, delimitados por células epitelioides en empalizada, mientras que los trofozoítos tratados con esteviósido generaron una mayor respuesta inflamatoria, áreas de necrosis similares al control y una formación de múltiples granulomas de menor tamaño que el control, delimitados principalmente por células inflamatorias y no epitelioides en empalizada. La ventaja de los estudios realizados *in vitro* es que estos son realizados a partir de condiciones simples y controladas, además de que nos permiten llevar a cabo la determinación de moléculas claves en los procesos de daño, sin embargo; esta información no siempre corresponde a los resultados *in vivo* ya que es este es un organismo completo y complejo en el cual influyen otros mecanismos como la respuesta inmune del hospedero. Por lo que es importante realizar más estudios *in vivo* como la estandarización del desarrollo de lesión. El análisis de amibas con diferente virulencia y probar diferentes inóculos, además de administrar el STV a los hámsteres previo a la inoculación de las amibas y durante el desarrollo de la lesión con la finalidad de determinar el efecto del STV sobre el desarrollo del AHA.

IX.-CONCLUSIONES

- ✚ El STV disminuye la viabilidad celular de *E. histolytica* de forma tiempo- dosis dependiente, con una IC₅₀ de 9.53 mM.
- ✚ En el análisis por microscopia electrónica de transmisión los trofozoítos incubados con el esteviósido mostraron cambios en la granularidad citoplásmica, presencia de vacuolas con contenido citoplásmico y membranoso, así como irregularidades en la membrana plasmática.
- ✚ El STV disminuye la capacidad de adhesión de *E. histolytica*, lo que podría estar asociado a los cambios en la restructuración del citoesqueleto de actina observada mediante microscopia confocal.
- ✚ En los experimentos *in vitro* se observó una menor capacidad de los trofozoítos tratados con STV para destruir una monocapa de células CaCo2 en comparación con el control, lo que sugiere que el tratamiento que el afecta su capacidad citotóxica.
- ✚ A pesar de que no se observó una diferencia macroscópica en los AHA generados por trofozoítos sin tratamiento y los tratados con STV, el análisis histopatológico sugiere una disminución en la progresión del daño causado por trofozoítos tratados con STV.

X.-PERSPECTIVAS

- ✚ Determinar el mecanismo de muerte celular causado por el STV.
- ✚ Incluir ensayos de western blot con los anticuerpos anti-proteasas de interés para determinar si los cambios en la actividad proteolítica se deben a la pérdida o disminución de la síntesis de proteína.
- ✚ Evaluar mediante RT-qPCR la expresión de algunos factores de virulencia como amebaporos y cisteín proteasas.
- ✚ Analizar un posible efecto terapéutico del esteviósido mediante su administración a hámsteres con AHA.

XI.-REFERENCIAS

- ✚ Achucarro, C., Ferro, EA, Richer, Y., Salazar, ME, Ciciolli, S., Ortiz, I., y Meza, B. (2011). Evaluación clínica preliminar del efecto antiparasitario de *Stevia rebaudiana* Bertoni (kaa he ê) en adultos y niños. *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas (Asunción)*, 44 (2), 35-46.
- ✚ Alfajaro, M. M. *et al.* (2014) 'Anti-rotavirus effects by combination therapy of stevioside and Sophora flavescens extract.', *Research in veterinary science*, 96(3), pp. 567–75.
- ✚ Ali, I. K. M., Clark, C. G. y Petri, W. A. (2008) 'Molecular epidemiology of amebiasis', *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), pp. 698–707.
- ✚ Anesi, J. A. y Gluckman, S. (2015) 'Amebic liver abscess', *Clinical Liver Disease*. John Wiley & Sons, Ltd, 6(2), pp. 41–43.
- ✚ Ankri, S., Stolarsky, T. y Mirelman, D. (1998) 'Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis.', *Molecular microbiology*, 28(4), pp. 777–85.
- ✚ Barriocanal, L. A. *et al.* (2008) 'Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics.', *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 51(1), pp. 37–41.
- ✚ Beer, M. F. *et al.* (2016) 'Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids isolated from *Stevia satureiifolia* var. *satireiifolia*', *Pharmaceutical Biology*, 54(10), pp. 2188–2195.
- ✚ Begum, S., Quach, J. y Chadee, K. (2015) 'Immune Evasion Mechanisms of *Entamoeba histolytica*: Progression to Disease.', *Frontiers in microbiology*, 6, p. 1394.
- ✚ Betanzos, A. *et al.* (2013) 'The EhCPADH112 Complex of *Entamoeba histolytica* Interacts with Tight Junction Proteins Occludin and Claudin-1 to Produce Epithelial Damage', *PLoS ONE*. Edited by J. M. Brandner, 8(6), p.

e65100.

- ✚ Bolaños, V. *et al.* (2014) 'The flavonoid (-)-epicatechin affects cytoskeleton proteins and functions in *Entamoeba histolytica*.' , *Journal of proteomics*, 111, pp. 74–85.
- ✚ Bolaños, V. *et al.* (2015) 'Kaempferol inhibits *Entamoeba histolytica* growth by altering cytoskeletal functions', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 204(1), pp. 16–25.
- ✚ Boonkaewwan, C. y Burodom, A. (2013) 'Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stevioside and steviol on colonic epithelial cells.' , *Journal of the science of food and agriculture*, 93(15), pp. 3820–5.
- ✚ Brahmachari, G. *et al.* (2011) 'Stevioside and related compounds - molecules of pharmaceutical promise: a critical overview.' , *Archiv der Pharmazie*, 344(1), pp. 5–19.
- ✚ Brandle, J.E. y Telmer, P. G. (2007) 'Steviol glycoside biosynthesis', *Phytochemistry*, 68(14), pp. 1855–1863.
- ✚ Bruchhaus, I. *et al.* (2003) 'The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during *in vitro* cultivation.' , *Eukaryotic cell*, 2(3), pp. 501–9.
- ✚ Calzada, F. *et al.* (2009) 'Antiprotozoal and Antibacterial Properties of *Decachaeta Incompta*' , *Revista Latinoamericana de Química*.37. 97-103.
- ✚ Campos-Peralta J; Sánchez, V y D´Artagnan J., (2011) *Entamoeba histolytica* and it´s cell /parasite relationship. Vol. 31:2; 63-70.
- ✚ Carakostas, M. C. *et al.* (2008) 'Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages.' , *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 46 Suppl 7, pp. S1–S10.
- ✚ Casas-Grajales, S. *et al.* (2019) 'Antioxidant and immunomodulatory activity induced by stevioside in liver damage: *In vivo*, *in vitro* and *in silico* assays', *Life Sciences*, 224, pp. 187–196.
- ✚ Chan, P. *et al.* (2001) 'A double-blind placebo-controlled study of the

- effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 50(3), pp. 215–220.
- ✚ Chávez-Munguía, B. *et al.* (2008) 'Entamoeba histolytica: Fibrillar aggregates in dividing trophozoites', *Experimental Parasitology*, 118(2), pp. 280–284.
 - ✚ Chávez, B y González, A. *Entamoeba histolytica*: la estructura interna de un destructor por naturaleza. 2013. *Ciencia*, 64 (2), 42-49.
 - ✚ Defilippi, P. *et al.* (1999) "Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion", *Microscopy Research and Technique*. John Wiley & Sons, Ltd, 47(1), pp. 67–78.
 - ✚ Espinosa-Cantellano, M. y Martínez-Palomo, A. (2000) 'Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease.', *Clinical microbiology reviews*, 13(2), pp. 318–31.
 - ✚ Fengyang, L. *et al.* (2012) 'Stevioside suppressed inflammatory cytokine secretion by downregulation of NF-κB and MAPK signaling pathways in LPS-stimulated RAW264.7 cells.', *Inflammation*, 35(5), pp. 1669–75.
 - ✚ Ferrazzano, G. F. *et al.* (2015) 'Is *Stevia rebaudiana* Bertoni a Non Cariogenic Sweetener? A Review.', *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(1), p. E38.
 - ✚ Frederick, J. R., y Petri, W. A. (2005). Roles for the galactose-/N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba* in parasite virulence and differentiation. *Glycobiology*, 15(12), 53–59.
 - ✚ García-Rivera, G. *et al.* (1999) 'Entamoeba histolytica: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein.', *Molecular microbiology*, 33(3), pp. 556–68.
 - ✚ García-Zepeda, E. A. *et al.* (2007) 'Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis', *Parasite Immunology*, 29(12), pp. 679–684.
 - ✚ Geuns, J. M. C. (2003) 'Stevioside.', *Phytochemistry*, 64(5), pp. 913–21.
 - ✚ Ghanta, S. *et al.* (2007) 'Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a natural sweetener.', *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(26), pp. 10962–7..
 - ✚ Gilchrist, C. A. *et al.* (2006) 'Impact of intestinal colonization and invasion on

- the *Entamoeba histolytica* transcriptome', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 147(2), pp. 163–176.
- ✚ Guerrant, R. L. *et al.* (2001) 'Practice guidelines for the management of infectious diarrhea.', *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(3), pp. 331–51.
 - ✚ Guillén, N. (1993) 'Cell signalling and motility in *Entamoeba histolytica*', *Parasitology Today*, 9(10), pp. 364–369.
 - ✚ Gupta, E. *et al.* (2017) 'Stevioside and Rebaudioside A – Predominant Ent-Kaurene Diterpene Glycosides of Therapeutic Potential: a Review', *Czech Journal of Food Sciences*, 34(No. 4), pp. 281–299.
 - ✚ Haque, R., Mollah, N. U., Ali, I. K. M., Alam, K., Eubanks, A., Lyerly, D., & Petri, W. A. (2000). Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *Journal of clinical microbiology*, 38(9), 3235-3239.
 - ✚ Haque, R. *et al.* (2003) 'Amebiasis', *New England Journal of Medicine*, 348(16), pp. 1565–1573.
 - ✚ Hellberg, A. *et al.* (2001) 'Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils.', *Cellular microbiology*, 3(1), pp. 13–20.
 - ✚ Herrera-Martínez, M. *et al.* (2016) 'Antiamoebic Activity of *Adenophyllum aurantium* (L.) Strother and Its Effect on the Actin Cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*', *Frontiers in Pharmacology*, 07.
 - ✚ Hossain, F. *et al.* (2017) 'Cultivation and uses of stevia (*Stevia rebaudiana bertonii*): A review', *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 17(04), pp. 12745–12757.
 - ✚ Jacobs, T. *et al.* (1998) 'Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*.' , *Molecular microbiology*, 27(2), pp. 269–76.

- ✚ Kisson-Singh, V., Mortimer, L. y Chadee, K. (2011) 'Entamoeba histolytica cathepsin-like enzymes: interactions with the host gut.', *Advances in experimental medicine and biology*, 712, pp. 62–83.
- ✚ Kumar, H. et al. (2012) 'A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni)', *Gene*, 492(1), pp. 276–284.
- ✚ Lange, B. M. et al. (2000) 'Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24), pp. 13172–7.
- ✚ Lee, C. N. et al. (2001) 'Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension.', *Planta medica*, 67(9), pp. 796–9..
- ✚ Leippe, M. (1997) 'Amoebapores.', *Parasitology today* (Personal ed.), 13(5), pp. 178–83.
- ✚ Leippe, M. et al. (2005) 'Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A.', *Trends in parasitology*, 21(1), pp. 5–7.
- ✚ Lemus-Mondaca, R. et al. (2012) '*Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects', *Food Chemistry*, 132(3), pp. 1121–1132.
- ✚ León, P. y García, A. (2007) 'La síntesis de isoprenos a través de la vía MEP; un nuevo blanco de manipulación para la salud y el beneficio humano', *Mensaje Bioquímico*.
- ✚ López, Quiroz y Pinilla (2008) 'Diagnóstico de amebiasis intestinal y extraintestinal Diagnosis of intestinal and extraintestinal amebiasis', *Acta Med Colomb*, 33(2), 75–83.
- ✚ López, V. et al. (2016) '*Stevia rebaudiana* ethanolic extract exerts better antioxidant properties and antiproliferative effects in tumour cells than its diterpene glycoside stevioside', *Food & Function*, 7(4), pp. 2107–2113.
- ✚ MacFarlane, R. C., Shah, P. H. y Singh, U. (2005) 'Transcriptional profiling of *Entamoeba histolytica* trophozoites', *International Journal for Parasitology*, 35(5), pp. 533–542.
- ✚ Marie, C. y Petri, W. A. (2013) 'Amoebic dysentery.', *BMJ clinical evidence*.

BMJ Publishing Group, 2013.

- ✚ Marie, C. y Petri, W. A. (2014) 'Regulation of Virulence of *Entamoeba histolytica*', *Annual Review of Microbiology*, 68(1), pp. 493–520.
- ✚ Martínez-Castillo, M. et al. (2018) 'Flavonoids as a Natural Treatment Against *Entamoeba histolytica*.'', *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, p. 209.
- ✚ Meléndez-López, S. G. et al. (2007) 'Use of Recombinant *Entamoeba histolytica* Cysteine Proteinase 1 To Identify a Potent Inhibitor of Amebic Invasion in a Human Colonic Model', *Eukaryotic Cell*, 6(7), pp. 1130–1136.
- ✚ Meza, I., Talamás-Rohana, P. y Vargas, M. A. (2006) 'The Cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: Structure, Function, and Regulation by Signaling Pathways', *Archives of Medical Research*, 37(2), pp. 234–243.
- ✚ Molina-Calle, M., Priego-Capote, F. y Luque de Castro, M. D. (2017) 'Characterization of Stevia leaves by LC–QTOF MS/MS analysis of polar and non-polar extracts', *Food Chemistry*, 219, pp. 329–338.
- ✚ Moncada, D. et al. (2006) 'Antisense Inhibition of *Entamoeba histolytica* Cysteine Proteases Inhibits Colonic Mucus Degradation', *Gastroenterology*, 130(3), pp. 721–730.
- ✚ Moselhy, S. S., Ghoneim, M. A. y Khan, J. A. (2016) '*In vitro* and *in vivo* evaluation of antimicrobial and antioxidant potential of stevia extract', *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 13(6), pp. 18–21.
- ✚ Nunes, A. P. M. et al. (2006) 'Biological effects of stevioside on the survival of *Escherichia coli* strains and plasmid DNA', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 293(1–2), pp. 187–192.
- ✚ Olivos-García, Alfonso., Saavedra, Emma., Nequiz, Mario y Pérez-Tamayo, R. (2011) 'Amibiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica* visión', *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, pp. 10–20.
- ✚ Orozco, E. et al. (1983) '*Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence

- factor.', *The Journal of experimental medicine*, 158(5), pp. 1511–21.
- ✚ Pais-Morales, J. *et al.* (2016) 'Resveratrol Induces Apoptosis-Like Death and Prevents In Vitro and In Vivo Virulence of *Entamoeba histolytica*', *PLOS ONE*. Edited by M. Bogyo, 11(1), p. e0146287.
 - ✚ Paul, S. *et al.* (2012) 'Stevioside Induced ROS-Mediated Apoptosis Through Mitochondrial Pathway in Human Breast Cancer Cell Line MCF-7', *Nutrition and Cancer*, 64(7), pp. 1087–1094.
 - ✚ Pinilla, A. E., López, M. C. y Viasus, D. F. (2008) 'Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*', *Revista médica de Chile*, 136(1).
 - ✚ Pól, J., Hohnová, B. y Hyötyläinen, T. (2007) 'Characterisation of *Stevia Rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry', *Journal of Chromatography A*, 1150(1–2), pp. 85–92.
 - ✚ Potočnjak, I. *et al.* (2017) 'Stevia and stevioside protect against cisplatin nephrotoxicity through inhibition of ERK1/2, STAT3, and NF-κB activation', *Food and Chemical Toxicology*, 107, pp. 215–225.
 - ✚ Prakash, V. y Bhimji, S. S. (2018) *Amebic Liver Abscess*, *StatPearls*.
 - ✚ Puri, M. y Sharma, D. (2011) 'Antibacterial activity of stevioside towards food-borne pathogenic bacteria', *Engineering in Life Sciences*, 11(3), pp. 326–329.
 - ✚ Que, X. y Reed, S. L. (2000) 'Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis', *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2), pp. 196–206.
 - ✚ Ralston, K. S. y Petri, W. A. (2011) 'Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*', *Trends in Parasitology*, 27(6), pp. 254–263.
 - ✚ Ramos-Tovar, E. *et al.* (2018) '*Stevia rebaudiana* tea prevents experimental cirrhosis via regulation of NF-κB, Nrf2, transforming growth factor beta, Smad7, and hepatic stellate cell activation', *Phytotherapy Research*, 32(12), pp. 2568–2576.
 - ✚ Ramos-Tovar, E. *et al.* (2019) 'An aqueous extract of *Stevia rebaudiana* variety Morita II prevents liver damage in a rat model of cirrhosis that mimics the human disease', *Annals of Hepatology*, 18(3), pp. 472–479.
 - ✚ Ramos-Tovar, E. y Muriel, P. (2017) '*Stevia* as a Putative Hepatoprotector',

in *Liver Pathophysiology*. Elsevier, pp. 715–727..

- ✚ Ren, H.-P. *et al.* (2017) 'Stevioside induced cytotoxicity in colon cancer cells via reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase signaling pathways-mediated apoptosis', *Oncology Letters*, 13(4), pp. 2337–2343.
- ✚ Ríos, A. *et al.* (2008) 'Participation of Rho, ROCK-2, and GAP activities during actin microfilament rearrangements in *Entamoeba histolytica* induced by fibronectin signaling', *Cell Biology International*.
- ✚ Rizzo, B. *et al.* (2013) 'Steviol Glycosides Modulate Glucose Transport in Different Cell Types', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, pp. 1–11.
- ✚ Rojas, E. *et al.* (2018) '*Stevia rebaudiana* Bertoni and Its Effects in Human Disease: Emphasizing Its Role in Inflammation, Atherosclerosis and Metabolic Syndrome', *Current Nutrition Reports*, 7(3), pp. 161–170.
- ✚ Rowland, I. *et al.* (2018) 'Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components', *European Journal of Nutrition*, 57(1), pp. 1–24.
- ✚ Saffer, L. D. y Petri, W. A. (1991) 'Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells.', *Infection and immunity*, 59(12), pp. 4681–3.
- ✚ Samuel, P. *et al.* (2018) '*Stevia* Leaf to *Stevia* Sweetener: Exploring Its Science, Benefits, and Future Potential.', *The Journal of nutrition*, 148(7), pp. 1186S-1205S.
- ✚ Sansano, S. *et al.* (2017) '*Stevia rebaudiana* Bertoni effect on the hemolytic potential of *Listeria monocytogenes*', *International Journal of Food Microbiology*, 250, pp. 7–11.
- ✚ Scholze, H. y Schulte, W. (1988) 'On the specificity of a cysteine proteinase from *Entamoeba histolytica*.' , *Biomedica biochimica acta*, 47(2), pp. 115–23.
- ✚ Serrano-Luna, J. *et al.* (2013) 'Proteases from *Entamoeba spp.* and Pathogenic Free-Living Amoebae as Virulence Factors', *Journal of Tropical Medicine*, 2013, pp. 1–32.
- ✚ Shahi, P. *et al.* (2016) 'Proteomic Identification of Oxidized Proteins in *Entamoeba histolytica* by Resin-Assisted Capture: Insights into the Role of

- Arginase in Resistance to Oxidative Stress', *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Edited by A. Acosta-Serrano, 10(1), p. e0004340.
- # Shibayama, M y Tsutsumi, V. Patología de la amibiasis: factores y causas. 2013. *Ciencia*. 64 (2): 34-41.
 - # Shirley, D.-A. T. *et al.* (2018) 'A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis', *Open Forum Infectious Diseases*, 5(7).
 - # Sisson, G. *et al.* (2000) 'Metronidazole activation is mutagenic and causes DNA fragmentation in *Helicobacter pylori* and in *Escherichia coli* containing a cloned H. pylori RdxA(+) (Nitroreductase) gene.', *Journal of bacteriology*, 182(18), pp. 5091–6.
 - # Stanley, S. L. (2003) 'Amoebiasis.', *Lancet* (London, England), 361(9362), pp. 1025–34.
 - # Stanley, S. L. (2005) 'The *Entamoeba histolytica* genome: something old, something new, something borrowed and sex too?', *Trends in parasitology*, 21(10), pp. 451–3.
 - # Takahashi, K. *et al.* (2012) 'Stevioside enhances apoptosis induced by serum deprivation in PC12 cells', *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(4), pp. 243–249.
 - # Takahashi, K. *et al.* (2001) 'Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*', *Antiviral Research*, 49(1), pp. 15–24.
 - # Takasaki, M. *et al.* (2009) 'Cancer preventive agents. Part 8: Chemopreventive effects of stevioside and related compounds.', *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(2), pp. 600–5.
 - # Talamás-Lara, D. *et al.* (2015) 'Cell-matrix interactions of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. A comparative study by electron-, atomic force- and confocal microscopy', *Experimental Cell Research*, 337(2), pp. 226–233.
 - # Talamás-Rohana, P. *et al.* (1995) 'T-cell suppression and selective *in vivo* activation of TH2 subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220-kilodalton lectin.', *Infection and immunity*, 63(10), pp. 3953–8.
 - # Tannich, E., Mirelman, D. y Petri, W. A. (2003) 'Meeting report: EMBO

- workshop “Pathogenesis of amoebiasis: from genomics to disease”, Institut Pasteur, Paris, May 19-22, 2003.’, *Protist*, 154(3–4), pp. 293–8.
- ✚ Tanyuksel, M. y Petri, W. A. (2003) ‘Laboratory Diagnosis of Amebiasis’, *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), pp. 713–729.
 - ✚ Tay, J., Gutiérrez, M., Lara, R., y Velasco, O. (2003). Entamoebosis o Amibiasis en Parasitología Médica (63-79). México. D.F.: Méndez Editores.
 - ✚ Tona, L. *et al.* (1998) ‘Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants.’, *Journal of ethnopharmacology*, 61(1), pp. 57–65.
 - ✚ Totté, N. *et al.* (2000) ‘Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway’, *Tetrahedron Letters*, 41(33), pp. 6407–6410.
 - ✚ Trejos-Suárez, J. y Castaño-Osorio, J. C. (2009) ‘Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*’, *Infectio*, 13(2), pp. 100–110.
 - ✚ Tsutsumi, V. *et al.* (1984) ‘Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation.’, *The American journal of pathology*, 117(1), pp. 81–91.
 - ✚ Tsutsumi, V. *et al.* (1992) ‘*Entamoeba histolytica*: erythrophagocytosis, collagenolysis, and liver abscess production as virulence markers.’, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(2), pp. 170–2.
 - ✚ Tsutsumi, V y Chávez, B. Morfología de *Entamoeba histolytica*. Amibiasis una perspectiva actual. 2002. Cap.12. 21-39.
 - ✚ Tsutsumi, V. y Shibayama, M. (2006) ‘Experimental amoebiasis: a selected review of some in vivo models.’, *Archives of medical research*, 37(2), pp. 210–20.
 - ✚ Velázquez-Domínguez, J. *et al.* (2013) ‘Effect of the sesquiterpene lactone incomptine A in the energy metabolism of *Entamoeba histolytica*.’, *Experimental parasitology*, 135(3), pp. 503–10.
 - ✚ Voigt, H. y Guillén, N. (1999) ‘New insights into the role of the cytoskeleton in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*.’, *Cellular microbiology*, 1(3), pp. 195–203.

- ✚ Wang, T. *et al.* (2014) 'Stevioside plays an anti-inflammatory role by regulating the NF- κ B and MAPK pathways in *S. aureus*-infected mouse mammary glands.', *Inflammation*, 37(5), pp. 1837–46.
- ✚ Wheeler, A. *et al.* (2008) 'Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men.', *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 46 Suppl 7, pp. S54-60.
- ✚ Winkelmann, J., Leippe, M. y Bruhn, H. (2006) 'A novel saposin-like protein of *Entamoeba histolytica* with membrane-fusogenic activity.', *Molecular and biochemical parasitology*, 147(1), pp. 85–94.
- ✚ Ximénez C; Morán P; Ramos F y Ramiro M; (2007). Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Medicina interna de Mexico*. Vol. 35:5; 398-407.
- ✚ Yadav, S. K. y Guleria, P. (2012) 'Steviol glycosides from *Stevia*: biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine.', *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(11), pp. 988–98.