



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

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS  
MOLECULAR

## **Resveratrol: Un nuevo amebicida**

**Tesis que presenta**

**M. en C. Jonnatan Pais Morales**

**Para obtener el grado de**

**Doctor en Ciencias**

**Directora de Tesis:** Dra. María Esther Orozco Orozco

México, D.F.

Enero 2016

## Agradecimientos al CONACYT

Quiero agradecer por el apoyo brindado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través de una beca para la realización de estudios de doctorado (becario No. 226952)

**Tutora de esta tesis:**

Dra. Esther Orozco Orozco. DIPM, CINVESTAV-IPN

**Grupo asesor de esta tesis:**

Dra. Abigail Betanzos Fernández. DIPM, CINVESTAV-IPN

Dra. María Esther Ramírez Moreno, PIBM, ENMyH-IPN

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez. DIPM, CINVESTAV-IPN

Dr. Fidel de la Cruz Hernández-Hernández. DIPM, CINVESTAV-IPN

Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas. Química, CINVESTAV-IPN

## Agradecimientos

Al **CINVESTAV-IPN** por las facilidades otorgadas para realizar el presente trabajo.

Al personal de los laboratorios centrales del CINVESTAV-IPN por su apoyo con los experimentos de citometría de flujo: **M. en C. Víctor Hugo Rosales**

A los auxiliares del departamento de infectómica y patogénesis molecular por su ayuda en el microscopio confocal.

**Dra. Verónica Ivonne Hernández Ramírez**

**Biol. Ma. Magdalena Miranda Sánchez**

**Q.B.P. Carlos Vázquez Calzada**

A los auxiliares del laboratorio 2 del departamento de infectómica y patogénesis molecular por su ayuda en este trabajo. .

**QBP. Tomas Sánchez Maldonado.**

**Dra. Guillermina García Rivera.**

A la asistencia técnica de **Alejandrina Reyes Vivar.**

A la asistencia secretarial de **Rocío Guerrero García**

## **Agradecimiento Personales**

A mi directora de Tesis por haber sido guía en este trabajo, compartiendo conocimientos, experiencia y porque dedicó gran parte de su valioso tiempo para revisar y apoyar este proyecto.

A mis asesores por su apoyo, sugerencias y paciencia que me brindaron.

Al Dr. Mario Albero Rodríguez por su ayuda y por sus consejos.

A Guillermina García por todas las facilidades y disposición para proporcionarme reactivos y material, sobre todo por su conocimiento y amistad compartida.

A Doña Ale por su trabajo invaluable que realiza, por su amistad que me brindo y por consentirme.

A Rocío Guerrero por su amistad, ayuda y confianza.

A Tomás Sánchez por su ayuda y alegrar el lab con sus travesuras.

A la Dra. Abigail Betanzos por sus consejos y ayuda.

A mis padres por apoyarme en todo momento y confianza que han depositado en mí.

A mis amigos del laboratorio 2 del DIPM del CINVESTAV: Elizabeth Nava, Jeni Bolaños, Patricia Cuellar, Jessica Borbolla, Yunuén Avalos, Rosario Javier, Ausencio Galindo, Sarita Motaño, Silvia Castellanos. Y a los de la vieja generación jajajaja ..... Israel López, Cecilia Bañuelos, Eduardo Flores y Ma. Esther Herrera.

A Alicia López quien me ayuda, me da consejos, es paciente con migo y me otorga su confianza, cariño.

A Mercedes Calixto por su ayuda, apoyo, confianza y travesuras, pero sobre todo por su amistad.

A Mayra Herrera quien me ayudo en los experimentos de enquistamiento y compartió charlas científicas y no tan científicas conmigo. Te lo advierto.

A Mario Nequiz por proporcionarme amibas virulentas.

A Daniel León, por ayudarme en la medición del calcio intracelular

# Índice

<b>1. Introducción</b> .....	6
1.1. Clasificación de <i>E. histolytica</i> .....	6
1.2. Epidemiología de la amebiasis .....	8
1.3. Morfología de <i>E. histolytica</i> .....	9
1.3.1. Trofozoíto.....	9
1.3.2. Prequiste.....	10
1.3.3. Quiste .....	10
1.4. Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i> .....	15
1.5. Patología de la amebiasis .....	18
1.5.1. Amebiasis intestinal .....	18
1.5.2. Amebiasis hepática.....	18
1.6. Factores del hospedero que interactúan en la defensa contra la amebiasis .....	24
1.6.1. Respuesta inmune innata .....	24
1.6.2. Respuesta inmune humoral .....	27
1.6.3. Respuesta inmune celular.....	28
1.7. Tratamiento y control contra la amebiasis .....	30
1.7.1. Emetina .....	31
1.7.2. Metronidazol .....	32
1.8. Identificación de nuevas alternativas para el tratamiento de la amebiasis .....	36
1.9. Estructura química del resveratrol .....	37
1.10. Uso del resveratrol contra diversas enfermedades .....	38
1.10.1. Resveratrol contra enfermedades cardiovasculares.....	39
1.10.2. Resveratrol en el proceso de isquemia/reperfusión.....	40
1.10.3. Uso del resveratrol en diabetes.....	42
1.10.4. Resveratrol para el tratamiento de padecimientos neurológicos .....	43
1.10.5. Resveratrol como compuesto antiinflamatorio.....	44
1.10.6. Resveratrol contra el cáncer .....	46
1.10.7. Resveratrol contra enfermedades infecciosas y parasitarias.....	47
<b>2. Justificación</b> .....	49

<b>3. Hipótesis</b> .....	50
<b>4. Objetivo general</b> .....	51
4.1. Objetivos particulares .....	52
<b>5. Materiales y Métodos</b> .....	53
5.1. Ensayos de citotoxicidad del resveratrol sobre trofozoitos de <i>E. histolytica</i> .....	53
5.2 Estudio morfológico de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	54
5.3. Análisis del tamaño celular y granularidad celular de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> bajo el efecto del resveratrol .....	54
5.4. Microscopia electrónica de transmisión de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	55
5.5. Análisis <i>in silico</i> .....	56
5.6. Obtención de DNA genómico de <i>E. histolytica</i> .....	56
5.7. Diseño de oligonucleótidos para el gen <i>Ehatg8a</i> .....	57
5.8. Clonación del gen <i>Ehatg8a</i> .....	58
5.9. Purificación de los plásmidos .....	58
5.10 Digestión enzimática del gen <i>Ehatg8</i> y el plásmido pGEX-6P-1 con las enzimas de restricción <i>EcoR</i> I y <i>BamH</i> I.....	58
5.11. Ligación del gen <i>Ehatg8a</i> en el vector pGEX-6P-1 .....	59
5.12. Preparación de bacterias <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) DH5 $\alpha$ y BL21 (DE3) PLYsS competentes.....	59
5.13. Transformación de <i>E. coli</i> .....	60
5.14. Análisis de restricción del DNA plasmídico recombinante.....	60
5.15. Secuenciación del plásmidos pJET1.2- <i>Ehatg8a</i> .....	61
5.16. Inducción y purificación de la proteína recombinante GST- <i>EhAtg8</i> .....	61
5.17. Inmunodetección .....	61
5.18. Prueba de solubilidad de la proteína recombinante .....	62
5.19. Purificación de la proteína <i>EhAtg8</i> recombinante .....	62
5.20. Inmunización de ratones BALB/C con la proteína recombinante <i>EhAtg8a</i> -GST63	
5.21. Electrotransferencia de extractos proteicos e inmunodetección de la proteína <i>EhAtg8</i> .....	63

5.22. Inmunolocalización de la proteína <i>EhAtg8</i> en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	65
5.23. Detección de la externalización de fosfatidilserina.....	66
5.24. Ensayo de TUNEL.....	66
5.25. Detección de la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ERO).....	67
5.26. Cuantificación de lípidos peroxidados .....	67
5.27. Cuantificación de Ca <sup>2+</sup> intracelular.....	68
5.28. Actividad de calpains.....	69
5.29. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD).....	70
5.30. Cultivo de la línea celular MDCK .....	70
5.31. Efecto citopático de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	71
5.32. Cinética de eritrofagocitosis de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	71
5.33. Ensayos de virulencia <i>in vivo</i> de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	72
5.34. Estudio del efecto potencial preventivo del resveratrol sobre la formación del absceso hepático amebiano .....	73
5.35. Análisis histopatológico .....	73
5.36. Evaluación de la carga parasitaria.....	75
5.37. Inhibición del enquistamiento de <i>E. invadens</i> .....	75
5.38. Identificación de proteínas blanco del resveratrol en <i>E. histolytica</i> .....	76
5.39. Acoplamiento molecular .....	77
<b>6. Resultados</b> .....	<b>79</b>
6.1. Determinación de la actividad amebicida del resveratrol en trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	79
6.2. Estudio morfológico de <i>E. histolytica</i> durante el tratamiento con resveratrol.....	82
6.3. Análisis estructural de los trofozoítos tratados con resveratrol. ....	90
6.4. Análisis de la generación de especies reactivas de oxígeno por el tratamiento de resveratrol en trofozoítos.....	91
6.5. Análisis <i>in silico</i> de las proteínas del sistema de conjugación Atg8 en <i>E. histolytica</i> .....	98

6.6. Clonación del gen <i>Ehatg8a</i> en el vector pJET1.2 .....	109
6.7. Subclonación del gen <i>Ehatg8a</i> en el vector pGEX-6P-1.....	110
6.8. Inducción de la GST-EhAtg8a recombinante.....	115
6.9. Prueba de solubilidad de la GST-EhAtg8a recombinante .....	115
6.10. Purificación de la proteína recombinante GST-EhAtg8a.....	116
6.11. Producción de anticuerpos policlonales anti-EhAtg8 .....	121
6.12. Inmunodetección de la proteína Atg8 en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> tratados con resveratrol .....	126
6.13. Inmunolocalización de la proteína EhAtg8 en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> tratados con resveratrol.....	127
6.14. Externalización de fosfatidilserina en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> tratados con resveratrol .....	132
6.15. Fragmentación del DNA en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> tratados con resveratrol .....	138
6.16. Determinación del calcio intracelular, la actividad de calpaina y SOD en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> tratados con resveratrol. ....	143
6.17. Efecto citopático de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> sobre monocapas de la línea celular MDCK .....	151
6.18. Eritrofagocitosis de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> tratados con resveratrol	152
6.19. Evaluación del enquistamiento en <i>E. invadens</i> durante el tratamiento con resveratrol .....	152
6.20 Propiedades de virulencia <i>in vivo</i> de los trofozoítos tratados con resveratrol	157
6.21. Actividad amebicida del resveratrol en hámsteres inoculados con trofozoítos virulentos.....	162
6.22. Identificación de blancos moleculares del resveratrol en <i>E. histolytica</i> .....	170
<b>7. Discusión</b> .....	<b>195</b>
<b>8. Conclusiones</b> .....	<b>207</b>
<b>9. Perspectivas</b> .....	<b>208</b>
<b>10. Referencias</b> .....	<b>209</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	7
<b>Tabla 2.</b> Esquema de tratamiento contra la amebiasis.....	35
<b>Tabla 3.</b> Oligonucleótidos para la amplificación del gen Ehatg8a.....	57
<b>Tabla 4.</b> Secuencia de iniciadores para secuenciar el plásmido pJET1.2.....	61
<b>Tabla 5.</b> Sistema de conjugación Atg12 en <i>E. histolytica</i> .....	102
<b>Tabla 6.</b> Análisis densitométrico de los niveles de cambio .....	174

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estadios de <i>E. histolytica</i> .....	14
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> . .....	17
<b>Figura 3.</b> Patologías provocadas por <i>E. histolytica</i> . .....	21
<b>Figura 4.</b> Vías de señalización activadas durante el absceso hepático amebiano. .....	23
<b>Figura 5.</b> Estructura química del trans-resveratrol. ....	38
<b>Figura 6.</b> Efecto del resveratrol sobre trofozoítos de <i>E. histolytica</i> . ....	81
<b>Figura 7.</b> Cambios morfológicos de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> durante el tratamiento con resveratrol.....	85
<b>Figura 8.</b> Tamaño de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> . ....	87
<b>Figura 9.</b> Análisis del tamaño y la granularidad en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .89	
<b>Figura 10.</b> Cambios ultraestructurales en los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> tratados con resveratrol. ....	93
<b>Figura 11.</b> Generación de ERO en trofozoítos tratados con resveratrol. ....	95
<b>Figura 12.</b> Cuantificación de lípidos peroxidados en trofozoítos tratados con resveratrol. ....	97
<b>Figura 13.</b> Alineamiento múltiple de las proteínas Atg8. ....	104
<b>Figura 14.</b> Análisis de los dominios estructurales de las proteínas Atg8. ....	106
<b>Figura 15.</b> Estructura terciaria de las proteínas Atg8.....	108
<b>Figura 16.</b> Amplificación del gen Ehatg8a y clonación del en el vector pJET 1.2. .....	112
<b>Figura 17.</b> Clonación del gen Ehatg8a en el vector pGEX-6P-1.....	114
<b>Figura 18.</b> Expresión y análisis de solubilidad de la proteína GST-EhAtg8ar. 118	
<b>Figura 19.</b> Purificación de la proteína GST-EhAtg8ar. ....	120

<b>Figura 20.</b> Inmunodetección de la proteína GST-EhAtg8 recombinante.....	123
<b>Figura 21.</b> Inmunodetección de la proteína EhAtg8 en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	125
<b>Figura 22.</b> Análisis de autofagia mediante la inmunodetección del marcador Atg8 en Entamoeba sp.....	129
<b>Figura 23.</b> Localización celular de la proteína Atg8 en trofozoítos amebianos.	131
<b>Figura 24.</b> Análisis de externalización de fosfatidilserina por microscopia confocal. .....	135
<b>Figura 25.</b> Análisis de la externalización de fosfatidilserina por citometría de flujo en trofozoítos tratados con resveratrol. ....	137
<b>Figura 26.</b> Determinación de la fragmentación del DNA de trofozoítos de <i>E.</i> <i>histolytica</i> por microscopia confocal usando la técnica de TUNEL.	140
<b>Figura 27.</b> Análisis de la fragmentación del DNA por la técnica de TUNEL en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> mediante citometría de flujo.....	142
<b>Figura 28.</b> Cuantificación de calcio intracelular. ....	146
<b>Figura 29.</b> Medición de la actividad enzimática de calpainas.....	148
<b>Figura 30.</b> Medición de la actividad enzimática de la SOD.....	150
<b>Figura 31.</b> Efecto citopático de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> sobre monocapas de células MDCK. ....	154
<b>Figura 32.</b> Eritrofagocitosis de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	156
<b>Figura 33.</b> Enquistamiento de trofozoítos de <i>E. invadens</i> .....	159
<b>Figura 34.</b> Formación de AHA en hámsteres inducidos por trofozoítos de <i>E.</i> <i>histolytica</i> .....	161
<b>Figura 35.</b> Evaluación del potencial amebicida del resveratrol en hámsteres inoculados con trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	166
<b>Figura 36.</b> Histología del AHA en hámsteres.....	167

<b>Figura 37.</b> Evaluación de la carga parasitaria en cortes histológicos del AHA169	
<b>Figura 38.</b> Identificación de blancos moleculares del resveratrol en <i>E. histolytica</i> mediante la técnica de DARTS.....	173
<b>Figura 39.</b> Acoplamiento molecular del resveratrol con $\alpha$ tubulina de <i>E. histolytica</i> .....	176
<b>Figura 40.</b> Representación bidimensional de las interacciones del resveratrol con $\alpha$ tubulina de <i>E. histolytica</i> .....	178
<b>Figura 41.</b> Acoplamiento molecular del resveratrol con miosina IB de <i>E. histolytica</i> .....	180
<b>Figura 42.</b> Representación bidimensional de las interacciones del resveratrol con miosina IB de <i>E. histolytica</i> . ....	182
<b>Figura 43.</b> Acoplamiento molecular del resveratrol con anhidrasa carbónica de <i>E. histolytica</i> .....	184
<b>Figura 44.</b> Representación bidimensional de las interacciones del resveratrol con la anhidrasa carbónica de <i>E. histolytica</i> .....	186
<b>Figura 45.</b> Acoplamiento molecular del resveratrol con la EhCP5 de <i>E. histolytica</i> .....	188
<b>Figura 46.</b> Representación bidimensional de las interacciones del resveratrol con EhCP5 de <i>E. histolytica</i> . ....	190
<b>Figura 47.</b> Acoplamiento molecular del resveratrol con EhCP112 de <i>E. histolytica</i> .....	192
<b>Figura 48.</b> Representación bidimensional de las interacciones del resveratrol con la EhCP112 de <i>E. histolytica</i> .....	194

## Resumen

*Entamoeba histolytica* es el parásito protozoario causal de la amebiasis, enfermedad que causa 100,000 muertes al año. El metronidazol y sus derivados son actualmente usados contra este protozoario, sin embargo estos compuestos presentan varios efectos colaterales para la salud humana. El resveratrol, ha demostrado su actividad contra algunos parásitos, por lo que puede ser una alternativa para combatir la amebiasis. En este trabajo, se investigó el efecto amebicida del resveratrol sobre trofozoítos de *E. histolytica*, así como su influencia sobre la virulencia de este parásito. El crecimiento del cultivo de trofozoítos fue arrestado con 72  $\mu\text{M}$  del fármaco, y la  $\text{IC}_{50}$  fue de 219  $\mu\text{M}$  a las 48 h. Los trofozoítos tratados presentaron disminución en su tamaño, morfología redondeada y formaron agregados celulares. Ultraestructuralmente se observó condensación de la cromatina y vacuolas con detritus. El resveratrol indujo la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno que favorecieron; la peroxidación de lípidos, la externalización de fosfatidilserina y la fragmentación del DNA. Así mismo, el fármaco provocó un incremento en la concentración del calcio intracelular, un incremento de la actividad de calpaina y una disminución de la actividad de la superóxido dismutasa, indicando que el resveratrol indujo apoptosis. En tanto que no se observó autofagia. Además el pretratamiento con resveratrol atenuó la virulencia de los trofozoítos de *E. histolytica*, dado que disminuyó el efecto citopático y la eritrofagocitosis. Así mismo, el resveratrol disminuyó el enquistamiento de *E. invadens* un parásito de reptiles con morfología y ciclo de vida similar a *E. histolytica* de forma dependiente de la dosis. De forma interesante, hámsteres pretratados con resveratrol e inoculados con trofozoítos virulentos de *E. histolytica* por vía intraportal no desarrollaron abscesos hepáticos amebianos. Así, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el resveratrol puede ser una alternativa para combatir la amebiasis.

## Abstract

*Entamoeba histolytica* causes amoebiasis, an infection that kills 100,000 individuals each year. Metronidazole and its derivatives are currently used against this protozoan, but they present adverse effects on human health. Resveratrol, used against some parasites, could be an alternative drug to defeat amoebiasis. Here, we investigated the effect of resveratrol on *E. histolytica* trophozoites and its influence on the parasite virulence. Trophozoites growth was arrested by 72  $\mu\text{M}$  of the drug and the  $\text{IC}_{50}$  was 219  $\mu\text{M}$ , at 48 h. Resveratrol-treated trophozoites appeared smaller, rounded and in clusters, with debris-containing vacuoles and abnormally condensed chromatin. Resveratrol triggered reactive oxygen species production, caused lipid peroxidation, produced phosphatidylserine externalization and TUNEL assays evidenced DNA fragmentation. The drug provoked a high intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, calpain activation and a decrease in superoxide dismutase activity, indicating that apoptosis had occurred; however, autophagy was not detected. Resveratrol attenuated trophozoite virulence. Cytopathic activity, phagocytosis, and *in vivo* virulence were dramatically diminished by pre-incubation of trophozoites with resveratrol.

Similarly, resveratrol decreased dose dependently encystment of *E. invadens* a parasite of reptiles with life cycle and morphology similar to *E. histolytica* encystment

Interestingly, most of animals treated with the drug after intra-portal inoculation of *E. histolytica* virulent HM1-IMSS strain did not develop abscesses. Our findings suggested that resveratrol could be an alternative to contend amoebiasis.

# 1. Introducción

La amebiasis es una enfermedad parasitaria causada por *Entamoeba histolytica* que se presenta prácticamente en todos los países del mundo, siendo más común en aquellos que están en vías de desarrollo (WHO, 1997). Esta enfermedad se relaciona con la pobreza, el suministro inadecuado de agua y la contaminación, las malas condiciones sanitarias y el hacinamiento, lo cual favorece la transmisión del parásito de una persona a otra (WHO, 1997).

## 1.1. Clasificación de *E. histolytica*

Inicialmente se pensaba que *E. histolytica* se había originado de los eucariontes antes de que estos adquirieran mitocondrias y otros organelos (Tovar, Fisher y Clark, 1999). Sin embargo, la presencia de genes que codifican para proteínas que normalmente están asociadas con las mitocondrias, y la detección de un compartimiento subcelular derivado de un mitocondrion confirman la hipótesis de la pérdida de la mitocondria durante el proceso evolutivo del linaje ameboide (Tovar, Fisher y Clark, 1999).

Por otro lado, estudios filogenéticos basados en la comparación de las secuencias de la subunidad pequeña del DNA ribosomal (srDNA) han establecido que *E. histolytica* pertenece a un linaje relativamente cercano al de los eucariontes superiores (Clark y Roger, 1995). Sin embargo, se requieren de más estudios para esclarecer el proceso de evolución para *Entamoeba sp.*

*E. histolytica* pertenece al *phylum* de los rizópodos cuya característica principal es la presencia de pseudópodos en algún estadio de su vida y la familia de los Entamoebidae cuyos miembros son todos parásitos. **Tabla 1**

**Tabla 1. Clasificación de *Entamoeba histolytica***

---

Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosea
Subclase	Gymnamoeba
Orden	Amoebida
Suborden	Tubulina
Familia	Endamoebidae
Género y Especie	<i>Entamoeba histolytica</i>

---

(Levine y Col., 1980)

## 1.2. Epidemiología de la amebiasis

La amebiasis es la tercera enfermedad parasitaria más importante del mundo (WHO, 1997). Generalmente las tasas de prevalencia son más altas en algunas zonas del trópico, donde el saneamiento es deficiente (WHO, 1997). Se estima que en el mundo existen de 40 a 50 millones de individuos infectados con *E. histolytica* y de éstos cerca de 100,000 mueren anualmente (WHO, 1997). De acuerdo a Walsh (1986) estimó que de 500 millones de personas infectadas con dicho parásito, solo el 10% desarrolla la enfermedad, de los cuales solo el 0.1% de estos últimos fallecen (Walsh, 1986). Sin embargo, la mayoría de las muertes fueron consecuencia de complicaciones graves asociadas con la enfermedad invasora intestinal o extraintestinal (Clark, y Diamond, 1993). Los valores estimados por Walsh, (1986) pudieron estar sobreestimados ya que se obtuvieron antes de la separación genética de especies de *E. histolytica* y *Entamoeba dispar* (Clark, y Diamond, 1993). Desde entonces, la epidemiología de la amebiasis ha sufrido grandes cambios, y no hay un consenso mundial a la fecha (Ximénez, y Col., 2009). En México, la dirección general de epidemiología reporta que la amebiasis sigue siendo un problema de salud pública, y ocupa entre el quinto o sexto lugar dentro de las principales causas de enfermedad al año. Para el año de 1996 se reportaron 1.3 millones de amebiasis intestinal y aunque no se diferencia entre *E. histolytica* y *E. dispar*, los datos correlacionan con estudios serológicos que indican que más del 8% de la población mexicana ha tenido al menos un episodio de amebiasis (PAHO, 1998; Caballero-Salcedo, y Col., 1994).

Por otro lado, se sabe que la epidemiología de la amebiasis en México es diferente dependiendo de la zona geográfica y grado de saneamiento. En un estudio realizado en la ciudad de Puebla se encontró que de los individuos con síntomas de desorden

intestinal, solo el 7% estaba infectado con *E. histolytica*. Sin embargo, la prevalencia de este parásito en México puede ser muy alta, hasta de un 51% como en el caso del estudio realizado en el estado de Chiapas (Sánchez-Guillén, y Col., 2002; Morales-Espinoza, y Col., 2003).

Para el año del 2014, el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica de México, reportó que para la semana 49 (del 30 de noviembre del 2014 al 6 de diciembre del 2014), había 279,213 casos acumulados de amebiasis intestinal. La frecuencia de la amebiasis y la tasa de mortalidad en México han disminuido en los últimos años, dicha disminución podría estar relacionada a la mejora de la disponibilidad de medicamentos anti-amebianos (<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2014/sem49.pdf>; (Ximénez, y Col., 2009).

### **1.3. Morfología de *E. histolytica***

En la naturaleza, se pueden distinguir tres estadios o fases de desarrollo principales para *E. histolytica*: el trofozoíto, el prequiste y el quiste (Stanley, 2003).

#### **1.3.1. Trofozoíto**

El trofozoíto es una célula de dimensiones variables cuyas medidas fluctúan entre 10 y 60  $\mu\text{m}$  de diámetro, con forma irregular y movimiento característico, mediante la emisión de pseudópodos rápidos y explosivos, digitiformes, largos y anchos (Stanley, 2003). En su citoplasma se observa marcada diferencia entre el ectoplasma que es hialino y transparente y el endoplasma que tiene una gran cantidad de inclusiones, por lo que es granuloso con aspecto de vidrio molido, características que se observan mejor si se usa un microscopio de contraste de fases. En preparaciones frescas y sin teñir es difícil caracterizar a las inclusiones

del citoplasma, el núcleo, las vacuolas con eritrocitos o bacterias, etc., pero si la preparación se tiñe con hematoxilina férrica o se usa tinción tricrómica de Gomori, se ven claramente las partes de las que está constituido el trofozoíto de *E. histolytica* (Stanley, 2003; Tay, y Col., 2003). (**Fig. 1A**). Este estadio es sumamente sensible a cambios de temperatura, pH y osmolaridad (Clark y Col., 2000). El citoesqueleto está formado principalmente por actina, miosina y tubulina (Godbold y Mann, 1998; Marion, y Col., 2004). Los filamentos de actina F se detectan en el uroide y en las bocas fagocíticas, mientras que la actina despolimerizada (actina G) se concentra en los pseudópodos (Bailey, y Col., 1992). Se sugiere que el citoesqueleto tiene un papel importante en la patogenicidad del parásito (De la Garza M, y Col., 1989). Una vez que ocurre la adhesión a la célula blanco o a sustratos inertes se induce una rápida polimerización de los filamentos de actina para formar los pseudópodos (Guillén, 1996).

### **1.3.2. Prequiste**

Presenta un revestimiento de una doble membrana gruesa y refringente, lo cual le confiere resistencia cuando se expone a las condiciones del medio externo al ser expulsado en la materia fecal. El prequiste presenta un solo núcleo, una masa de glucógeno en una vacuola y barras cromatóides (Stanley, 2003) (**Fig. 1B**)

### **1.3.3 Quiste**

A medida que pasa el tiempo, en el interior del prequiste hay una gran actividad celular, donde el núcleo se divide en dos y luego en cuatro, dando origen al quiste maduro. Este tiene cuatro núcleos pequeños con un cariosoma central similar al de los trofozoítos, se recubre de una pared de quitina, refráctil, con un grosor de 125-150 nm, la cual proporciona resistencia a los cambios de temperatura, humedad, y presión osmótica (Arroyo-Begovich, y Cárabez-Trejo, 1982). Durante la maduración

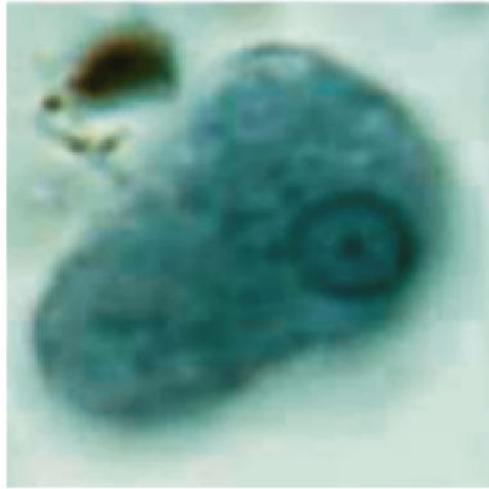
del quiste, desaparece el glucógeno y las barras cromatóides se hacen poco visibles o desaparecen (Stanley, 2003) (**Fig. 1C**).

El mecanismo de enquistamiento y muchas de las propiedades de los quistes de *E. histolytica* aún continúan bajo estudio. Sin embargo, se está usando el modelo de enquistamiento *in vitro* del parásito de reptiles *Entamoeba invadens*, para interpretar el mecanismo de enquistamiento en *E. histolytica*, dada la semejanza que existe entre estos dos parásitos y por la dificultad de obtener quistes de forma experimental de esta última (Singh, y Col., 2011). Durante el enquistamiento en *E. invadens*, la actina, pequeñas GTPasas y la enolasa tienen una función importante en el transporte de las vesículas para la formación de la pared quitina del quiste (Herrera-Martínez, y Col., 2013). Por otro lado, se ha realizado un análisis comparativo del transcriptoma entre quistes y trofozoítos de *E. histolytica* (Ehrenkauf, y Col., 2007), aunque las bases moleculares de cómo se regula la diferenciación de este parásito son aún desconocidas. Dentro de las principales proteínas que se sobreexpresan durante el enquistamiento están proteasas de cisteína y cinasas transmembranales que probablemente participan en vías de señalización, de igual manera se han visto otras proteínas como; la sintasa de quitina, quitinasa y la glicoproteína Jacob (Ehrenkauf, y Col., 2007). Así mismo, se ha identificado en *E. histolytica* una proteína que pertenece a la familia de las Myb, la cual tiene la capacidad de modular la expresión de un subgrupo de genes estadio-específico, dado que cuando se sobreexpresa dicha proteína en trofozoítos amebianos, se relocaliza en el núcleo y el transcriptoma es concordante de forma significativa con el transcriptoma de los quistes amebianos. Mediante ensayos de cambios en la corrida electroforética (EMSA; del inglés Electrophoretic Mobility Shift Assay) en los trofozoítos que sobreexpresan a la proteína EhMyb-dr se identificó la unión a sondas

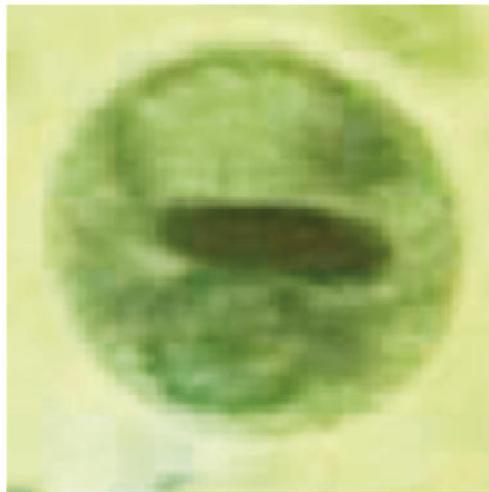
ricas en motivos CCCCCC, la cual podría estar presente en los promotores de genes específicos para la inducción del enquistamiento (Ehrenkauf y Col., 2009). Por su parte, Aguilar-Díaz y Col., (2010) mostraron que trofozoítos de *E. histolytica* en cultivo, tratados con peróxido de hidrógeno en presencia de trazas de diversos cationes (cadmio 0.02 ppm, cobalto 0.02 ppm, cobre 0.02 ppm, hierro 0.1 ppm, níquel 0.02 ppm, plomo 0.02 ppm, zinc 0.02 ppm, ácido sulfúrico 40 ppm, cloruro 0.5 ppm, fosfato 5 ppm y sulfato 2 ppm), se transformaron en pequeñas esferas y estructuras refringentes que presentaron resistencia a detergentes. Además, el análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión reveló estructuras multinucleadas. Estas estructuras fueron teñidas con calcofluor y mediante ensayos de ELISA utilizando aglutinina de germen de trigo se demostró la presencia de quitina. Por otra parte, mediante RT-PCR se demostró la sobreexpresión de la glucosamina 6-fosfato isomerasa (Gln6Pi) (Aguilar-Díaz, y Col., 2010). En conjunto, estos resultados sugieren que los trofozoítos de *E. histolytica* activan vías de enquistamiento cuando son expuestos al tratamiento con peróxido de hidrógeno (Aguilar-Díaz, y Col., 2010). Por su parte, Aguilar-Díaz, y Col. (2013) observaron que al silenciar la Gln6Pi se inhibe alrededor de un 85% la formación de estructuras tipo quiste en *E. histolytica*, al ser tratadas con peróxido de hidrógeno. Asimismo, diversos compuestos, como inhibidores de proteasas de cisteína, inhibidores de protein cinasa C, inhibidores de fosfatidilinositol 3-cinasa y agentes quelantes de calcio también inhiben el enquistamiento en *E. invadens* (Makioka, y Col., 2004; Makioka, y Col., 2003; Makioka, y Col., 2002). Además, se ha identificado que el extracto de la planta conocida como chaparro amargo (*Castela texana*) tiene la capacidad de inhibir el proceso de enquistamiento en *E. invadens*, por lo cual podría ser utilizado para contener la amebiasis evitando la formación del estadio de transmisión de *E. histolytica* (Calzado-Flores, y Col., 2007).

**Figura 1. Estadios de *E. histolytica*** **A)** Trofozoíto de *E. histolytica* teñido con la técnica tricrómica de Wheatley (Stanley, 2003). **B).** Prequiste de *E. histolytica* teñido con iodo (Haque, y Col., 2003) **C)** Quiste de *E. histolytica* teñido con negro de clorazol. (Stanley, 2003)

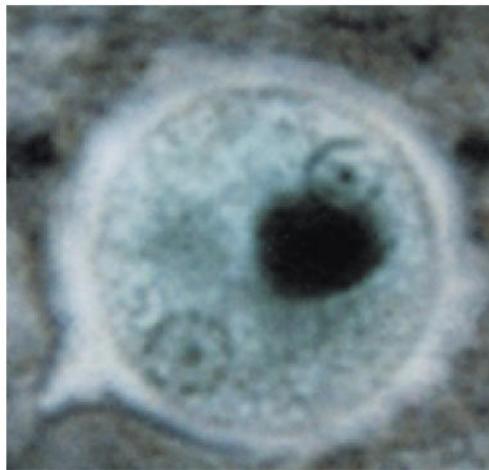
**A**



**B**



**C**



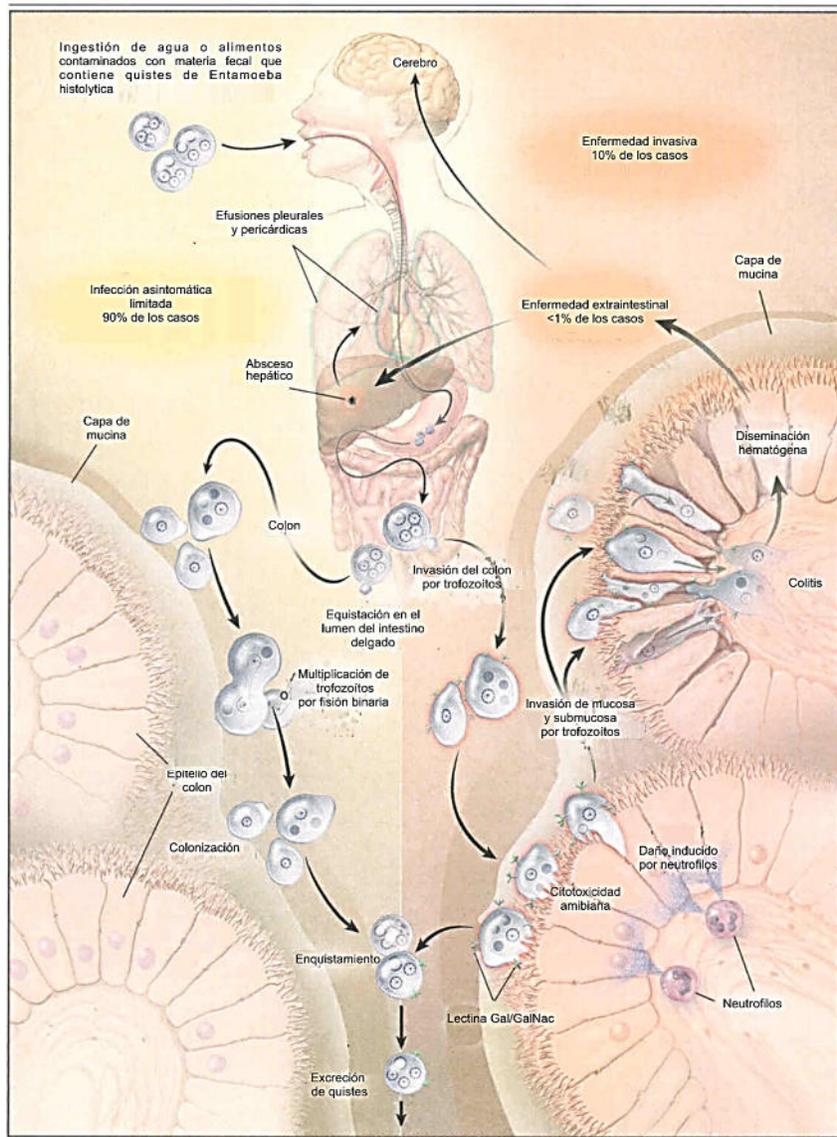
#### 1.4. Ciclo biológico de *E. histolytica*

La forma infectante de *E. histolytica* es el quiste, el cual presenta una gran capacidad para permanecer viable hasta por ocho días en heces, en agua o en el suelo a TA; así como de resistir la acción de los jugos gástricos y de otras enzimas digestivas (Tay, y Col., 2003). Los quistes de *E. histolytica* sobreviven a la acción del cloro, a las concentraciones usadas en la potabilización del agua, por lo cual lavar los vegetales con agua clorada no protege contra la infección por quistes de *E. histolytica* (Tay, y Col., 2003).

En el intestino delgado ocurre la llamada exquistación, que consiste en la división de los núcleos del quiste tetranucleado, lo que da origen a ocho núcleos (estado metaquístico transitorio), después la división citoplasmática continúa y da lugar a ocho trofozoítos. Los trofozoítos se dirigen al intestino grueso para colonizarlo mediante el contacto con la mucosa. Los trofozoítos pueden invadir el intestino y pasar a la circulación, donde por la vía portal llegan al hígado, produciendo el absceso hepático amebiano, y por contigüidad puede verse afectado el diafragma y el pulmón. En raras ocasiones puede haber amebiasis en órganos como el cerebro y aparato genitourinario. El trofozoíto generalmente vive en el ciego y rectosigmoideo, donde se multiplica por división binaria. Absorbe sus alimentos de los tejidos disueltos por sus enzimas citolíticas, e ingiere glóbulos rojos, hemoglobina y sustancias sintetizadas por el hospedero (Tay, y Col., 2003).

En condiciones naturales no se produce enquistamiento en los tejidos, sino que a medida que la materia fecal empieza a deshidratarse en la luz del colon, los trofozoítos se desprenden de la mucosa, para posteriormente secretar una cubierta resistente con un solo núcleo, recibiendo el nombre de quiste inmaduro. El quiste inmaduro sufre dos mitosis consecutivas, produciendo así cuatro núcleos y dos tipos de inclusiones alimenticias conocidas como barras cromatoides y masa de glucógeno. Los quistes salen al exterior con las heces y por condiciones higiénicas deficientes inician un nuevo ciclo (Tay, y Col., 2003; Haque, y Col., 2003). El ciclo de vida de *E. histolytica* se muestra en la **Fig. 2**.

**Figura 2. Ciclo de vida de *E. histolytica*.** La infección por *E. histolytica* ocurre por ingestión de quistes maduros en alimentos, agua o manos contaminados con heces. El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado y los trofozoítos son liberados y migran al colon. Los trofozoítos se reproducen por fisión binaria y producen quistes que se eliminan con las heces. Debido a la protección de la pared, los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el medio externo y son los responsables de la transmisión. Los trofozoítos en el medio externo mueren rápidamente. En muchos casos los trofozoítos permanecen confinados en la luz intestinal (infección no invasiva) de los infectados, quienes son entonces portadores asintomáticos o diseminadores de quistes. En algunos individuos los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (enfermedad intestinal), o a través de la circulación, invaden el hígado, pulmones, cerebro, etc. (enfermedad extraintestinal). Adaptado de Haque, y Col., 2003.



## **1.5. Patología de la amebiasis**

### **1.5.1. Amebiasis intestinal**

La amebiasis intestinal es la forma más frecuente de amebiasis y es perfectamente controlable con una quimioterapia adecuada (Nichols, 2003). Se caracteriza por la presencia de evacuaciones diarreicas, posteriormente evoluciona a síndrome disenteriforme, caracterizado por evacuaciones mucosanguinolentas acompañadas de pujo y tenesmos, dolor abdominal que exacerba con la palpación, disentería fulminante, pérdida de peso, deshidratación, astenia, y malestar general (Stanley, 2003).

La histopatología de la amebiasis intestinal se caracteriza por tener múltiples ulceraciones separadas por regiones de mucosa del colon con apariencia normal.

**(Fig. 3A y 3B)**

### **1.5.2. Amebiasis hepática**

La amebiasis hepática o absceso hepático amebiano (AHA) es un síndrome caracterizado por hepatomegalia, abscesos, fiebre, anorexia, náuseas, vómito y diarrea que generalmente incluye dolor abdominal en el hipocondrio derecho y suele presentarse neutrofilia y leucocitosis. (Sepúlveda, 1982).

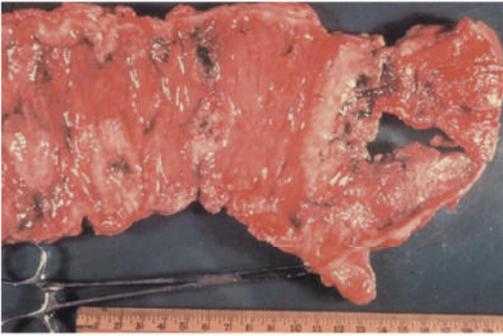
Este AHA se origina por la llegada de trofozoítos amebianos al hígado, a través de las venas mesentéricas y del sistema porta hepático a partir de ulceraciones intestinales causadas previamente por una amebiasis intestinal (Martínez-Palomo, 1987). El AHA es el producto de la acumulación de restos celulares, infiltrado celular inflamatorio y parásitos, lo cual se sabe por estudios histopatológicos del AHA de animales utilizados como modelo (Tsutsumi, y Col., 1984). En estos estudios se ha documentado una reacción inflamatoria temprana, donde predominan leucocitos

polimorfonucleares (neutrófilos), algunos eosinófilos y escasos monocitos alrededor de las amibas (Tsutsumi, y Col., 1984; Tsutsumi, y Col., 1988. Tsutsumi, y Shibayama, 2006) (**Fig. 3C y 3D**). A nivel molecular, mediante estudios hechos con microarreglos, durante el desarrollo del AHA, se sabe que a tiempos de 4, 12 y 24 h se observa estimulación simultánea del proceso inflamatorio, regeneración hepática y de diferentes vías de activación de la muerte celular por apoptosis, probablemente inducidas por TLR2 (del inglés Toll-like receptor 2), IL1 (del inglés Interleukin 1), IL6 (del inglés Interleukin 6), por la proteína de superficie Fas, y posiblemente también por la señalización mediada por TNF- $\alpha$  (del inglés Tumor Necrosis Factor alpha) (Pelosof, y Col., 2006). Además, se ha observado un incremento en la expresión de genes regulados por las vías de señalización MAPK (del inglés Mitogen-activated protein kinases), JAK-STAT (del inglés Janus kinase and Signal Transducer and Activator of Transcription) y NF- $\kappa$ B del inglés (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B Cells) (Pelosof, y Col., 2006). La suma de estas vías de señalización en etapas tempranas del AHA inducen predominantemente la muerte celular programada, más que la inflamación o la regeneración hepática (Pelosof, y Col., 2006). Las vías de activación de la apoptosis durante el AHA en el modelo murino son: 1) muerte por vía Fas o TNF-receptor TWEAKR, 2) vía dependiente de granzima B y 3) vía apoptosoma-mitocondrial (Pelosof, y Col., 2006) (**Fig. 4**).

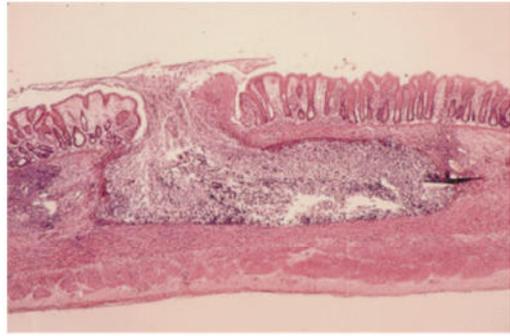
Por otro lado, estudios realizados en el AHA de un modelo murino, dónde se bloqueó la actividad de las caspasas, se observó que el tamaño de las lesiones del AHA disminuye considerablemente, lo cual sugiere, que un fármaco que participe en la disminución del proceso de apoptosis durante el AHA podría considerarse como un tratamiento alternativo (Yan, y Stanley, 2001).

**Figura 3. Patologías provocadas por *E. histolytica*. A) Patología macroscópica de la colitis amebiana.** Intestino grueso con múltiples ulceraciones de color blanco (Stanley, 2003). **B) Patología a nivel microscópico de la colitis amebiana.** El corte histológico muestra una ulceración del colon con invasión a la submucosa (Stanley, 2003). **C) Patología a nivel macroscópico del absceso hepático amebiano.** El hígado presenta en su superficie, grandes e irregulares lesiones blanquecinas (Tsutsumi, y Shibayama, 2006). **D) Patología microscópica del absceso hepático amebiano.** Inmunohistoquímica de AHA con trofozoítos de *E. histolytica*, células inflamatorias y hepatocitos hacia la periferia (Tsutsumi, y Shibayama, 2006).

**A**



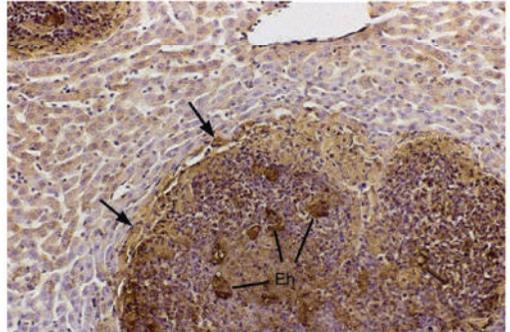
**B**



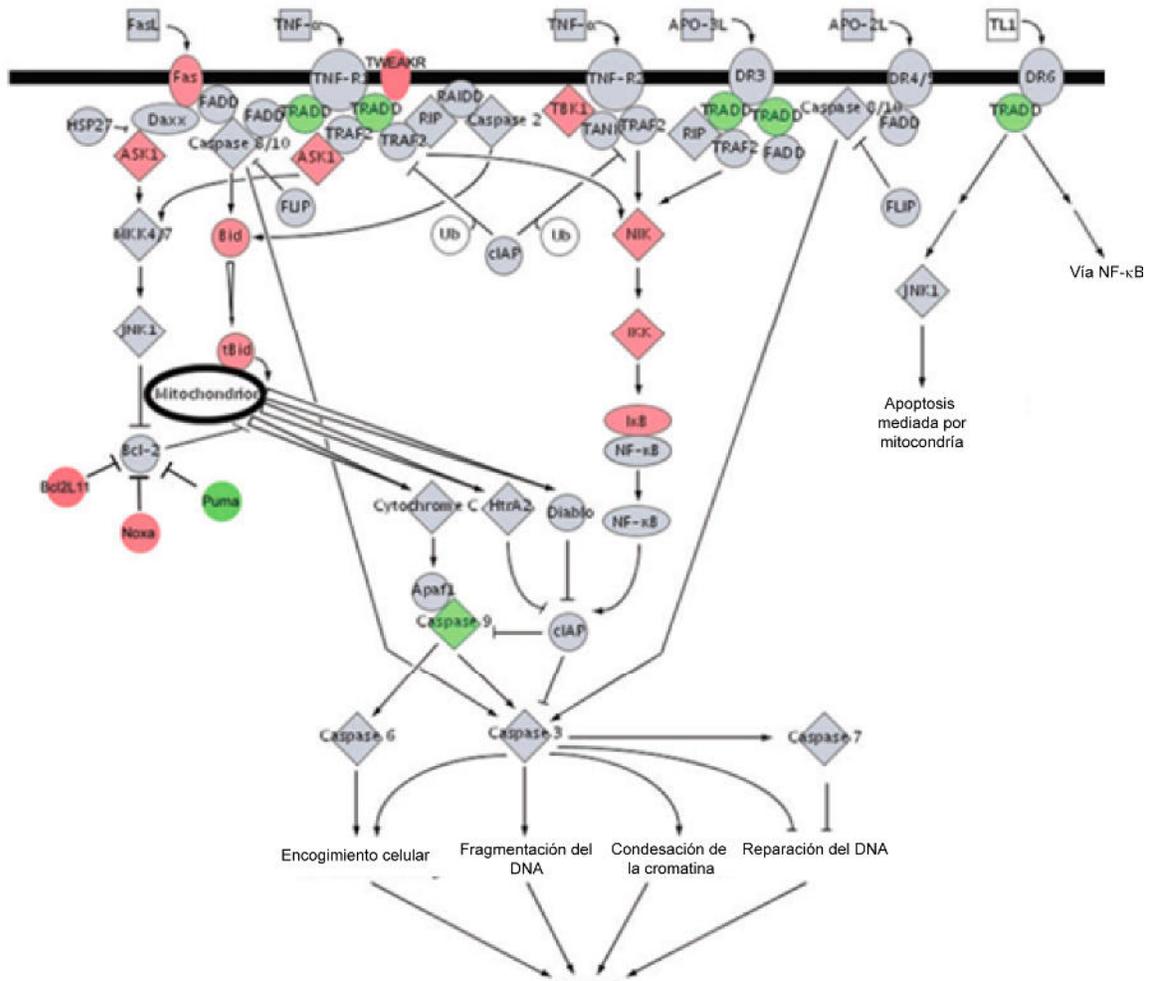
**C**



**D**



**Figura 4. Vías de señalización activadas durante el absceso hepático amebiano.** La infección del hígado por *E. histolytica* da como resultado el incremento de la expresión de genes involucrados en la activación de las diferentes vías que conducen a la muerte celular por apoptosis. Tomado de (Pelosof, y col., 2006).



## **1.6. Factores del hospedero que interactúan en la defensa contra la amebiasis**

### **1.6.1. Respuesta inmune innata**

La resistencia inicial por parte del hospedero contra *E. histolytica* depende de los mecanismos de la inmunidad innata. Dentro de ellos participan las mucinas del epitelio del colon, las cuales tienen la capacidad de unirse a la lectina Gal/GalNac del parásito, previniendo así la adhesión de la ameba y la citólisis de las células, como lo sucedido en experimentos realizados *in vitro* con las células CHO (Chinese Hamster Ovary) (Chadee, y Col., 1987; Chadee, y Col., 1991).

Por otro lado, en experimentos realizados *in vitro* se ha demostrado la actividad citotóxica del complemento contra *E. histolytica* (Reed, y Gigli, 1990). Sin embargo, los trofozoítos de *E. histolytica* han desarrollado la capacidad de evadir la acción del complemento mediante varios mecanismos de resistencia, uno de los cuales depende de la movilidad de la membrana y por ende la capacidad de desprender las proteínas del complemento que se unieron a la membrana del trofozoíto (Hamelmann, y Col., 1993). Otro mecanismo de resistencia es mediado por uno o más componentes de la superficie celular que son sensibles a la tripsina (Hamelmann, y Col., 1993). Así mismo, se sabe que *E. histolytica* resiste el ataque del complemento debido a que la lectina Gal/GalNac tiene una reactividad cruzada con la molécula CD59, la cual es una molécula de superficie que protege a las células del ataque del complemento. Posiblemente la ameba también sintetice una molécula similar a CD59 o incorpore proteínas reguladoras del complemento en la membrana (Braga, y Col., 1992; Flores-Romo, y Col., 1994; Gutiérrez-Kobeh, y Col., 1997).

Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado que macrófagos que han sido activados por citocinas como IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$ , matan a los trofozoítos de *E. histolytica* a través de mecanismos dependientes del óxido nítrico (NO) y por la acción de proteasas (Lin, y Col., 1994). En contraste, macrófagos provenientes de pacientes con AHA son deficientes en su capacidad para inducir TNF- $\alpha$ , para desarrollar un estallido respiratorio, así como para expresar y secretar IL-1 (Wang, y Col., 1994; Séguin, y Col., 1997; Denis, y Chadee, 1988).

Por su parte, estudios *in vitro* con monocitos aislados de sangre periférica humana, que se activaron con antígenos amebianos, fueron capaces de eliminar más del 40% de los trofozoítos (Seydel, y Col., 2000). Sin embargo, en un modelo *in vivo* de amebiasis murina, se encontró que los macrófagos formaban parte del infiltrado inflamatorio, pero no contribuyeron de manera directa con la eliminación de la infección (Jarillo-Luna, y Col., 2000). La explicación de dicho fenómeno puede ser por la presencia de un pentapéptido anti-inflamatorio, conocido como factor inhibidor de la locomoción de monocitos (MLIF) producido por *E. histolytica*. Este factor inhibe la locomoción de monocitos pero no la locomoción de neutrófilos, dicho pentapéptido suprime la producción de especies reactivas intermediarias del oxígeno y nitrógeno en monocitos y neutrófilos (Rico, y Col., 1992; Rico, y Col., 2003). Así mismo, este pentapéptido también disminuye la expresión de algunas quimiocinas involucradas en la quimiotaxis de las células inflamatorias, (Utrera-Barillas, y Col., 2003).

Así mismo, dentro de la respuesta inmune innata, los receptores tipo toll o TLRs (del inglés Toll-Like Receptor) son una familia de proteínas transmembranales del tipo

1. Estos receptores juegan un papel esencial en el reconocimiento de PAMPs por sus siglas en inglés (Pathogen-Associated Molecular Patterns), en la inducción de genes antimicrobianos y en la regulación de la respuesta inmune adaptativa (Akira, y Col., 2003). La señalización vía TLRs conduce a la activación de genes a través del factor de transcripción NF- $\kappa$ B para la síntesis de citocinas inflamatorias, quimiocinas y moléculas coestimuladoras que participan en la respuesta inmune inicial, la cual determinará la progresión de la inflamación (Akira, y Col., 2003). Moléculas de *E. histolytica* como la lipopéptidofosfoglicano (LPPG) y la lipofosfoglicano (LPG) son polisacáridos que se encuentran en la superficie externa de la membrana plasmática (Vivanco-Cid, 2007) y están expuestas directamente al sistema inmune del hospedero y por lo tanto, funcionan como patrones moleculares inmunoestimuladores asociados a patógenos, los cuales son reconocidas por TLR2 y TLR4, LPPG y LPG tienen la capacidad de activar al factor de transcripción NF- $\kappa$ B, la síntesis del TNF- $\alpha$ , y de las interleucinas IL-6, IL-8, IL-12p40 e IL-10 en monocitos humanos a través de los TLRs mencionados (Maldonado-Bernal, y Col., 2005)

Aunado a esto, se sabe que grandes concentraciones de LPPG producen una regulación negativa para la transcripción del gen *tlr2* en monocitos humanos, después de 24 h de incubación en experimentos *in vitro* (Maldonado-Bernal, y Col., 2005). La regulación negativa este gen, podría resultar en la supresión de la respuesta inmune, lo cual contribuiría a la persistencia de *E. histolytica* en el hospedero. De manera similar, la IL-10 inducida por el LPPG puede promover una inmunosupresión transitoria, que permite la sobrevivencia de los trofozoítos amebianos en el hígado (Maldonado-Bernal, y Col., 2005). Por el contrario, la

expresión del TLR2 puede tener un gran impacto sobre la activación de los macrófagos, mientras la respuesta inmune permanezca sesgada hacia una respuesta celular de tipo Th1 (Kammanadiminti, y Col., 2004).

### **1.6.2. Respuesta inmune humoral**

La producción de anticuerpos es la principal manifestación inmunológica de la amebiasis intestinal e invasiva en humanos (Ravdin, y Col., 1990). Después del séptimo día de desarrollo de AHA aparecen en el suero del hospedero títulos elevados de anticuerpos específicos contra amibas, los cuales pueden persistir hasta por diez años en humanos (Ravdin, y Col., 1990).

En un modelo experimental de ratón, después de la inmunización con una dosis de amibas por vía local y sistémica, se observó que las células esplénicas y las células de las placas de Peyer, principalmente producían anticuerpos de los isotipos IgA, IgM e IgG (Moreno-Fierros, y Col., 1992). Al inmunizar por la vía intragástrica, la respuesta de estas inmunoglobulinas fue superior en células de las placas de Peyer, en relación con las células esplénicas (Moreno-Fierros, y Col., 1992). Cuando la inmunización es por la vía rectal, la respuesta de IgG e IgA es superior en las células esplénicas en contraste a las células de las placas de Peyer, y cuando la inmunización es por la vía intraperitoneal, las IgM e IgG son superiores en esplenocitos y las IgA son superiores en células de Peyer (Moreno-Fierros, y Col., 1992).

No existe evidencia de que la amebiasis intestinal ocurra con mayor frecuencia o sea más severa en individuos con deficiencias de IgA. Lo que sí se sabe es que los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de degradar a las inmunoglobulinas IgA secretora e IgG, rasgo que se interpreta como un mecanismo de defensa del parásito (Kelsall, y Ravdin, 1993; Que y Reed, 2000). Por otro lado, la presencia de

anticuerpos no se asocia con la resistencia a la infección o con inmunidad protectora contra infecciones recurrentes (Krupp, y Powell, 1971; Tran, y Col., 1998).

### **1.6.3. Respuesta inmune celular**

Los neutrófilos parecen ser importantes en la respuesta inicial y en la resolución de la infección, aunque otros grupos celulares también se han relacionado con la efectiva resolución de la misma Stanley, y Reed, 2001. Los macrófagos, por ejemplo, se han asociado con la destrucción directa de los trofozoítos a través de mecanismos que incluyen la generación de intermediarios de oxígeno (Stanley, y Reed, 2001; Espinosa-Cantellano, y Martinez-Palomo, 2000).

El papel de los neutrófilos en la resolución de la infección por *E. histolytica* fue observado cuando se inocularon amibas directamente en el parénquima hepático de ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID). En este experimento los neutrófilos fueron bloqueados con los anticuerpos monoclonales RB6-8C5, los resultados mostraron que se presentaba mayor número de AHA en los ratones SCID inoculados con amibas, en comparación a los ratones SCID control (Seydel, y Col, 1997).

Por otro lado, se ha propuesto que los neutrófilos activados son capaces de actuar eficientemente contra *E. histolytica* (Seydel, y Col, 2000). La participación del IFN- $\gamma$  en la activación de los neutrófilos fue estudiada en un modelo de ratones “knock-out” para la subunidad- $\alpha$  del receptor del IFN- $\gamma$ . Estos ratones presentaron AHA más grandes y en mayor número, que los ratones normales (Seydel, y Col, 2000). Además, se sabe que los neutrófilos activados son capaces de eliminar a los trofozoítos de *E. histolytica* a través de mecanismos como la producción de óxido

nítrico y otros intermediarios del oxígeno (Jarillo-Luna, y Col., 2002). En un modelo murino, en el cual el gen para la óxido nítrico sintasa inducible (*iNOS*) no se expresa, los AHA fueron de mayor tamaño que los observados en ratones normales. Adicionalmente, ratones infectados con *E. histolytica* expresaron altos niveles de *iNOS* en comparación con aquellos no infectados (Jarillo-Luna, y Col., 2002).

La participación de los linfocitos T en la resolución de la amebiasis ha sido controversial, ya que experimentos usando modelos murinos *in vivo* señalan que estas células no limitan directamente la infección (Salata, y Col, 1987); en cambio, *in vitro*, se ha encontrado que los linfocitos provenientes de humanos con AHA, son capaces de eliminar trofozoítos de *E. histolytica* (Salata, y Col, 1987). Los linfocitos T CD8+ citotóxicos se han relacionado con la destrucción de trofozoítos de *E. histolytica*: *in vitro* linfocitos purificados y activados con fitohemaglutinina fueron capaces de destruir trofozoítos de este parásito (Salata, y Col, 1987). Similarmente, los linfocitos T CD4+, provenientes de pacientes con AHA amebianos fueron también capaces de eliminar los trofozoítos amebianos (Salata, y Col., 1986; Vohra, y Col., 2003).

Citocinas, tales como IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$ , son producidas por linfocitos hepáticos y células esplénicas, durante el curso de la infección en gerbos con AHA (Ivory, y Col., 2006). Este perfil de citocinas corresponde a una respuesta del tipo Th1, la cual favorece la activación de macrófagos y neutrófilos que llevan a cabo la destrucción de *E. histolytica*. Sin embargo, también se ha reportado la inducción de interleucinas como IL-1 e IL-10 durante la infección de *E. histolytica* (Talámas-Rohana, y Col., 1995), las cuales están asociadas a una respuesta tipo Th2. La inducción de esta última pudiera ser un mecanismo de defensa de *E. histolytica* para evitar una

respuesta celular tipo Th1, la cual controla esta parasitosis (Talámas-Rohana, y Col., 1995).

Con los conocimientos de la respuesta inmune contra *E. histolytica* y antígenos de superficie de este parásito, como la lectina Gal/GalNac (Petri, y Col., 2002), la proteína rica en serina "SRHEP" (Zhang y Stanley, 1994), la lipofosfoglicana "LPG" (Marinets, y Col., 1997) y el complejo EhCPADH (Martínez-López, y Col., 2004; Madriz, y Col., 2004; Martínez, y Col., 2009), se ha buscado desarrollar una vacuna, sin embargo, hasta el momento solo se han hecho estudios en modelos animales, en los que se han obtenido diferentes niveles de eficacia que van desde el 50 hasta el 100%. Por lo que la quimioterapia es hasta la fecha la forma efectiva de controlar la amebiasis.

### **1.7. Tratamiento y control contra la amebiasis**

El tratamiento de la infección depende del diagnóstico clínico, por ejemplo un paciente que presenta un cuadro de colitis amebiana no requiere el mismo tratamiento que un portador asintomático, debido a los sitios de infección y los mecanismos de acción de los medicamentos empleados. Los medicamentos empleados contra la amebiasis suelen dividirse en lumbinales como: las 8-hidroxiquinolonas halogenadas (yodoquinol) y las amidas (teclozan, etofamida, quinfamida); o los tisulares como: nitroimidazoles (metronidazol, secnidazol, ornidazol). El metronidazol presenta una acción mixta es decir, tanto luminal como tisular (Guerrant, 2001).

Los esquemas de tratamiento se resumen en la **Tabla 2**. Algunos médicos recomiendan el tratamiento de los pacientes asintomáticos como una medida de control de la transmisión. Sin embargo, estudios donde se utilizaron tratamientos quimio-profilácticos para curar y evitar la reinfección por amebiasis, solo se observaron resultados favorables a corto plazo; ya que desafortunadamente cuando se suspende el tratamiento quimio-profiláctico se vuelve a los mismos índices de prevalencia (Tay, 2003).

En algunos casos de amebiasis se requiere manejo quirúrgico, como en la colitis amebiana fulminante, apendicitis amebiana, la perforación intestinal y el ameboma (Filice, y Col., 1992).

### **1.7.1. Emetina**

La emetina es un alcaloide de origen natural, que se encuentra de forma abundante en la raíz de la planta *Cephaelis ipecacuanha* (Wiegrebe, y Col., 1984). El hidrocloreuro de emetina o dehidroemetina, es un importante amebicida tisular, su mecanismo de acción se basa en inhibir el proceso de alargamiento durante la síntesis de las proteínas, bloqueando la translocación del peptidil-tRNA (Grollman, 1968). Por su parte Villalba, y Col., (2007a) demostraron que la emetina inducía muerte celular mediante apoptosis en trofozoítos de *E. histolytica*, Donde se observaron cambios morfológicos, la condensación de la cromatina y fragmentación del DNA, así como una sobreproducción de especies reactivas del oxígeno.

El uso de este medicamento tiene varios efectos colaterales (Knight, y Col., 1980), sin embargo, sigue utilizándose en el tratamiento de amebiasis extraintestinal. El fármaco se excreta lentamente por el intestino y en la orina, lo cual provoca que se

acumulen altas concentraciones de este compuesto en el hígado, corazón y otras vísceras. Los efectos colaterales que se presentan por el uso de este medicamento son los siguientes: cardiopatías, hipotensión arterial, insuficiencia cardíaca, nefropatías e insuficiencias hepáticas (Knight, y Col., 1980). Por otro lado, estudios realizados en el laboratorio han permitido generar clonas resistentes a emetina, las cuales crecen a concentraciones elevadas (225  $\mu\text{M}$ ) de esta droga (Orozco, y Col., 1985). Los trofozoítos de la clona C2 presentan un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR del inglés multi drug resistant), por lo cual, presentan resistencia cruzada contra colchicina, iodoquinol y diloxamina, pero no presentan resistencia para daunomicina y actinomicina D (Ayala, y Col., 1990), los genes *EhPgp1*, *EhPgp5* y *EhPgp6*, podrían participar en la resistencia a múltiples fármacos, así como, el incremento de la vida media del ARNm del gen *EhPgp5* (Descoteaux, y Col., 1995; López-Camarillo, y Col., 2003).

### **1.7.2. Metronidazol**

El metronidazol es conocido por su alta efectividad como amebicida y es considerado el medicamento de elección para el tratamiento de la amebiasis (Nichols, 2003). No obstante, este medicamento es teratogénico y mutagenético en algunos sistemas microbiológicos; además hay reportes en roedores dónde el metronidazol se asocia con carcinogénesis (Kazy, y Col., 2005; Sisson, y Col., 2006; Sloan, y Col., 1983). En estudios en los cuales se administró metronidazol en la dieta de ratones se observó el desarrollo de tumores benignos y malignos en pulmones (adenomas, adenocarcinomas y carcinomas en ambos sexos, y linfomas en ratones hembras. Por otro lado, estudios realizados en ratas han reportado el

desarrollo de cáncer hepático (carcinoma hepatocelular), tumores en glándulas mamarias (fibroadenoma) en ratas hembra, tumores en la glándula pituitaria (adenoma) y tumores en testículos (tumores en células de Leydig). (Rustia, y Shubik, 1972; IARC, 1977). Aunque hasta la fecha estudios epidemiológicos realizados en humanos para evaluar la relación del cáncer inducido por metronidazol en humanos no son satisfactorios. En mujeres con tratamiento con metronidazol para la tricomonosis se observó un aumento en el desarrollo de cáncer cervicouterino; sin embargo, este estudio no fue estadísticamente significativo (Beard, y Col., 1979), Además, hay que destacar que la tricomonosis es un factor de riesgo para el desarrollo para cáncer cervical (Beard, y Col., 1979).

El metronidazol tiene varios efectos adversos, siendo los más comunes los disturbios gastrointestinales, especialmente resequedad en la boca, sabor metálico, náuseas, vómito, diarrea o constipación, vértigo, dolor de cabeza y efectos neurotóxicos (Nichols, 2003).

Por otra parte, estudios realizados *in vitro* han inducido cepas resistentes al metronidazol (Samarawickrema, y Col., 1997; Wassmann, y Col., 1999). La resistencia de *E. histolytica* hacia el metronidazol se debe al incremento en la expresión de las enzimas superóxido dismutasa de hierro (Fe-SOD) y peroxirredoxina, y en la disminución de la expresión de las enzimas flavin reductasa y ferredoxina 1 (Samarawickrema, y Col., 1997; Wassmann, y Col., 1999). La activación de la Fe-SOD implica la destoxificación de radicales libres y en este contexto puede remover los radicales del nitrógeno derivados de la activación del metronidazol (Samarawickrema, y Col., 1997). La resistencia a la terapia con el metronidazol se ha presentado en algunos pacientes, por lo que, se necesita buscar

métodos o fármacos adicionales para el tratamiento de la amebiasis (Singh, y Kashyap, 1989; Hanna, y Col., 2000).

Por su parte, los derivados sintéticos de los 5-nitroimidazoles también se han utilizado para el tratamiento de la amebiasis, y se ha observado que tienen una mejor actividad respecto al metronidazol, sin embargo, siguen presentando los mismos efectos colaterales.

**Tabla 2. Esquema de tratamiento contra la amebiasis**

<b>Patología</b>	<b>Medicamento</b>	<b>Duración</b>
<b>Portador asintomático</b>	Teclozan, 500 mg	Cada 12 h / 3 dosis
	Etofamida, 500 mg	Cada 12 h / 3 dosis
<b>Colitis amebiana</b>	Metronidazol, 500 mg	Cada 8 h / 7-10 días
	Tinidazol, 2000 mg	Cada 24 h / 2 días
	Secnidazol , 2000 mg	Cada 24 h / 5-7 días
<b>Amebiasis extraintestinal</b>	Clorhidrato de emetina 40 mg	Cada 24h / 5-10 días
	Metronidazol, 500 mg	Cada 8 h / 10 días
	Tinidazol, 2000 mg	Cada 24 h / 3-5 días
	Secnidazol , 2000 mg	Cada 24 h / 5-7 días

## **1.8. Identificación de nuevas alternativas para el tratamiento de la amebiasis**

Las plantas son una fuente importante para la búsqueda de nuevos agentes para el tratamiento de agentes infecciosos y parasitarios. Se ha demostrado que preparaciones tradicionales a partir de plantas medicinales, poseen actividad contra *E. histolytica* (Tona, y Col., 1998). Esto se debe a la presencia de compuestos fitoquímicos dentro de los cuales se han identificado alcaloides, antraquinonas, flavonoides, saponinas, esteroides y terpenos y taninos (Tona, y Col., 1998). La (-)-epicatequina es un compuesto que pertenece a la familia de los flavonoides y tiene su actividad amebicida al alterar la función del citoesqueleto y por ende afecta el mecanismo de virulencia, al disminuir la adhesión, migración, fagocitosis y citólisis (Bolaños, y Col., 2014).

Así mismo, otros flavonoides pertenecientes al grupo de las proantocianidinas como la geranina C y geranina D, también presentan actividad contra *E. histolytica* (Calzada, y Col., 2001; Calzada, y Col., 1999). Estas geraninas se encontraron en el geranio *Geranium niveum*, el cual, es endémico del estado de Chihuahua, México, y es utilizada como una planta medicinal por los Tarahumaras para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales (Calzada, y Col., 2001; Calzada, y Col., 1999). La IC<sub>50</sub> que presentaron las geranina C y geranina D fueron de 52.0 y 28.6 µg/ml respectivamente (Calzada, y Col., 2001).

Por su parte, Calzada, y Alanis., (2007) identificaron un grupo de flavonoides que tienen actividad anti-amebiana, estos flavonoides son la tilirosida y la quercitrina. La IC<sub>50</sub> que presentan estos compuestos son de 17.5 µg/ml y 24.3 µg/ml respectivamente.

El compuesto incomptina A, que pertenece a los sesquiterpenos, también posee actividad amebicida contra *E. histolytica* con una IC<sub>50</sub> de 2.6 µg/ml (Velázquez-Domínguez, y Col., 2013). Este compuesto disminuye la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético de *E. histolytica* (Velázquez-Domínguez, y Col., 2013).

También, se ha identificado un compuesto en las zarzamoras (*Rubus coriifolius*) que presenta actividad contra *E. histolytica*, este compuesto es el ácido elágico (Alanís, y Col., 2003). Este ácido, es un polifenol que protege a muchas plantas contra la luz ultravioleta, virus, bacterias y parásitos. Así mismo, presenta actividad antioxidante en modelos animales y actividad antiproliferativa en células cancerosas (Seeram, y Col., 2005; Narayanan, y Col., 1999).

Por otro lado el resveratrol, que es un compuesto polifenólico que pertenece al grupo de los estilbenos, los cuales se expresan en las plantas en respuesta al estrés (Chong, y Col., 2009), y se ha demostrado que tiene propiedades antivirales, bactericidas, antifúngicas y antiparasitarias (Docherty, y Col., 1999; Chan, 2002; Kedzierski, y Col., 2007), Lo que lo hace un compuesto interesante para evaluar su actividad antiparasitaria contra *E. histolytica*.

### **1.9. Estructura química del resveratrol**

El resveratrol un compuesto polifenólico que pertenece al grupo de los estilbenos, cuyo nombre químico según la IUPAC es 5-[(E)-2-(4-hidroxifenil)etenil] benzeno-1,3-diol, también se conoce con los nombres de *trans*-3,5,4'-trihidroxistilbeno o *trans*-resveratrol (**Fig. 5**)

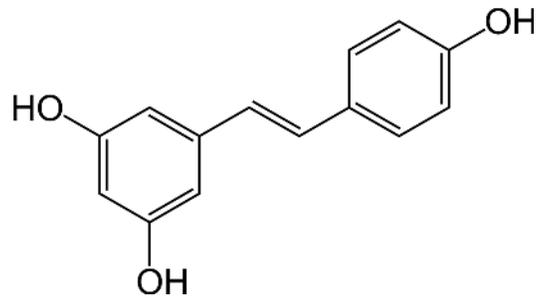


Figura 5. Estructura química del *trans*-resveratrol.

El resveratrol confiere efectos benéficos en animales y en humanos, dentro de los efectos que se han presentado en humanos son: actúa como agente quimiopreventivo contra el cáncer, es un cardioprotector, es un antidiabético, inhibe la inflamación, es un antioxidante, induce autofagia, tiene efectos antiapoptóticos, e induce la apoptosis en ciertos tipos de cánceres (Kelly, 2010; Chang, y Col., 2011; Wu, y Col., 2011; Shi, y Col., 2011; Zhou, y Col., 2011).

### **1.10. Uso del resveratrol contra diversas enfermedades**

La actividad más sobresaliente del resveratrol es su actividad antioxidante. El daño causado por oxidación, propicia el desarrollo de diversas enfermedades como, desordenes cardiovasculares, neurodegenerativos y cáncer (Mikstacka R., y Col., 2010).

El Resveratrol protege contra la hidroxiperoxidación de lípidos en eritrocitos, inducida con  $H_2O_2$ , ya que inhibe la lipoperoxidación catalizada por Fe (II), actuando como un limpiador de radicales peroxil-lípidos de la membrana impidiendo la reacción de Fenton (Mikstacka, y Col., 2010). También, se ha visto que el resveratrol incrementa la actividad de las enzimas encargadas de proteger contra el estrés

oxidativo, como: superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD), SOD1 (Robb, y Col., 2008), catalasa y hemoxigenasa-1. Esto protege a las células de una muerte celular inducida por especies reactivas del oxígeno (ERO). (Robb, y Col., 2008; Zheng, y Col., 2010).

### **1.10.1 Resveratrol contra enfermedades cardiovasculares**

La acumulación de ERO propicia el incremento de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos oxidados, los cuales tienen efectos perjudiciales para la salud. Por ejemplo, la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) está implicada en el desarrollo de aterosclerosis por incrementar el riesgo de enfermedad de las arterias coronarias (EAC), lo cual puede conllevar al desarrollo de angina de pecho o infartos (Esterbauer, y Col., 1992; Steinberg, y Col., 1989). Las LDL oxidadas se acumulan de forma anormal en los monocitos subendoteliales células espumosas (Esterbauer, y Col., 1992; Steinberg, y Col., 1989). La acumulación de estas lipoproteínas proporciona un ambiente favorable para la formación del ateroma, así como, para la agregación plaquetaria, lo cual da origen al proceso de arterioesclerosis (Esterbauer, y Col., 1992).

Los polifenoles como el resveratrol tienen la capacidad de prevenir la oxidación de las LDL (Whitehead, 1995), además de su efecto cardioprotector por la producción de óxido nítrico (NO), a través de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS del inglés endothelial nitric oxide synthase) (Wallerath, y Col., 2002). El incremento del NO promueve la vaso dilatación, disminuye la adhesión de leucocitos a las células endoteliales vasculares, y también disminuye la agregación plaquetaria (Wallerath, y Col., 2002). La agregación plaquetaria en la superficie endotelial de

los vasos sanguíneos activa el proceso de formación de trombos, produciendo oclusión vascular. La activación plaquetaria inicia la vía del ácido araquidónico para producir tromboxano A<sub>2</sub>, el cual participa en la adhesión de las plaquetas. El resveratrol frena la vía oxidativa del ácido araquidónico al actuar como un inhibidor de la enzima ciclooxygenasa 2 (COX2) (Frémont, 2000).

Estas observaciones se han realizado en personas que consumen vino de forma moderada, donde se ha demostrado un incremento en la actividad antioxidante, sin embargo, se necesitan hacer más estudios para establecer de forma contundente los efectos benéficos del resveratrol sobre enfermedades cardiovasculares (Whitehead, 1995)

#### **1.10.2. Resveratrol en el proceso de isquemia/reperfusión**

La isquemia/reperfusión (I/R) al miocardio es la principal causa de muerte en los países desarrollados (D'Annunzio, V. 2012) Después de un infarto agudo al miocardio, el tratamiento disponible para reducir el tamaño del infarto y mejorar el resultado clínico es restaurar el flujo sanguíneo (reperfusión) en el miocardio isquémico, por trombólisis, intervención coronaria percutánea primaria o cirugía cardíaca (Yellon, y Col., 2007). Sin embargo, es sabido que la reperfusión puede inducir daño por sí misma, o ser, al menos, tan perjudicial como el déficit de oxígeno que tiene lugar durante la isquemia (Yellon, y Col., 2007)

El preacondicionamiento isquémico es un fenómeno protector y adaptativo el cual consiste en dar episodios breves de isquemia separados por reperfusión intermitente. Esto hace que un órgano sea más resistente a un proceso isquémico subsiguiente de mayor duración (Murry, 1986). En un estudio con ratas, se observó

qué el resveratrol puede simular un preacondicionamiento isquémico en el corazón de forma dependiente del NO. Este compuesto induce la expresión de iNOS, eNOS y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Das, y Col., 2005a). Así mismo, se ha observado que el resveratrol proporciona cardioprotección ante el proceso isquémico, por disminuir el tamaño de la zona infartada del miocardio y el número de cardiomiocitos apoptóticos. Al igual que el preacondicionamiento, el resveratrol activa los receptores de adenosina A1 y A3 e incrementa la fosforilación de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) al incrementar la activación del antioxidante hemo-oxigenasa 1 (OH-1) (Das, y Col., 2005b; Das, y Col., 2006).

El daño cerebral inducido por isquemia/reperfusión disminuye la actividad de la bomba Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> dependiente de ATP, y las defensas antioxidantes (enzimáticas y no enzimáticas), lo cual conlleva a un incremento abrupto de la generación de ERO (Simão, y Col., 2011). Sin embargo, se encontró que la administración del resveratrol previo a la isquemia, disminuyó significativamente la muerte neuronal en el hipocampo y en la zona cortical y redujó las ERO, la peroxidación de lípidos, y el contenido de NO (Simão, y Col., 2011). Estos resultados sugieren que el resveratrol puede utilizarse como un agente para prevenir y tratar la isquemia cerebral (Simão, y Col., 2011).

De igual manera, se ha observado que el uso del resveratrol durante el tratamiento de la I/R en el hígado, disminuye significativamente los niveles de la enzima aminotransferasa, preserva la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, MnSOD y catalasa), previene la eliminación del glutatión reducido y disminuye los niveles de la IL-6 e IL-1 $\beta$ .

Lo cual sugiere, que el uso del resveratrol en I/R en el hígado puede usarse en la prevención de la inflamación secundaria frente a una cirugía hepática en un trasplante (Hassan-Khabbar, y Col., 2008; Hassan-Khabbar, y Col., 2010).

### **1.10.3. Uso del resveratrol en diabetes**

El uso del resveratrol como un suplemento alimenticio en estudios con ratones, ha demostrado una disminución de la acumulación de grasa, así como, un incremento en la sensibilización hacia la insulina, respecto a los ratones control (Baur, y Col., 2006). Además, en ratas diabéticas el uso del resveratrol mostró una disminución significativa de la glucosa y triglicéridos en la sangre, lo cual, es una característica del síndrome metabólico. Así mismo, se presentó síntesis de glucógeno en hígado y captura de glucosa en diferentes tejidos, Por lo que se demuestra de igual manera la sensibilización a la insulina (Su, y Col., 2006). Así mismo, el resveratrol ha mostrado efectos protectores en células endoteliales vasculares, disminución en neuropatías y nefropatías (Kumar, y Sharma, 2010; Sharma, y Col., 2006).

En un estudio realizado en células MIN6 (línea celular de insulinoma de ratón), para elucidar el mecanismo de acción del resveratrol sobre las células beta del páncreas, se observó que en las células tratadas con este compuesto se bloquean los canales de  $K^+$  dependientes de ATP, lo cual favorece la secreción de insulina. Este efecto también se ha observado en líneas celulares de rata (RIN-m5F) y hámster (Hit-T15) (Chen, y Col., 2007). El mecanismo de acción es similar al del fármaco glibenclamida, el cual, está indicado para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 (Chen, y Col., 2007).

También, se ha observado que el resveratrol regula de forma positiva a Sirt2 (del inglés silent mating-type information regulation 2), Sirt2 es una desacetilasa, y

regula de forma negativa a la proteína desacoplante 2-UCP2 (del inglés uncoupling protein 2) e inhibe la secreción de insulina, por lo que, se ha observado que personas con hiperglicemia crónica presentan un incremento de la proteína UCP2 (Zhang, y Col., 2001), lo cual favorece la resistencia a la secreción de insulina. Así que, el tratamiento con resveratrol al incrementar la actividad de Sir2, puede favorecer la secreción de insulina al disminuir la actividad de UCP2 (Zhang, y Col., 2001; Baur, y Col., 2006; Chaudhary, y Pfluger, 2009).

#### **1.10.4. Resveratrol para el tratamiento de padecimientos neurológicos**

Se ha sugerido que, al igual que la restricción calórica, el resveratrol ayuda a preservar y regular los niveles de energía en las células nerviosas y prolonga su vida, al disminuir el estrés oxidativo (Karuppagounder, y Col., 2009). En animales tratados con resveratrol, se observa que hay una disminución significativa de la placa amiloidea en el hipotálamo, el cuerpo estriado y la corteza media del cerebro. Por lo que se sugiere, que en los humanos, las dosis orales de resveratrol, podrían reducir la placa beta amiloide asociada a la enfermedad de Alzheimer (Karuppagounder, y Col., 2009., Anekonda, 2006).

La acumulación de la  $\alpha$ -sinucleína está relacionada con el desarrollo de la enfermedad del Parkinson (Krüger, y Cols., 1999). Este estudio se observó que el uso del resveratrol, potencia la degradación de la  $\alpha$ -sinucleína en las células SH-SY5Y e induce autofagia, mediada por las enzimas AMPK (del inglés AMP-activated protein kinase) y Sirt1 (Wu, y Col., 2011). El incremento de la actividad de estas enzimas por el uso del resveratrol, sugiere que este compuesto puede ofrecer un papel neuroprotector en la enfermedad de Parkinson (Wu, y Col., 2011).

Por otro lado, se ha observado que la Sirt1 y AMPK incrementa la actividad del coactivador alfa del receptor activador de la proliferación de peroxisomas gamma (PGC-1 $\alpha$ ) (Ho, y Col., 2010). Este cofactor regula la expresión de varias proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa y de lípidos, así como de la homeostasis energética en la mitocondria. En estudios en ratones deficientes de PGC-1 $\alpha$  se ha demostrado que estos presentan movimientos espasmódicos rápidos y súbitos, concordante con la enfermedad de Huntington. Así mismo, en modelos de ratones con Huntington hay un disrupción con la actividad del PGC-1 $\alpha$  (Lin, y Col., 2004; Cui, y Col., 2006). De acorde a estos resultados el uso del resveratrol favorece el incremento de la actividad del PGC1- $\alpha$ , así como disminuye la expresión de genes blancos del PGC1- $\alpha$ , como el factor-1 respiratorio nuclear (NRF-1) y la proteína desacoplante 1 (UPC1), de igual manera, incrementa numerosos genes implicados en la detoxificación de las ERO, lo cual puede ayudar al tratamiento de la enfermedad de Huntington (Sun, y Col., 2010).

#### **1.10.5. Resveratrol como compuesto antiinflamatorio**

En diversos estudios se ha observado la actividad antiinflamatoria del resveratrol lo que sugiere su uso en diversa patologías. En un estudio realizado en ratones tratados con resveratrol se observó una disminución en la expresión de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , así como de la molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y de enzima la iNOS (Pearson, y Col., 2008).

El asma es otra de las patologías dónde podría utilizarse el resveratrol, dado que en un estudio realizado en células epiteliales de pulmón se observó una disminución

de liberación de la citocina IL-8, inhibición de la expresión de NF- $\kappa$ B, iNOS y COX-2 (Donnelly, y Col., 2004). De manera similar a lo observado en cultivos celulares de macrófagos alveolares que provenían de pacientes con enfermedades crónicas obstructivas de pulmón (Culpitt, y Col., 2003).

En la osteoartritis también se puede emplear el resveratrol, ya que estudios con cultivo de condrocitos primarios estimulados con IL-1 $\beta$  presentaron apoptosis e inflamación y un incremento en el VEGF, metaloproteinasas 3 y 9 (MMP-3 y MMP-9 respectivamente) y COX-2; en contraste, condrocitos tratados con IL-1 $\beta$  y resveratrol disminuyeron de forma considerable la activación de estas moléculas y procesos celulares (Shakibaei, 2008).

Además, en un modelo murino donde se indujo colitis crónica, se percibió que en los ratones tratados con resveratrol las citocinas inflamatorias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , así como la actividad de iNOS y COX-2, disminuyeron significativamente, y se incrementó la interleucina inmunoreguladora IL-10 (Sharma, y Col., 2007). Por su parte, en macrófagos activados con lipopolisacáridos se observó que el resveratrol inhibió la secreción de IL-1, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , y TNF- $\alpha$ , de la misma forma, disminuyeron las células con marcadores CD28 y CD80, mientras que la producción de IL-10 fue incrementada de forma significativa (Sharma, y Col., 2007). En general el resveratrol puede disminuir tanto la respuesta Th1, como Th2 (Sánchez-Fidalgo, y Col, 2010; Sharma, y Col., 2007).

### **1.10.6. Resveratrol contra el cáncer**

Uno de los temas actuales versa sobre el uso del resveratrol en el tratamiento del cáncer, dado que el resveratrol ha presentado efectividad contra diversas neoplasias como: neuroblastoma, glioblastoma, carcinoma pulmonar, leucemia aguda mieloide, leucemia aguda linfocítica, cáncer de próstata, hepatocarcinoma, cáncer de páncreas, de colon, de mama y de ovario (Pizarro, y Col., 2011; Filippi-Chiela, y Col., 2011; Donnelly, y Col., 2004; Estrov, y Col., 2003; Dörrie, y Col., 2001; Chen, y Col., 2010; Cui, y Col., 2010; Vanamala, y Col., 2011; Shi, y Col., 2011; Opirari, 2004). La propiedad contra el cáncer de este compuesto está dada por la modulación de diferentes vías de señalización celular, que repercuten en la progresión del ciclo celular, inflamación, apoptosis, autofagia, invasión, metástasis, y angiogénesis (Aggarwal, y Col., 2004; Shakibaei, 2009; Opirari, 2004), incluyendo el efecto de fitoestrógeno y la regulación positiva de Sirt1 (Hiroto, y Col., 2011; Pizarro, y Col., 2011).

El resveratrol presenta efectos pleiotrópicos dependiendo de la concentración y el tipo de célula en la que se utilice (Calamini, y Col., 2010). Por ejemplo en células HepG2 (células de hepatocarcinoma) tratadas con resveratrol a dosis bajas (12.5-25  $\mu\text{M}$ ), se observa que el ciclo celular se retrasa sin efectos citotóxicos, sin embargo, a dosis altas (50-100  $\mu\text{M}$ ), este compuesto induce apoptosis en dichas células, así mismo, disminuye la viabilidad celular independiente de apoptosis (Zhou, y Col., 2009).

### **1.10.7. Resveratrol contra enfermedades infecciosas y parasitarias**

El mecanismo de acción del resveratrol sobre bacterias y hongos permanece incierto, sin embargo, el mecanismo que se sugiere en los hongos es la interferencia funcional en las proteínas de membrana, especialmente en las proteínas de mitocondria (Chan, 2002). El resveratrol tiene actividad antiparasitaria *in vitro* contra *Leishmania major* (Kedzierski, y Col., 2007). En este parásito mostró ser eficaz contra las fases de promastigote y amastigote (Kedzierski, y Col., 2007), sin embargo, no se ha indagado sobre el mecanismo de acción del resveratrol contra este parásito, y no se ha demostrado la actividad antiparasitaria *in vivo*. Por otro lado, ratones infectados con *T. gondii* y tratados con resveratrol, presentaron una disminución en la inflamación intestinal, la función de la barrera intestinal se mantuvo y se disminuyó la carga parasitaria; lo cual sugiere, que este fitofármaco puede ser utilizado en la profilaxis, así como en el tratamiento de esta enfermedad parasitaria, no obstante, se desconoce cuál es el mecanismo de acción del resveratrol sobre *T. gondii* (Bereswill, y Col., 2010).

En contraste, la actividad antiparasitaria contra *Philasterides dicentrarchi* nos puede sugerir cual es mecanismo de acción del resveratrol contra los protozoarios. Estudios realizados *in vitro* contra *P. dicentrarchi*, mostraron que el resveratrol induce un estrés oxidativo en el parásito, disminuye significativamente la actividad enzimática de la peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa, e incrementa la actividad de la glutatión S transferasa (Lamas, y Col., 2009). Lo cual indica que disminuye la protección contra las ERO, pero no así, la protección contra el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El resveratrol muestra su actividad antiparasitaria contra *P. dicentrarchi* a través de un mecanismo independiente de apoptosis, dado que no se presenta condensación de la cromatina, ni degradación del DNA (Lamas, y Col.,

2009). Aunque, los parásitos tratados con resveratrol presentaron un incremento considerable en la formación de vacuolas, lo cual sugiere que la muerte celular quizá este dada por autofagia (Lamas, y Col., 2009). Por otro lado, se ha observado que el resveratrol disminuye la virulencia en *Acanthamoeba castellani*, al disminuir el efecto citotóxico y la adhesión a células epiteliales de la microvasculatura de cerebro humano (HBMEC del inglés Human Brain Microvascular Endothelial Cells). (Aqeel, y Col., 2012).

Así mismo, el resveratrol ha presentado actividad antihelmíntica dependiente de la dosis y el tiempo contra el nematodo *Trichinella spiralis*, tanto para las fases de larva recién nacida, como para los adultos (Ozkoc, y Col., 2009). El mecanismo de acción del resveratrol especulado en los nematodos es que el fármaco inhibe el metabolismo de poliamidas, bloquea los canales de calcio, inhibe la mitosis y el consumo del oxígeno (Lamas y Col., 2009; Ozkoc, y Col., 2009).

Debido a los efectos adversos y la factibilidad del surgimiento de cepas resistentes a los medicamentos de elección para el tratamiento de la amebiasis como emetina y el metronidazol, es conveniente buscar y/o desarrollar nuevos agentes antiamebianos que sean más seguros, minimicen los efectos adversos y que presenten una actividad amebicida efectiva.

Con el fin de determinar si el resveratrol tenía actividad antiparasitaria contra los trofozoítos de *E. histolytica*, nosotros evaluamos la actividad amebicida del resveratrol con ensayos de dosis respuesta. Por otra parte, se determinó el tipo de muerte celular que promovía la exposición de resveratrol sobre los trofozoítos de *E. histolytica*, y cuál era el proceso que lo inducía. Así mismo, se evaluó las repercusiones del resveratrol sobre la virulencia de la amiba, y su efecto para prevenir el desarrollo del AHA.

## **2. Justificación**

Los fármacos para el tratamiento la amebiasis presentan varios efectos colaterales, por lo cual se necesitan nuevos fármacos que sean más seguros, minimicen los efectos adversos y presenten una actividad amebicida efectiva.

Los compuestos derivados de plantas como el resveratrol pueden cumplir con dichas especificaciones. Hasta la fecha no existen trabajos respecto a la actividad antiparasitaria de este compuesto contra *E. histolytica*, sin embargo, sí se ha descrito su actividad contra otros parásitos.

### **3. Hipótesis**

El resveratrol presenta actividad amebicida y afecta la virulencia y el enquistamiento de *Entamoeba sp.*

#### **4. Objetivo general**

Evaluar la capacidad amebicida del resveratrol en trofozoítos de *E. histolytica* y estudiar su mecanismo de acción, su efecto en la virulencia *in vitro* e *in vivo* de *E. histolytica* y en el enquistamiento de *E. invadens*

#### **4.1. Objetivos particulares**

1. Evaluar la capacidad amebicida del resveratrol y determinar su IC<sub>50</sub> en trofozoítos de *E. histolytica*
2. Analizar los cambios morfológicos y ultraestructurales de los trofozoítos tratados con resveratrol
3. Analizar si el tratamiento con resveratrol induce estrés oxidativo en trofozoítos de *E. histolytica*
4. Determinar el tipo de muerte celular inducida por el resveratrol
5. Evaluar los efectos del resveratrol sobre la virulencia *in vitro* e *in vivo* de los trofozoítos de *E. histolytica*
6. Identificar los blancos moleculares directos del resveratrol en *E. histolytica*
7. Evaluar el efecto del resveratrol sobre el enquistamiento de *E. invadens*
8. Analizar el efecto terapéutico del resveratrol en el modelo de absceso hepático amebiano en hámster

## **5. Materiales y Métodos**

Los trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS se cultivaron de forma axénica en medio TYI-S-33 completo, suplementado con 10% de suero bovino inactivado por calor (Microlab , Labs., Mex) y con una mezcla de vitaminas Diamond-Tween 80 (In vitro), los cultivos se incubaron a temperatura de 37 °C (Diamond, y Col., 1978). Los trofozoítos se utilizaron en la fase de crecimiento exponencial.

### **5.1. Ensayos de citotoxicidad del resveratrol sobre trofozoítos de *E. histolytica***

Para determinar el potencial amebicida del resveratrol en trofozoítos de *E. histolytica*, se realizaron ensayos de citotoxicidad y se analizaron por medio de curvas de dosis-respuesta. Los parásitos se incubaron en medio TYI-S-33 en presencia de 72, 109, 219, 438 y 876  $\mu\text{M}$  de resveratrol a 37 °C durante 12, 24, 48 y 72 horas (h). Después de los periodos de incubación, se determinó la viabilidad celular por medio de la técnica de exclusión de azul de tripano, y la viabilidad celular se confirmó en algunos experimentos por el ensayo colorimétrico basado en el reactivo WST-1 (Roche). Brevemente, los trofozoítos se enfriaron en hielo durante 10 minutos (min) para desprenderlos de las paredes de los tubos de cultivo, se tomó una alícuota de 1 ml y se centrifugó a 700 x g. La pastilla celular se lavó dos veces con PBS pH 6.8 (NaCl 14.0 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.8 mM ajustado a pH 6.8), se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de PBS pH 6.8 y se adicionaron 10  $\mu\text{l}$  del reactivo WST-1 (Roche). Posteriormente las muestras se incubaron durante 30 min a 37 °C para permitir la reducción del WST-1 mediante el NADH producido en la glucólisis de las células viables. Las muestras se leyeron en un lector de ELISA (Biorad) a una

longitud de onda de 450 nm. El cultivo de *E. histolytica* con medio TYI-S-33 completo se utilizó como control de crecimiento, y el cultivo de *E. histolytica* tratado con etanol a una concentración final de 0.4% se utilizó para evaluar la citotoxicidad del vehículo del resveratrol (Strober, 2001; Ngamwongsatit, 2008)

## **5.2 Estudio morfológico de trofozoítos de *E. histolytica***

Para investigar si el tratamiento con resveratrol afectaba la morfología de los trofozoítos de *E. histolytica*, primero se realizaron observaciones por medio de un microscopio óptico a las 0, 12, 24, y 48 h postratamiento. Para obtener los registros fotográficos se utilizó un microscopio invertido Nikon™ acoplado a una cámara Sony alpha 55.

## **5.3. Análisis del tamaño celular y granularidad celular de trofozoítos de *E. histolytica* bajo el efecto del resveratrol**

Los registros fotográficos se emplearon para realizar las mediciones del diámetro celular de los trofozoítos mediante el software de dominio público ImageJ. La calibración de la escala de pixeles a micrómetros se realizó con el programa ImageJ, con la herramienta “Analyze” y la función “set scale” utilizando como referencia la graduación de una cámara de Neubauer.

Por otro lado, los cambios en el tamaño y granularidad de los trofozoítos se midieron por citometría de flujo, utilizando un equipo Becton Dickinson FACSCalibur. El tamaño relativo se midió en el “*forward scatter*” (FSC) y la granularidad relativa o complejidad interna en el “*side scater*” (SSC). Los trofozoítos sin tratamiento y aquellos expuestos a una IC<sub>50</sub> de resveratrol se lavaron dos veces con PBS pH 6.8 y re-suspendieron en un ml del mismo. Se seleccionaron las coordenadas de la

población de las células sin tratamiento, las cuales, se aplicaron para los trofozoítos tratados con etanol al 0.4% y con resveratrol IC<sub>50</sub>. El análisis de datos se realizó mediante el software FlowJo Versión 10.0 (FlowJo, LLC).

#### **5.4. Microscopia electrónica de transmisión de trofozoítos de *E. histolytica***

Para el análisis ultraestructural, los cultivos de los trofozoítos en presencia y ausencia de resveratrol se cosecharon y se fijaron durante 8 h con glutaraldehído al 1.5%, paraformaldehído al 3% y sacarosa al 5% en un regulador de cocodilato de sodio ajustado a pH 7.4. Se realizaron tres lavados de 10 min con solución de lavado (sacarosa 0.1M y CaCl<sub>2</sub> al 1%) y para preservar las membranas y el glucógeno, se realizó una pos-fijación con tetraóxido de osmio al 1% durante 2 h. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 min con solución de lavado. La deshidratación de las células se llevó a cabo con concentraciones crecientes de etanol (10, 20, 30 40, 50, 60, 70, 80 y 90%) durante 10 min cada una y luego se aplicaron tres pasos de deshidratación con etanol al 100%, durante 30 min cada una. Finalmente se llevaron a cabo deshidrataciones con etanol:óxido de propileno en diferentes proporciones: 2:1 durante 15 min, 1:1 durante 15 min, 1:2 y con óxido de propileno por 15 min. Después se realizó la pre-inclusión, para lo cual se embebieron los trofozoítos en diferentes proporciones de óxido de propileno: resina 2:1 durante 15 min, 1:1 durante 1 h: 1:2 durante 15 min y finalmente con pura resina epóxica. La polimerización de la resina pura se llevó a cabo a 60 °C durante 48 h. Pasadas las 48 h se realizaron cortes finos (60 a 90 nm) y se contrastaron con acetato de uranilo acuoso durante 15 min, con acetato de uranilo alcohólico durante 15 min y con

citrato de plomo durante 20 min, lavando en cada paso con agua destilada. Finalmente, se realizaron las observaciones en un microscopio electrónico de transmisión (Philips Morgagni 268 D).

### **5.5. Análisis *in silico***

El análisis *in silico* se realizó usando la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) La búsqueda de las secuencias proteicas para sistemas de conjugación ATG8 y ATG12 en el genoma de *E. histolytica* se realizó usando como sondas las proteínas homólogas de humano y levadura. Las proteínas homólogas putativas se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios: (i) al menos 20% de identidad y 35% de similitud con la secuencia comparada; (ii) valor-e menor que 0.002. Los dominios funcionales fueron predichos utilizando la misma base de datos en la liga de Pfam (<http://pfam.xfam.org/>).

### **5.6. Obtención de DNA genómico de *E. histolytica***

La obtención del DNA genómico de *E. histolytica* se realizó usando el kit “Wizard® genomic DNA purification Kit” (Promega). Brevemente, los trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento, previamente enfriados durante 10 min, se cosecharon en tubos cónicos estériles de 50 ml, se centrifugaron a 800 g a 4 °C por 5 min. La pastilla celular se re-suspendió en 1.5 ml de PBS pH 6.8 frío estéril y se transfirió a tubos Eppendorf y se centrifugó a 9000 g por 10 seg a temperatura ambiente (TA). El sobrenadante se eliminó y la pastilla celular que contenía los trofozoítos se re-suspendió en 600 µl en la solución de lisis nuclear. Después se adicionó 3 µl de solución de RNasa, el tubo se invirtió cinco veces y se incubó durante 30 min a 37 °C. La muestra se incubó 5 min a TA y pasado este tiempo, se adicionaron 200 µl

de la solución de precipitación de proteínas, se agitó con vórtex durante 20 seg, la muestra se mantuvo 5 min en hielo, y posteriormente se centrifugo durante 4 min a 18 000 g. El sobrenadante que contenía el DNA se recuperó y se transfirió a un tubo nuevo con 600 µl de isopropanol. La muestra se mezcló por inversión y se centrifugó a 18 000 g durante 1 min a TA. El sobrenadante se deshecho y a la pastilla se le adicionaron 600 µl de etanol al 70% a TA. El tubo se mezcló suavemente para lavar el DNA y nuevamente se centrifugó durante 1 min a 18 000 g a temperatura ambiente. El etanol se aspiró y la pastilla se secó a TA. Posteriormente la pastilla se re-suspendió en 100 µl de agua estéril y el DNA se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm

### 5.7. Diseño de oligonucleótidos para el gen *Ehatg8a*

La amplificación del gen completo *Ehatg8a* se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Primeramente se realizó el diseño de los oligonucleótidos para el gen *Ehatg8a* de *E. histolytica*, mediante el programa PCR-Oligomaker (<http://publish.yorku.ca/~pjohnson/AssemblyPCRoligomaker.html>.) A estos oligonucleótidos se les agregaron secuencias reconocidas por las enzimas *BamH* I y *EcoR* I con la finalidad de clonar y expresar la proteína recombinante en el vector pGEX-6P-1 (**Tabla 3**).

**Tabla 3. Oligonucleótidos para la amplificación del gen *Ehatg8a***

Nombre	Secuencia
<i>Ehatg8a</i> -s	5'-GGGGATCCATGGAATCACAACCAAACTTCCT-3'
<i>Ehatg8a</i> -as	5'-CCGAATTCTTAATTTCAAAGACAGATTCTGTAAAC-3'

Para la amplificación por PCR se usaron 100 ng de DNA genómico de *E. histolytica*, 5 µl de cada oligonucleótido iniciador (10 µM), 4 µl de dNTPs (5mM), 10 µl del amortiguador para PCR 10X, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.5 U de Taq polimerasa (Kapa Biosystems) y se ajustó a un volumen final de 100 µl con agua destilada estéril. La mezcla se incubó a 94 °C durante 5 min y después estuvo sujeta a 30 ciclos de amplificación a 94 °C (1.5 min), 54 °C (2 min) y 72 °C (3 min). Como control negativo se utilizaron las mismas condiciones pero se sustituyó el DNA genómico por agua destilada estéril.

### **5.8. Clonación del gen *Ehatg8a***

Para clonar el gen *Ehatg8a* se utilizó 1 µl de la reacción de PCR, 1 µl de plásmido pJET1.2 (Fermentas), 10 µL del regulador de la reacción 2X, 1 µl de la T4 ligasa (Fermentas), y se llevó a un volumen final de 20 µl con agua estéril. Después se agitó con vórtex durante 5 seg. La reacción de ligación se llevó a cabo durante 5 min a TA, dando origen así a la construcción pJET2.1-*Ehatg8a*. Posteriormente la reacción de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes de *E. coli* de la cepa DH5α.

### **5.9. Purificación de los plásmidos**

La purificación de los plásmidos pGEX-6P-1 y pJET1.2-*Ehatg8a* se realizó con la técnica de miniprep de acuerdo a las especificaciones del “kit” FastPlasmid™ Mini (Eppendorf).

### **5.10 Digestión enzimática del gen *Ehatg8* y el plásmido pGEX-6P-1 con las enzimas de restricción *EcoR* I y *BamH* I.**

La digestión por cada microgramo del gene *Ehatg8a* se realizó con 1 µL de las enzimas *BamH* I y *EcoR* I FastDigest, según las especificaciones del fabricante

(Fermentas). La digestión se realizó a 37 °C durante 3 h. Así mismo, la digestión por cada microgramo de vector p-GEX-6P1 se realizó con las mismas enzimas y condiciones mencionadas, el gen y el plásmido se purificaron a partir de geles de agarosa con el “kit” (GeneJET Gel Extraction kit) (Fermentas).

La concentración del DNA restringido se determinó en gel de agarosa al 1.5% usando 1 µg/carril de marcador ladder mix (Fermentas).

### **5.11. Ligación del gen *Ehatg8a* en el vector pGEX-6P-1**

EL producto digerido del gen *Ehatg8a* se ligó al vector pGEX-6P-1 digerido usando una relación molar 5:1, (inserto:vector). Se mezclaron 1.5 µl (5U) de ligasa T4 (New England Biolabs), 3 µl de buffer de ligación 5X (New England Biolabs), 5 µl de inserto (250 moles) y 1.5 µl de pGEX-6P-1 restringido con *EcoRI* y *BamHI* (50 moles) y 4 µl de agua estéril. La mezcla se incubó 16 h a 16 °C. Como control negativo se hizo una mezcla similar omitiendo el inserto. El plásmido resultante se nombró como pGEX-6P-1-*Ehatg8a* y fue transformado en bacterias competentes de *E. coli* BL21 (DE3) PLysS.

### **5.12. Preparación de bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α y BL21 (DE3) PLysS competentes**

A 5 ml de medio Luria Bertani (LB) se le adicionó una colonia de bacterias de *E. coli* de la cepa DH5α o de la cepa BL21 (DE3) PLysS, se incubaron toda la noche en agitación constante a 250 rpm a 37 °C. De estos cultivos se tomaron 2.5 ml y se agregaron a 250 ml de medio LB, se incubaron 2 h con agitación constante a 37 °C hasta obtener una D.O. <sub>595nm</sub> = 0.5. Los cultivos se centrifugaron a 1000 g durante 5 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron

en 100 ml de  $MgCl_2$  0.1 M frío. Nuevamente las bacterias se centrifugaron a 1000 g durante 5 min y los sobrenadantes se descartaron. Otra vez las bacterias se resuspendieron en 100 ml de  $CaCl_2$  0.1 M frío y se colocaron en hielo durante 20 min, se volvió a centrifugar a 1000 g durante 5 min y se descartaron los sobrenadantes. Finalmente las pastillas se resuspendieron en 10 ml de  $CaCl_2$  0.1 M con 1.75 ml de glicerol estéril, se hicieron alícuotas de 50  $\mu$ l en tubos de Eppendorf y se almacenaron a  $-70$  °C hasta su uso.

### **5.13. Transformación de *E. coli***

Para la introducción de los plásmido en bacterias de *E. coli* DH5 $\alpha$  o PlysS, se usaron 2  $\mu$ l de las mezclas de ligación descritas anteriormente, y se mezcló con 50  $\mu$ l de bacterias competentes, las bacterias se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente se aplicó un choque térmico de 42 °C por 90 seg y después se incubaron en hielo por 5 min. Al término de este tiempo, se adicionaron 600  $\mu$ l de medio LB y se incubaron en agitación por 1 h a 37 °C. Finalmente, 200  $\mu$ l de cultivo de las bacterias se sembraron por espatulado en cajas de agar LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) para la cepa DH5 $\alpha$  y ampicilina (100  $\mu$ g/ml) con cloranfenicol (34  $\mu$ g/ml) para la cepa PlysS. Las cajas se incubaron de forma invertida a 37 °C por 24 h.

### **5.14. Análisis de restricción del DNA plasmídico recombinante**

Los plásmidos pJET1.2-*Ehatg8a* y pGEX-6P-1-*Ehatg8a* purificados de las bacterias transformadas se sometieron a restricción enzimática con *BamH* I y *EcoR* I FastDigest (Fermentas), para corroborar la presencia del fragmento de interés. Las clonas que liberaron un inserto de alrededor de 402 pb, correspondientes al tamaño del gen *Ehatg8a*, se resembraron para obtener los abastos de DNA plasmídico.

### 5.15. Secuenciación del plásmidos pJET1.2-Ehatg8a

Para verificar que el gen clonado correspondiera efectivamente al gen *Ehatg8a*, se realizó una secuencia automatizada utilizando oligonucleótidos específicos para el vector pJET1.2 (Tabla 4)

**Tabla 4. Secuencia de iniciadores para secuenciar el plásmido pJET1.2**

Nombre	Secuencia	Posición de Alineamiento
Iniciador de secuenciación pJET1.2 sentido	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'	310-332
Iniciador de secuenciación pJET1.2 antisentido.	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'	428-405

### 5.16. Inducción y purificación de la proteína recombinante GST-EhAtg8

Una colonia de las bacterias de *E. coli* (DE3) PlysS transformadas con el plásmido pGEX-6P-1-*Ehatg8a* se creció en 5 ml de medio LB líquido con ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml) por (3h). Se tomó 1 ml del cultivo, se adicionaron a 500 ml de medio LB-ampicilina-cloranfenicol y se continuó el crecimiento hasta que el cultivo alcanzó una D.O<sub>600nm</sub>=0.6. En este punto se adicionó IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido), a una concentración final de 0.5 mM y se incubó durante 16 h a 16 °C.

### 5.17. Inmunodetección

Los extractos bacterianos separados por SDS-PAGE, fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa utilizando el regulador de transferencia (Tris 25mM, glicina 192mM y metanol 20%). Luego de la transferencia, la membrana se lavó

cinco min con PBS pH 7.4, para posteriormente bloquearla con PBS-leche 5% (PBS-leche en polvo descremada al 5%), durante 16 h a 4 °C. Subsecuentemente, la membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína GST (1:12000) (GE-Healthcare), durante 1 h a TA. Una vez retirado el anticuerpo monoclonal la membrana se lavó cinco veces con PBS durante 10 min.

La unión del anticuerpo monoclonal anti-GST se detectó usando un anticuerpo anti-IgG de ratón hecho en cabra (1:10000), acoplado a peroxidasa (Zymed). Para ello se incubaron las membranas con dicho anticuerpo durante 1 h y posteriormente se lavó de la forma descrita anteriormente.

### **5.18. Prueba de solubilidad de la proteína recombinante**

El cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) PlyS inducido con IPTG 0.5 mM se centrifugó a 500 g por 30 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió con 50 µl de PBS frío por cada mililitro de cultivo. Posteriormente, la muestra se sonicó por ciclos: 3 ciclos de 30 seg a una amplitud de 70%. Después, se tomó una alícuota de 3 ml y se adicionó Tritón X-100 a una concentración final de 1%, se mezcló durante 30 min, subsecuentemente se centrifugó a 10000 g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante y el *detritus* celular se analizaron en SDS-PAGE al 12% para identificar en que fracción se encontraban las proteínas de interés

### **5.19. Purificación de la proteína *EhAtg8* recombinante**

La purificación de la proteína recombinante se realizó mediante afinidad a una matriz de glutatión sefarosa (Sigma-Aldrich). La fracción soluble de los extractos de *E. coli* se aplicó a la glutatión sefarosa equilibrada con PBS 1X y Tritón X-100 al 1%. De esta forma la proteína recombinante quedó retenida en la glutatión sefarosa

hasta su elución con un gradiente de glutatión reducido (Tris-HCl 50 mM, Glutatión reducido 10 mM, pH 8.0) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, y recuperándose las fracciones de lavado y elución, las cuales fueron analizadas por SDS-PAGE 12%, en geles teñidos con azul de Coomassie.

## **5.20. Inmunización de ratones BALB/C con la proteína recombinante *EhAtg8a-GST***

Se utilizaron ratones machos BALB/C, de 4 semanas de edad. Cinco animales se inmunizaron a los días 1, 14 y 21 días por vía subcutánea e intramuscular con 50 µg de la proteína recombinante *EhAtg8a-GST*, junto con el adyuvante TiterMax (Sigma-Aldrich) a una proporción 1:1. Los ratones se sangraron para obtener el suero hiper-inmune que contenía los anticuerpos policlonales. El suero pre-inmune se obtuvo previo al esquema de inmunización y se utilizó como control negativo

## **5.21. Electrotransferencia de extractos proteicos e inmunodetección de la proteína *EhAtg8***

Los extractos proteicos de las amibas se obtuvieron de la siguiente manera; los trofozoítos una vez cosechados y lavados se resuspendieron en un mililitro de PBS pH 6.8 en presencia de una mezcla de inhibidores (fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 µM, iodoacetamida (IA) 100 µM, N-Tonsil- L-lisina clorometilcetona (TLCK) 100 µM y NEM 1 mM). Los trofozoítos se lisaron mediante ciclos de congelación-descongelación; para congelar las muestras se colocaron en nitrógeno líquido por 3 min, después se agitaron vigorosamente por un tiempo de 2 min en el vórtex, realizando incubaciones de 4 °C, se volvían a agitar de manera alternada hasta su total descongelamiento. Los extractos proteicos de amibas se separaron

por SDS-PAGE, y fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad. utilizando la solución de transferencia 1X fría (solución de transferencia 10X: Tris 30 g, glicina 144 g, metanol 20%). Después de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.1%, ácido acético 1%) para verificar la presencia de los extractos proteicos. El exceso de colorante se eliminó con PBS 7.4 y las membranas se bloquearon con PBS-leche 3% (PBS-leche en polvo descremada al 3%) por un tiempo de 16 h a 4 °C.

Para la detección de la proteína *EhAtg8*, la membrana se incubó con los anticuerpos policlonales primarios anti-GST-*EhAtg8a* (utilizados a una concentración de 1:15000). La incubación se realizó a 4 °C por 16 h, posteriormente se realizaron cinco lavados de 10 min cada uno con PBS pH 7.4-Tween 0.05%. Para identificar el complejo antígeno-anticuerpo la membrana se colocó en presencia de los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón acoplados a peroxidasa (Zymed), diluidos 1:10000 en PBS-leche 3% durante 2 h a temperatura ambiente (TA). Al término de la incubación se le realizaron cinco lavados de 10 min con PBS pH 7.4. Finalmente, la unión antígeno-anticuerpo se reveló con el reactivo ECL™ prime (Amersham™), esta solución se puso en contacto con la membrana por un tiempo de 5 min y se documentó en el equipo para detección de quimioluminiscencia microchemi 4.2 (DNR Bio-Imaging Systems Ltd).

Para la detección de la proteína recombinante *EhATG8a* se utilizaron anticuerpos monoclonales primarios anti-GST (Amersham™) y se reveló con 3´3´-diaminobenzidina (Sigma) (0.5 mg disueltos en 12.5 ml de PBS pH 7.4 y 10 µl de

peróxido de hidrógeno al 30%). De esta manera, se realizó el reconocimiento de la proteína recombinante en su forma pura.

Como control interno para evaluar el proceso de autofagia se indujo el enquistamiento en *E. invadens*. Brevemente, los trofozoítos se desprendieron enfriando en agua-hielo durante 10 min, posteriormente, se lavaron con medio LG 47% frío (TYI sin glucosa diluido en agua destilada a una concentración final del 47% v/v). Después  $5 \times 10^5$  trofozoítos se sembraron en 10 ml de medio para enquistamiento LG 47%, suplementado con 5% de suero de bovino adulto. Los tubos se incubaron 48 h a 26 °C. Después de las 48 h, se cosecharon las células (trofozoítos y quistes) y se realizó la extracción de proteínas como se describió previamente para los trofozoítos de *E. histolytica*.

## **5.22. Inmunolocalización de la proteína *EhAtg8* en trofozoítos de *E. histolytica***

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia indirecta, las amibas se fijaron en 1 ml de etanol frío al 95% a 4 °C durante 20 min. Después, las amibas se lavaron dos veces con PBS 7.4, seguido de esto, se bloquearon con suero fetal bovino al 10% a 4 °C durante 5 h. Posteriormente, las preparaciones se incubaron con los anticuerpos policlonales primarios anti-EhAtg8a a una dilución 1:1000 durante 5 h a 4 °C, se lavaron y se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón acoplados a FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Zymed), a una concentración de 1:100 durante una hora en PBS 1X a 37°C. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS 1X y después se realizó el montaje de las mismas con “Vectashield” (Vector Lab.). Finalmente, las muestras se colocaron sobre portaobjetos limpios y estériles y se sellaron colocando barniz alrededor

de cada cubreobjetos. Las muestras se examinaron a través de un microscopio confocal de la marca Carl Zeiss LSM 700. Se documentaron cortes de grosor variable se analizaron con el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### **5.23. Detección de la externalización de fosfatidilserina**

Los trofozoítos tratados y no tratados con resveratrol se despegaron enfriándolos en agua-hielo, posteriormente se cosecharon y se lavaron una vez con PBS 7.4. Después, se resuspendieron  $1 \times 10^6$  trofozoítos en 1 ml del regulador de unión 1X del Kit “Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC” (eBioscience), que contenía 5  $\mu$ l de la proteína Annexina V conjugada a FITC. La mezcla se incubó en oscuridad durante 15 minutos a TA. Las células se lavaron una vez más con el regulador de unión 1X y se re-suspendieron en 200  $\mu$ l del mismo. Las muestras se analizaron por microscopia confocal usando el microscopio confocal de la marca Carl Zeiss LSM 700, así como también por citometría de flujo usando el equipo Becton Dickinson FACSCalibur.

### **5.24. Ensayo de TUNEL**

Para investigar si el resveratrol inducía la fragmentación del DNA de los trofozoítos de *E. histolytica*, se realizó el ensayo de TUNEL (del inglés Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling). Brevemente, los trofozoítos se fijaron con formaldehído al 2% (v/v), durante 60 min a TA. Posteriormente, los trofozoítos se lavaron una vez con PBS 7.4, y se incubaron durante 2 min con la solución de permeabilización (Tritón X-100 al 0.1% en un regulador de citrato de sodio al 0.1%) a 4 °C. Después se realizaron dos lavados con PBS 7.4. Después a los trofozoítos se les adicionó la mezcla de reacción del Kit “In Situ Cell Death

Detection Kit, Fluorescein” (Roche) Las muestras se montaron con “Vectashield” (Vector Lab.) y se observaron en el microscopio confocal de la marca Carl Zeiss LSM 700, Paralelamente, se realizó citometría de flujo y los datos se analizaron en el programa FlowJo.

### **5.25. Detección de la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ERO)**

Los niveles de las ERO fueron determinados con 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA; Sigma-Aldrich). Los trofozoítos se suspendieron en 500 µl de PBS 7.4 con DCFDA 0.4 mM. Las células se incubaron durante 15 min en oscuridad, se lavaron una vez con PBS 7.4 y se analizaron por citometría de flujo utilizando un equipo Becton Dickinson FACSCalibur. El análisis de los datos se realizó con el software FlowJo.

### **5.26. Cuantificación de lípidos peroxidados**

Los trofozoítos ( $1 \times 10^6$ ) se lavaron tres veces con PBS 6.8, y la extracción de los lípidos se realizó con 1.25 ml de cloroformo:metanol 1:2 (vol /vol). La mezcla se agitó aplicando vórtex durante 30 segundos, después se centrifugó a 100 g durante 5 min a TA y se recolectó la capa de cloroformo. Los niveles de peroxidación de lípidos fueron determinados con el uso del kit Peroxidetect™ (Sigma-Aldrich). Brevemente, 100 µl de la muestra se incubaron con 1 ml del Reactivo desarrollador de Color, a TA durante 30 min hasta la formación de color. El color se cuantificó a 560 nm en el espectrofotómetro. Como blanco se usó como metanol al 100%. En cada experimento se realizó una curva estándar con *ter*-BuOOH en concentraciones conocidas (0-16 nmoles) (Wilson, y Col., 2007).

### 5.27. Cuantificación de Ca<sup>2+</sup> intracelular

La concentración del calcio intracelular se evaluó con la sonda fluorescente Fluo-4 AM (Molecular Probes®) (Minta, y Col., 1989). Los trofozoítos se enfriaron en agua-hielo durante 10 min, para desprenderlos de las paredes de las cajas de cultivo. Posteriormente se cosecharon por centrifugación 700 x g durante 5 min y se lavaron dos veces con el regulador I (NaCl 0.116 M, KCl 0.0054 M, MgSO<sub>4</sub> 0.0008 M, D-glucosa 0.0055 M y HEPES 0.05 M, pH 7.0). Después, 1 x 10<sup>6</sup> trofozoítos se resuspendieron en un mililitro del regulador de carga (NaCl 0.116 M, KCl 0.0054 M, MgSO<sub>4</sub> 0.0008 M, D-glucosa 0.0055 M, sacarosa 1.5%, HEPES 0.05 M, pH 7.4, y 6 µM Fluo-4 AM). La suspensión se incubó en oscuridad durante 1 h a 37 °C, aplicando agitación en intervalos de 20 min. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se lavaron cuatro veces con un mililitro del regulador I para remover el exceso de colorante, se tomaron 250 x 10<sup>3</sup> trofozoítos y se adicionaron a un volumen de 2.4 ml del regulador I. La fluorescencia se midió empleando un espectrofluorometro de la compañía PTI (Photon Technology International), la longitud de excitación para el Fluo-4 AM fue de 494 nm y la longitud de emisión fue de 506 nm. La determinación del calcio intracelular se realizó a TA con la siguiente

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \left( \frac{F2 - F3}{F4 - F1} \right)$$

formula

Donde F1 es la señal de fluorescencia obtenida de las células completas; F2 representa la señal de fluorescencia después de adicionarle EGTA 1 mM; F3 representa la señal de fluorescencia después de la lisis con Triton X-100 al 0.4% y F4, representa la señal de fluorescencia después de adicionar CaCl<sub>2</sub> 4 mM

(Grynkiewicz, 1985). La  $K_d$  representa la constante de disociación, con un valor de 345 nM según las especificaciones del fabricante (Molecular Probes®.)

## **5.28. Actividad de calpainas**

Para determinar si el resveratrol incrementaba la actividad de calpainas se realizaron ensayos enzimáticos usando el sustrato Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Sigma-Aldrich), reportado previamente por Kohli, y Col., (1997), como control positivo para evaluar el incremento de la actividad de calpainas se utilizaron trofozoitos tratados con  $H_2O_2$  0.5 mM durante 12 h, similar a lo reportado por Nandi, y Col., (2010). Como controles negativos, se utilizaron trofozoitos no tratados y tratados con etanol al 0.4%. Los extractos proteicos se realizaron de la siguiente manera; los trofozoitos una vez cosechados y lavados se resuspendieron en un mililitro de regulador de Tris-HCl (Tris base 100 mM, EDTA 10 mM, DTT 1 mM, NaCl 145 mM, pH 8.3) en presencia de una mezcla de inhibidores (PMSF 100  $\mu$ M y leupeptina 100  $\mu$ M). La lisis de los trofozoitos se realizó como se describió en la sección (5.21), y los extractos proteicos se cuantificaron por el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). Posteriormente los extractos proteicos se ajustaron a una concentración de 1 mg/ml con el regulador de Tris-HCl. Los extractos proteicos (40  $\mu$ l) se interaccionaron con 160  $\mu$ l de sustrato (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC 50  $\mu$ M,  $CaCl_2$  a una concentración final de 10 mM en regulador de Tris-HCl) (Nandi, y Col., 2010; Ghosh, y Col., 2010). La liberación de AMC (7-amino-4-methylcoumarin) se midió en el fluorómetro Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific). La longitud de excitación para el AMC fue de 355 nm y la longitud de emisión fue de 460 nm.

Por otro lado, para conocer la actividad enzimática de calpaina se realizó una curva estándar de AMC utilizando concentraciones de 0-25 picomoles/ $\mu$ l. Por lo cual la actividad catalítica se reportó como picomoles de AMC liberados por mg de proteínas.

### **5.29. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)**

La determinación de la actividad enzimática de la SOD se realizó con el “SOD Assay Kit” (Sigma-Aldrich). Los extractos proteicos se obtuvieron como se describió en la sección (5.21) y se cuantificaron por el método colorimétrico de Bradford. Posteriormente se ajustaron a una concentración de 1 mg/ml con PBS pH 6.8. Después, se tomaron 20  $\mu$ l de los extractos proteicos y se adicionaron a 200  $\mu$ l de la solución de trabajo. Luego, a la mezcla se le adicionaron 20  $\mu$ l de la solución de enzima trabajo y se incubó durante 20 minutos a 37 °C. La coloración se leyó en un lector de ELISA (Biorad), a una longitud de onda 450 nm. Se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de (0-10 U/mg), usando una SOD comercial (Sigma-Aldrich). Como blanco se utilizó el regulador de dilución del kit (Biller, y Col., 2009)

### **5.30. Cultivo de la línea celular MDCK**

Las células de la línea MDCK (Madin Darby Canine Kidney) se cultivaron en medio DMEM, suplementado con 10% de suero de ternera (Gibco, EUA), insulina (0.08 U/ml) (Eli Lilly) y antibióticos (penicilina 100 UI/ml y estreptomina 100  $\mu$ g/ml). Las células se sembraron a confluencia en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Corning, EUA) y en placas de 48 pozos (Corning, EUA). Se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub>

al 5% con una humedad relativa del 85 al 95%. Las células se utilizaron cuando las monocapas presentaron confluencia (Gonzalez-Mariscal, y Col., 1985).

### **5.31. Efecto citopático de los trofozoítos de *E. histolytica***

Trofozoítos no tratados, tratados con etanol 0.4%, y tratados con resveratrol a concentraciones de 72, 109 y 219  $\mu\text{M}$  se cosecharon y resuspendieron en medio TYI sin suero ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ). En una placa de 48 pozos con monocapas confluentes de células MDCK se incubaron  $8 \times 10^4$  trofozoítos/pozo. A 37 °C por 3 h, hasta que los trofozoítos tratados con etanol 0.4% alcanzaran aproximadamente el 70% de destrucción. Al término de la interacción, la placa se incubó a 4 °C para desprender a los trofozoítos. Las monocapas se lavaron 10 veces con PBS 1X pH 6.8 frío. Las células MDCK se fijaron con glutaraldehído al 2.5% a TA durante 15 min y se lavaron 3 veces con PBS 1X pH 6.8. Posteriormente, las monocapas se tiñeron a TA con azul de metileno al 1% por 10 min. El azul de metileno se eliminó y las monocapas se lavaron 3 veces con una solución amortiguadora de boratos 0.1 M pH 8.7 (Garcia-Rivera, y Col., 1999). La intensidad de color se determinó midiendo la intensidad de pixeles utilizando el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### **5.32. Cinética de eritrofagocitosis de trofozoítos de *E. histolytica***

Para evaluar la eritrofagocitosis de los trofozoítos no tratados y tratados durante 12 h con resveratrol 119  $\mu\text{M}$ , estos se pusieron a interactuar a 37 °C con eritrocitos a tiempos de 2, 5, 10 y 20 min. Para eliminar los eritrocitos no fagocitados, se adicionó agua bidestilada por 10 min. Los trofozoítos se fijaron con glutaraldehído al 2.5% a TA por 30 min. Los trofozoítos se lavaron tres veces con PBS pH 6.8. Los eritrocitos se contrastaron utilizando la tinción de Novikoff (Novikoff, y Col., 1972),

para lo cual, se incubaron las preparaciones por 30 min a 37°C con una solución fresca de diaminobenzidina (3 3'-diaminobenzidina 0.84 mM, 0.048% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Tris-HCl 50 mM, pH 9.5). Luego, las preparaciones se lavaron dos veces con PBS pH 6.8 y se tomaron 10 µl de cada muestra para colocarlos en un portaobjetos y contar bajo el microscopio óptico el número de eritrocitos ingeridos por trofozoíto. Se contaron 100 trofozoítos por cada condición (Orozco, E y Col., 1983).

### **5.33. Ensayos de virulencia *in vivo* de los trofozoítos de**

#### ***E. histolytica***

La virulencia *in vivo* de los trofozoítos no tratados y tratados con resveratrol 109 µM durante 12 h se evaluó por la capacidad de inducir el AHA en hámsteres siguiendo, el protocolo descrito por Tsutsumi, y Col., (1984). Brevemente, bajo condiciones asépticas se anestesiaron los animales por vía intraperitoneal con una dosis de 0.63 mg/kg de pentobarbital sódico (PiSA). A dos grupos de cuatro hámsteres se les efectuó laparatomía y con una jeringa de insulina se retaron por la vena porta con trofozoítos ( $3 \times 10^6$ ) no tratados o tratados con resveratrol en un volumen de 0.2 ml de TYI sin suero. Posteriormente, la herida superficial de cada animal se suturó con hilos de seda negra. Siete días después del reto, a los animales se les aplicó eutanasia por sobredosis de pentobarbital sódico (1.89 mg/kg). El hígado se removió y se tomó registro fotográfico, se pesó el hígado completo y se diseccionó la parte dañada para determinar el porcentaje de daño hepático

### **5.34. Estudio del efecto potencial preventivo del resveratrol sobre la formación del absceso hepático amebiano**

El efecto potencial preventivo del resveratrol se evaluó por su capacidad de prevenir la formación del AHA en hámsteres. El grupo 1; consistió en hámsteres infectados con  $3 \times 10^6$  amibas y que solo se les administró el 0.5 ml del vehículo (etanol al 10%). El grupo 2 consistió en hámsteres infectados con  $3 \times 10^6$  amibas y que se trataron tres veces al día con 20 mg de metronidazol/kg. El grupo 3 consistió en hámsteres infectados con  $3 \times 10^6$  amibas y que se trataron con resveratrol una vez al día con 30 mg/kg. El grupo 4 estuvo constituido de hámsteres infectados con amibas y que se trataron con resveratrol tres veces al día con 100 mg/kg. El tratamiento de los hámsteres se dio por vía oral con la ayuda de una aguja alimentadora de calibre 22. Los animales del grupo 3 fueron tratados con resveratrol dos días previos a la inoculación de los trofozoítos amebianos y en tanto que los del grupo 2 con metronidazol se les administro tres días después de la inoculación de las amibas. Los hámsteres fueron operados e inoculados como se describió en la sección (5.33) El daño hepático, se calculó con base al pesó del hígado completo y de la parte dañada.

### **5.35. Análisis histopatológico**

Para evaluar el daño a nivel histológico de los animales tratados con resveratrol se siguió el protocolo descrito por (Tsutsumi, y Col., 1984). Brevemente, fragmentos de hígados se fijaron en paraformaldehído al 4% en un regulador de fosfatos 0.1 M pH 7.4. Posteriormente, se realizó la deshidratación de las muestras, para dicho proceso se utilizaron concentraciones crecientes de etanol 70% (2 veces), 80% (2 veces), 96% (2 veces) y 100% (2 veces), durante 1 h c/u. Una vez deshidratados

los fragmentos de los hígados, se realizó un proceso de aclaramiento utilizando Xilol (2 veces) durante 1 h. Después, las muestras se infiltraron en parafina fundida a 60 °C, y el Xilol durante este tiempo se evaporó, para que los espacios ocupados por éste fueran sustituidos por la parafina. Posteriormente, se realizó la inclusión de las muestras en parafina para la obtención de cortes, la parafina fundida se colocó a 60°C, en un molde de plástico de forma rectangular y se sumergió el tejido hasta el fondo y se dejó solidificar a TA hasta formar un bloque sólido de parafina con los fragmentos de tejido incluido.

El bloque se cortó en secciones de 4-6 µm, en un Micrótopo (LEICA RM2125RT, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Alemania) con cuchillas desechables.

Después, los cortes se extendieron en un baño de flotación de tejidos. Cada corte se montó sobre un portaobjetos para teñirlos con hematoxilina y eosina. Para dicha tinción las muestras se procesaron de la siguiente manera: los cortes se desparafinaron en un horno a 60°C durante 60 min para eliminar los restos de parafina, después las muestras se trataron con Xilol 100% 5 min (dos veces), alcohol 100% 5 min (dos veces), alcohol 96% 5 min (dos veces), alcohol 80% 5 min (dos veces) y finalmente con agua corriente (5 min). Después de hidratar las muestras, se sometieron a la tinción de Hematoxilina durante 5 min, agua corriente 2 min, alcohol-ácido (etanol al 96% con ácido clorhídrico al 1%) un baño, agua corriente 2 min, agua destilada con hidróxido de amonio al 1%, agua corriente 2 min, alcohol al 96% 2 min, Eosina alcohólica (2 min), Alcohol 96% 5 min (dos veces), alcohol 100% 5 min (dos veces) y Xilol 5 min (dos veces). Las muestras se montaron con resina y se les puso un cubreobjetos. Los cortes histológicos se observaron en un microscopio de luz (Nikon, eclipse 80i, Japón).

### **5.36. Evaluación de la carga parasitaria**

Para evaluar si el tratamiento con resveratrol disminuía la carga parasitaria de *E. histolytica* en los AHA de los hámsteres, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo primario anti-EhCP112 (Invitrogen) hecho en conejo, el cual está dirigido contra una secuencia peptídica de la proteína EhCP112. Los cortes histológicos incluidos en parafina se trataron de manera similar a la sección (5.34) hasta el proceso de hidratación, después se inactiva la peroxidasa endógena con 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluido en metanol absoluto durante 1 h a TA. Posteriormente, los cortes histológicos se incubaron con suero normal de cabra (10%) durante 1 h a TA para bloquear los sitios de unión no específicos, luego se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo policlonal anti-EhCP112 (1:100), subsecuentemente con el anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo (1:300) (Molecular Probes) durante 1 h a TA, después con estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano, posteriormente el revelado se llevó a cabo con una mezcla de diaminobenzidina y 0.04% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y finalmente las preparaciones fueron contrastadas con Hematoxilina. Como control de isotipo se utilizó suero preinmune de conejo.

### **5.37. Inhibición del enquistamiento de *E. invadens***

Con la intención de analizar si el resveratrol tenía efecto en la formación de la fase infectiva de *Entamoeba sp.* Se evaluó el efecto de dicho compuesto usando como modelo a *E. invadens*, ya que hasta la fecha no se ha logrado inducir de forma experimental la formación de quistes en *E. histolytica*.

El enquistamiento de *E. invadens* se realizó como se describió en la sesión (5.20).

El análisis del efecto del resveratrol sobre el enquistamiento de *E. invadens* se

realizó utilizando la IC<sub>50</sub> para *E. histolytica*. Después de 48 h de inducción de enquistamiento, se cosecharon las amibas (trofozoítos y quistes), y se contaron en un microscopio de contraste de fases de la marca Nikon. La eficiencia de enquistamiento, se expresó como porcentaje relativo de enquistamiento. Por otro lado, los quistes se tiñeron con blanco de calcoflúor m2r (Sigma-Aldrich) y se observaron en un microscopio de epifluorescencia. Como control se utilizaron trofozoítos inducidos a enquistamiento solamente con medio LG 47% (Turner, y Cols., 2007).

### **5.38. Identificación de proteínas blanco del resveratrol en *E. histolytica***

Para identificar proteínas blanco para fármacos se utilizan estrategias experimentales, así como, métodos computacionales. En este trabajo, la identificación experimental de las proteínas blanco para el resveratrol en *E. histolytica*, se realizó por medio de la técnica de estabilización de blancos mediada por la afinidad de fármacos DARTS (del inglés drug affinity responsive target stability) (Lomenick, y Col., 2009).

Los extractos proteicos se obtuvieron como se describió en la sección de (5.21). Subsecuentemente, el lisado se clarificó por centrifugación a 18000 g durante 15 min y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Después las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford, y 60 µg de proteínas se mezclaron con resveratrol 1 mM en el regulador de reacción (Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), NaCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM), Como control 60 µg de proteínas con DMSO. La interacción se realizó durante 30 min a TA. Subsecuentemente, se realizó una proteólisis utilizando la proteasa termolisina, se utilizó 2, 10 y 50 ng de termolisina por cada 15 µg de

extracto proteico durante 10 min. Para detener la proteólisis se adicionó EDTA 0.5 M (pH 8.0), el tubo se mezcló por inversión y se colocó en hielo. Las proteínas digeridas se corrieron en geles de SDS-PAGE al 15% y se tiñeron con azul de Coomassie. La visualización y documentación de los geles se realizó con el equipo Gel Doc 1000 y el programa Quantity One (Biorad) respectivamente.

### **5.39. Acoplamiento molecular**

El procedimiento general del acoplamiento molecular consistió en preparar los archivos de entrada para el programa PyRX, para lo cual se obtuvo en primera instancia las estructuras de los receptores y del ligando (Dallakyan, y Olson, 2015). Las secuencias de aminoácidos de las proteínas que se utilizaron como receptores se obtuvieron de la base de datos AmoebaDB: (<http://amoebadb.org/amoeba/showApplication.do>) y luego, se realizó la predicción de las estructuras terciarias de las proteínas a través del servidor RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>) La estructura del ligando (resveratrol) se obtuvo de la base de datos Zinc v12 (<http://zinc.docking.org/>)

Una vez, que se obtuvieron las estructuras se realizó la minimización de energía, la minimización de la estructura de los receptores se realizó en el programa USCF Chimera v1.1 y para la optimización del ligando se utilizó el servidor ProDRG2 (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg>).

Después de optimizar las estructuras, se les adicionaron cargas parciales e hidrógenos polares y luego, los archivos de las estructuras se guardaron con la extensión .pdbqt. Posteriormente, se establecieron cajas en relación al espacio que ocupaba cada uno de los receptores. Y se realizaron los cálculos para la predicción de las diez conformaciones más probables. Los resultados de los cálculos se

exportaron y se transformaron nuevamente a una extensión .pdb utilizando la terminal Cygwin y el comando: `cut -c66 archivo.pdbqt > archivo.pdb`.

Los resultados que se guardaron con la extensión .pdb y se visualizaron en el programa UCSF Chimera v1.1, posteriormente, se guardó la imagen con las diez conformaciones más probables, por otro lado, solamente se guardó la imagen con la conformación más probable. Los aminoácidos que interaccionaron entre los receptores y el resveratrol se visualizaron el programa LigPlot <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>.

## 6. Resultados

### 6.1. Determinación de la actividad amebicida del resveratrol en trofozoítos de *Entamoeba histolytica*

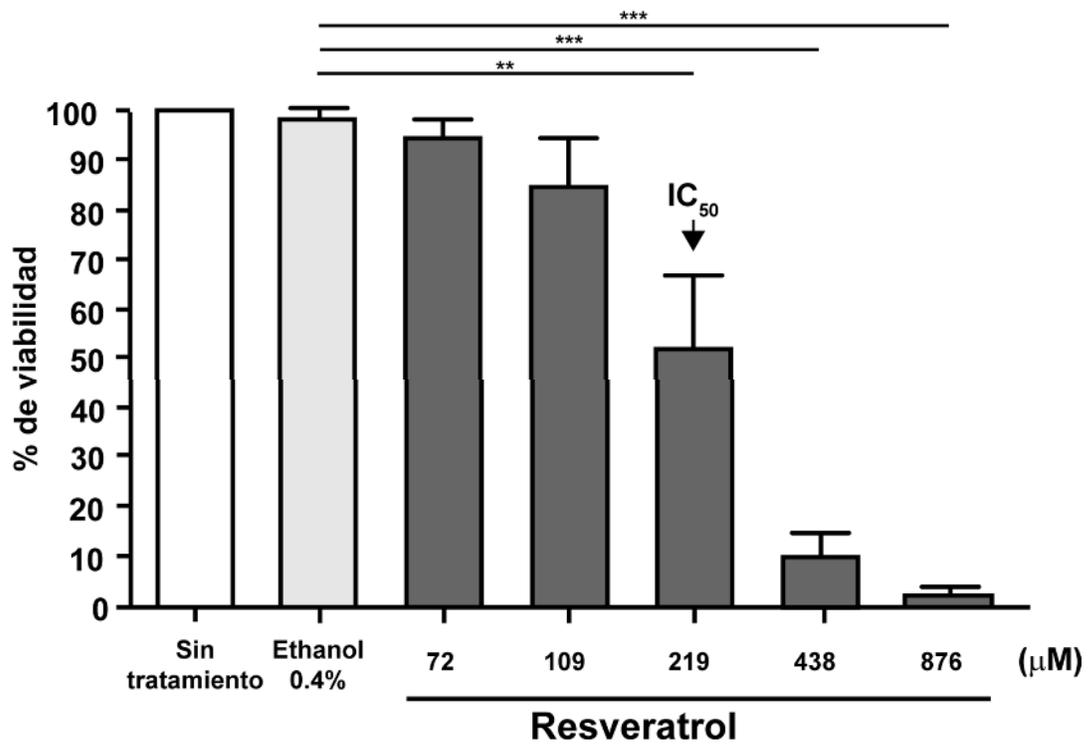
En la búsqueda de nuevos fármacos contra la amebiasis en esta tesis presento los resultados obtenidos con el resveratrol; un compuesto natural, no dañino para humanos y presente en muchos frutos, como la uva, las nueces y otros alimentos (Soleas, y Col. 2001).

Para determinar el potencial amebicida del resveratrol se realizaron ensayos de dosis-respuesta, incubando a los trofozoítos con concentraciones de 72, 109, 219, 438 y 876  $\mu\text{M}$  de dicho compuesto durante 48 h a una temperatura de 37 °C. Como controles internos se usaron amibas sin tratamiento y tratadas con etanol al 0.4% (**Fig. 6**).

El resveratrol presentó un efecto dependiente de la dosis y tiempo. Ya que las concentraciones de 72, 109, 219, 438, y 876  $\mu\text{M}$  mostraron una actividad amebicida del 0, 15, 49, 90 y 98%, respectivamente. Los cultivos incubados con 72  $\mu\text{M}$  resveratrol, presentaron inhibición del crecimiento y 219  $\mu\text{M}$  de la droga mató aproximadamente al 50% de los trofozoítos a las 48 h de incubación. Por tanto, 219  $\mu\text{M}$  se estableció en esta tesis como la concentración inhibitoria del 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) (del inglés: inhibitory concentration). El etanol no produjo cambios significativos con relación a las amibas sin tratamiento, lo cual indica que la muerte celular inducida en los trofozoítos de *E. histolytica* fue por la actividad amebicida del resveratrol y no por un efecto tóxico del vehículo (**Fig. 6**). La  $\text{IC}_{50}$  de resveratrol se utilizó para todos los ensayos en esta tesis, a menos que se especifique lo contrario.

**Figura 6. Efecto del resveratrol sobre trofozoítos de *E. histolytica*.** Se realizaron ensayos de curva dosis-respuesta en cultivos de trofozoítos de *E. histolytica* utilizando concentraciones de 109, 219, 438 y 876  $\mu\text{M}$  de resveratrol. Como controles internos: amibas sin tratamiento y trofozoítos tratado con etanol al 0.4%

El número de trofozoítos se contó a las 48 h con la ayuda de la cámara de Neubauer. La viabilidad de las células se determinó por la exclusión del Azul Tripano. Las concentraciones de 109, 219, 438 y 876  $\mu\text{M}$  de resveratrol presentaron una actividad amebicida del 15, 49, 90 y 98% respectivamente. La  $\text{IC}_{50}$  fue 219  $\mu\text{M}$ . Las barras indican las desviaciones estándar de tres experimentos independientes. \*\* ( $p < 0.05$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ )



## 6.2. Estudio morfológico de *E. histolytica* durante el tratamiento con resveratrol

Durante el proceso de muerte celular, las células exhiben cambios bioquímicos y morfológicos, indicativos del estrés y del daño que están sufriendo. Para estudiar estos cambios en los trofozoítos tratados con resveratrol, en primera instancia, los trofozoítos se examinaron a distintos tiempos a través del microscopio de luz y su morfología se registró por medio de fotografías.

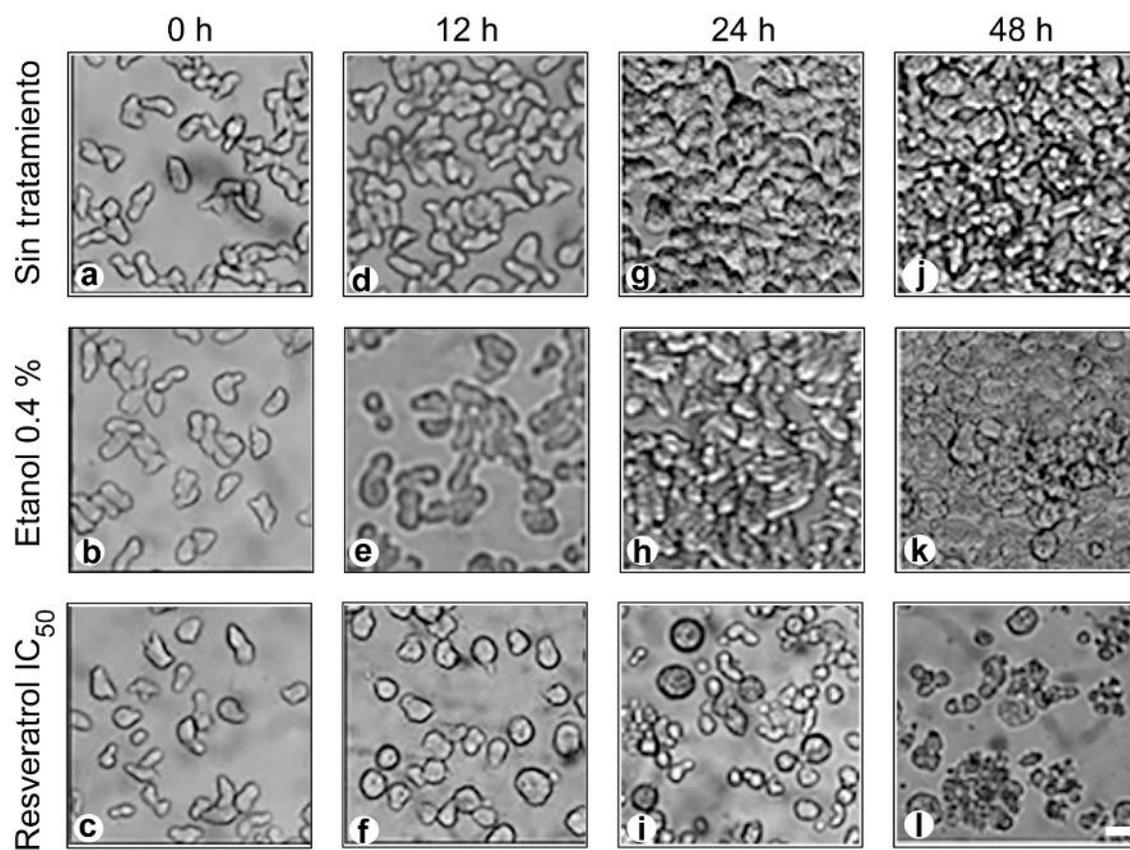
El estudio por microscopía óptica mostró que a las 12 h las amibas tratadas con la  $IC_{50}$  del resveratrol perdieron su pleomorfismo celular y los trofozoítos adquirieron una forma redondeada (**Fig. 7**). A las 24 y 48 h del tratamiento con resveratrol se observó un redondeamiento más acentuado, así como una disminución en el tamaño de las células y la formación de grumos en amibas sin motilidad o con poca motilidad. Los efectos fueron más evidentes a las 48 h (**Fig. 7**). Por su parte, los cultivos tratados con etanol al 0.4% y no tratados presentaron una mayor confluencia y los trofozoítos mantuvieron su pleomorfismo y motilidad celular.

En estos experimentos también se realizó la medición del diámetro de los trofozoítos para determinar cuantitativamente el cambio del tamaño producido por el resveratrol. Para ello, en las fotografías tomadas a través del microscopio óptico se utilizó el programa "ImageJ". Las células en el tiempo inicial (0 h) presentaron un diámetro promedio de 21  $\mu\text{m}$ , en tanto que a las 12 h de tratamiento el diámetro disminuyó aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , a las 24 horas esta disminución fue de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  y a las 48 h de aproximadamente 13  $\mu\text{m}$ . Estos resultados evidenciaron que los trofozoítos tratados por 48 h con la droga presentaron el menor tamaño celular (**Fig. 8**), corroborando que el efecto del resveratrol es dependiente

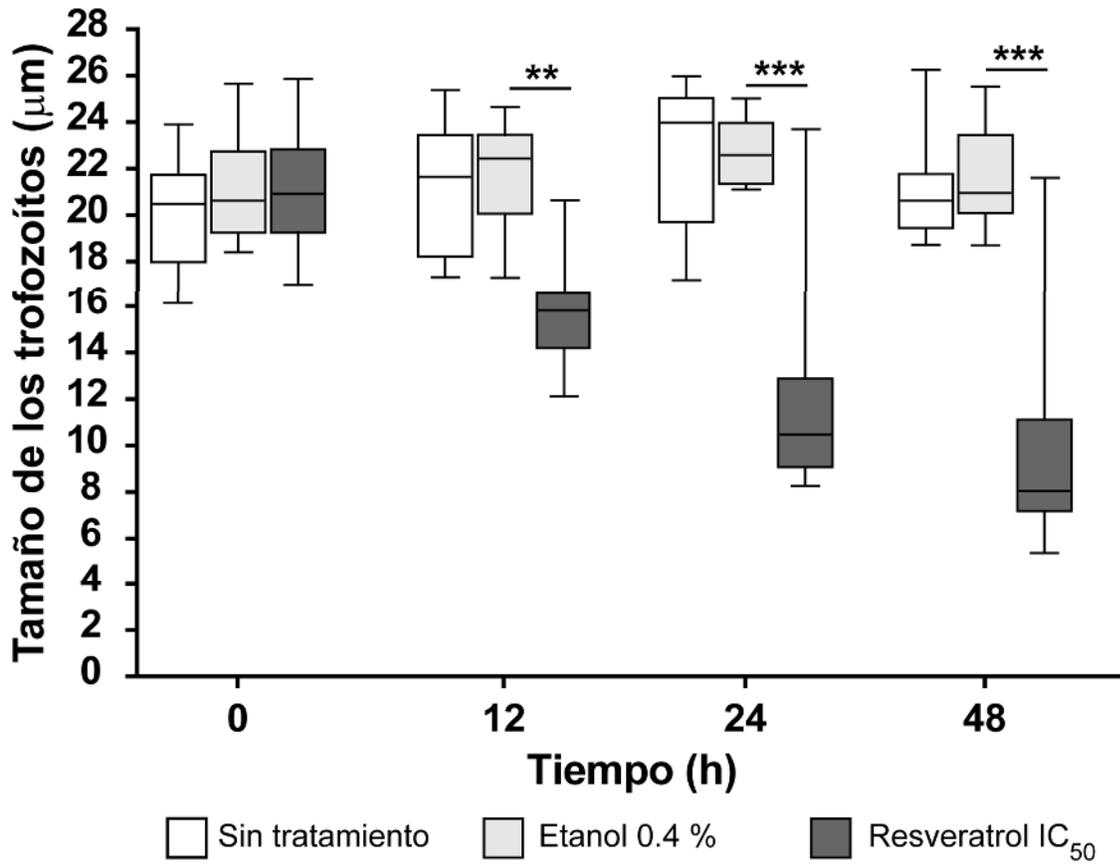
de la dosis y del tiempo de incubación. Además, se observó mayor dispersión en el tamaño celular entre las 24 y 48 h (**Fig. 8**).

Paralelamente, mediante ensayos de citometría de flujo se realizó un estudio sobre el tamaño (eje x) y la granularidad celular (eje y) producida por la droga. Para determinar la población de estudio (R1) se utilizaron trofozoítos sin tratar y se evaluaron 10000 eventos. Los trofozoítos que fueron tratados con resveratrol presentaron una distribución de 54.5, 19.0, 25.7 y 0.85% para los cuadrantes Q1, Q2, Q3 y Q4 respectivamente, por su parte, los trofozoítos no tratados presentaron una distribución de 16.3, 37.3, 38.0 y 8.40% para Q1, Q2, Q3 y Q4 respectivamente; mientras que los trofozoítos tratados con 0.4% de etanol mostraron una distribución de 19.8, 34.7, 37.5 y 7.92% respectivamente, (**Fig. 9**). Estos resultados mostraron que el tratamiento con resveratrol desplazó a la población de trofozoítos hacia los cuadrantes de la izquierda y hacia arriba, haciendo evidente que las amibas tratadas con el resveratrol presentaron un menor tamaño y una mayor granularidad celular (**Fig. 9**).

**Figura 7. Cambios morfológicos de trofozoítos de *E. histolytica* durante el tratamiento con resveratrol.** Los cambios morfológicos se analizaron a través del microscopio de luz y se registraron con una cámara Sony alpha 55. Los cuadros a, d, g y j corresponden a cultivos de trofozoítos sin tratamiento durante 0, 12, 24 y 48 h respectivamente; b, e, h y k corresponden a cultivos de trofozoítos tratados con etanol a una concentración final de 0.4% durante 0, 12, 24 y 48 h respectivamente; c, f, i y l corresponden a cultivos de trofozoítos tratados con la IC<sub>50</sub> de resveratrol por 0, 12, 24 y 48 h respectivamente. Barra 20 µm

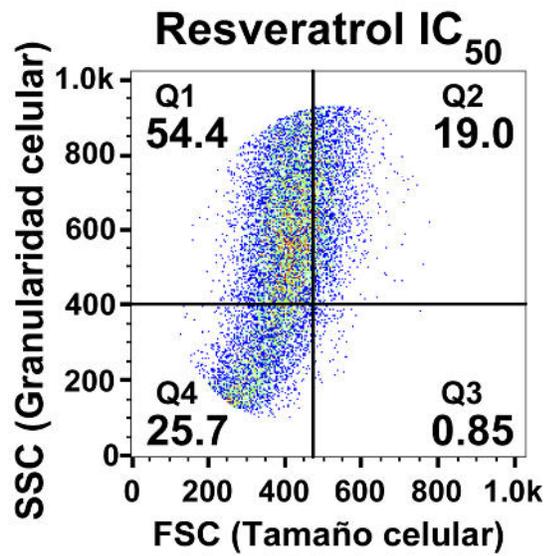
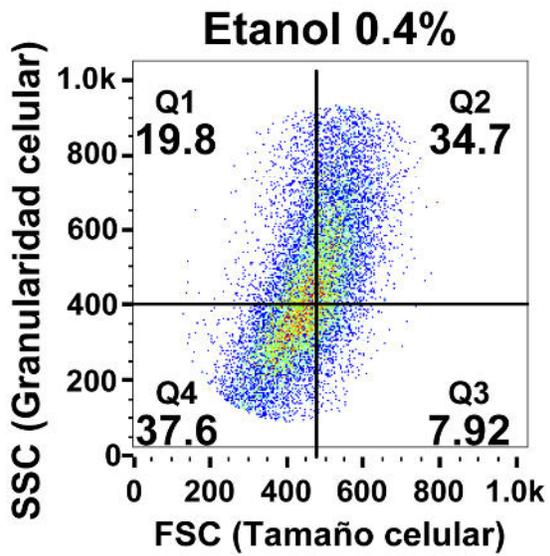
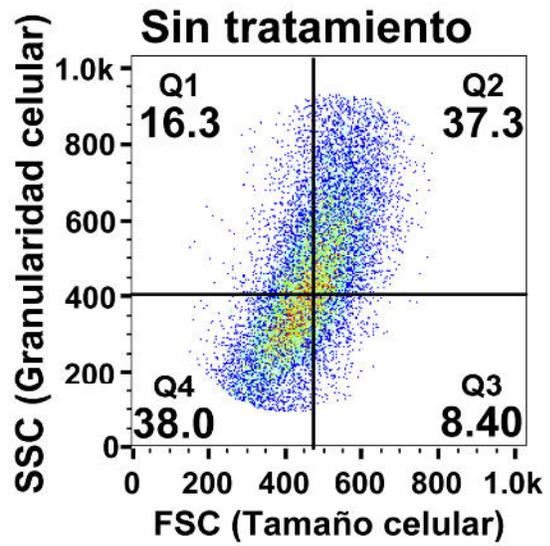
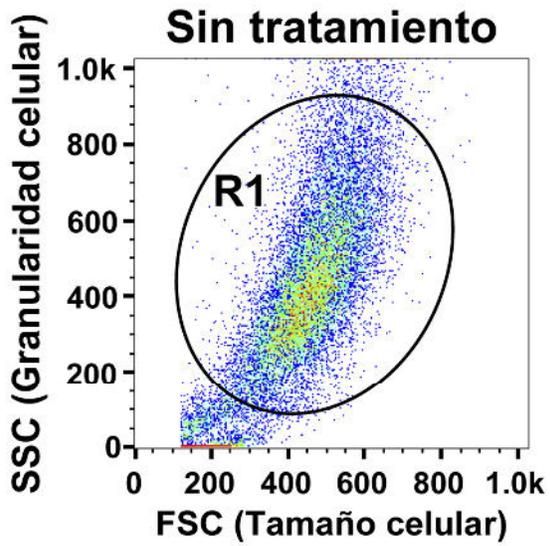


**Figura 8. Tamaño de los trofozoítos de *E. histolytica*.** El diámetro de las células si tratamiento, tratadas con etanol al 0.4% o con la IC<sub>50</sub> del resveratrol por 0, 12 y 24 h se midió con el programa “ImageJ”, en 50 trofozoítos de *E. histolytica*. Las cajas representan el 50% de la población de las células, la barra horizontal representa la media, las barras verticales representan el 25% de la población con los valores máximos y mínimos. \*\*\* (p<0.001).



**Figura 9. Análisis del tamaño y la granularidad en trofozoítos de *E.***

***histolytica***. La gráfica de puntos indica el tamaño celular (FSC) y la granularidad (SSC) de los trofozoítos sin tratamiento, tratados con etanol al 0.4% o con la IC<sub>50</sub> de resveratrol por 48 h. El desplazamiento hacia la izquierda en la gráfica indica la disminución en el tamaño celular, y el desplazamiento hacia arriba indica el incremento en la granularidad de los trofozoítos. El círculo R1 representa las coordenadas que se utilizaron para los experimentos en 10,000 eventos para cada condición.



### 6.3. Análisis estructural de los trofozoítos tratados con resveratrol.

Para estudiar los cambios ultraestructurales producidos en los trofozoítos tratados con resveratrol, estos se analizaron por microscopia electrónica de transmisión (MET).

Los trofozoítos sin tratamiento y tratados con etanol al 0.4% en las imágenes obtenidas por MET mostraron una ultraestructura normal, descrita para trofozoítos de *E. histolytica* (Ludvik, y Shipstone, 1970) (**Fig. 10**). En cambio, los trofozoítos tratados con la IC<sub>50</sub> de resveratrol, presentaron una apariencia redonda, y con una clara disminución en el número de vesículas citoplasmáticas (**Fig. 10**). Sin embargo, se evidenció la presencia de vesículas con desechos celulares, con apariencia de membranas rotas. Además, el citoplasma se observó más electrodensito y con mayor granularidad celular probablemente debido a la presencia de depósitos de glucógeno (**Fig. 10**). Como un control positivo se utilizó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y cuando los trofozoítos se trataron con este compuesto, exhibieron los mismos daños ultraestructurales, que los tratados con resveratrol (**Fig. 10**). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los análisis de citometría de flujo (**Fig. 9**) y comprueban que el resveratrol produjo una reducción del tamaño celular de los trofozoítos y un incremento en la granularidad celular.

Por otro lado, el núcleo también mostró cambios. La cromatina de los trofozoítos tratados con resveratrol y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estaba distribuida en todo el núcleo con una apariencia condensada. En contraste, las amibas no tratadas y tratadas con etanol presentaron una cromatina condensada pero cerca de la membrana nuclear (**Fig. 10**).

Además los trofozoítos tratados con resveratrol presentaron vacuolas con contenido celular, al igual que las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a diferencia de las amibas control donde sus vacuolas no mostraron nada en su interior.

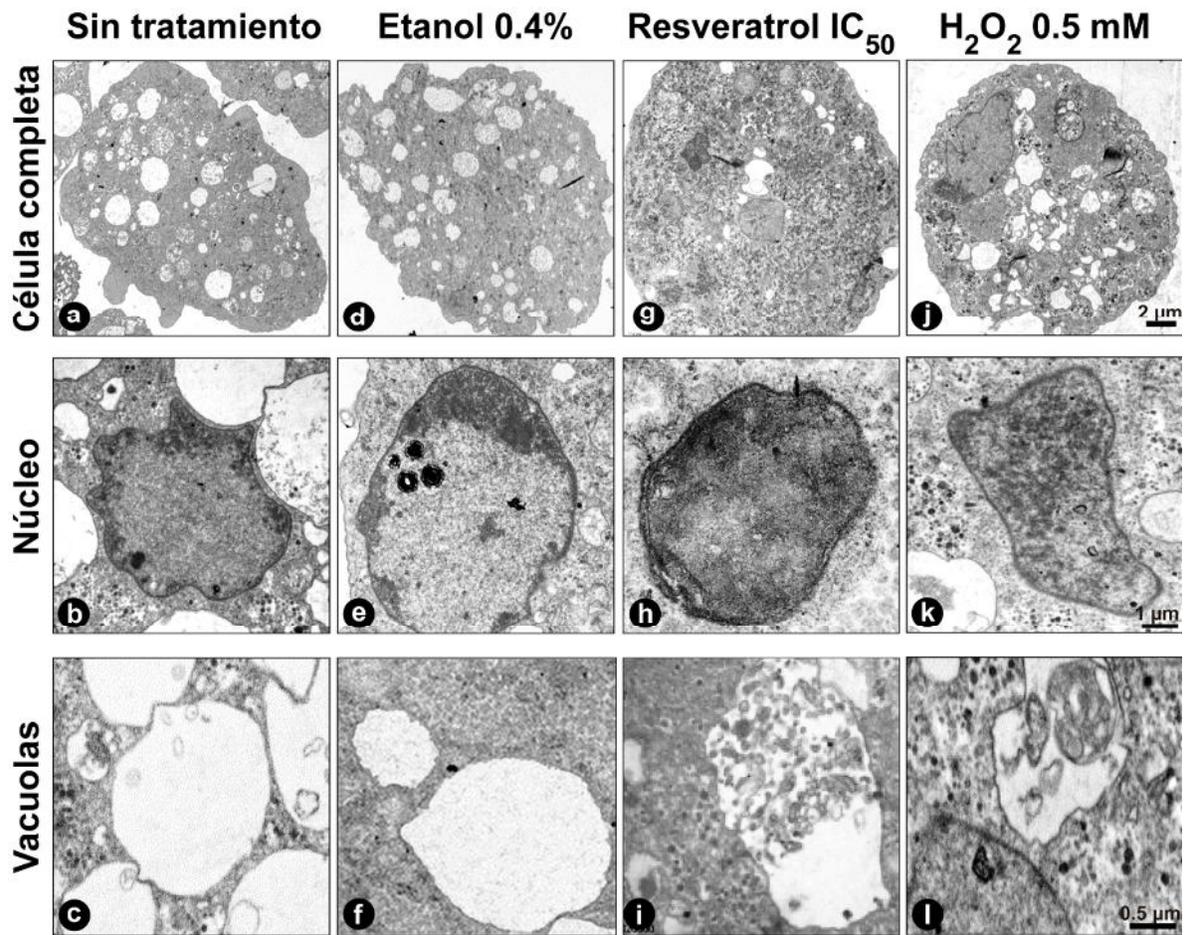
La presencia de contenido membranal en el interior de las vacuolas sugiere que el fitofármaco podría inducir autofagia. No obstante, la anormalidad de la cromatina sugiere la inducción de apoptosis en los trofozoítos tratados con resveratrol. En consecuencia, se decidió realizar los experimentos subsecuentes para elucidar si el tratamiento con resveratrol inducía autofagia o apoptosis en los trofozoítos amibianos.

#### **6.4. Análisis de la generación de especies reactivas de oxígeno por el tratamiento de resveratrol en trofozoítos.**

Se sabe que en otros sistemas el resveratrol induce la muerte celular programada tanto por autofagia o apoptosis, dado que compromete el balance entre oxidantes intracelulares y su sistema de defensa (Kongara, y Karantza, 2012). Estos agentes oxidantes se conocen como especies reactivas del oxígeno (ERO), que comprenden a los radicales de hidroxilos ( $\cdot\text{HO}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). En esta tesis se investigó la generación de ERO en trofozoítos tratados con resveratrol mediante ensayos de citometría de flujo usando el reactivo DCFDA, Este compuesto se oxida por la presencia de las ERO dando origen al compuesto fluorescente 2',7'-dichlorofluoresceína (DCF) (Eruslanov, y Kusmartsev, 2010). El resveratrol indujo la producción de ERO en 28% de los trofozoítos tratados, mientras que solo 5% de las células sin tratamiento o tratadas con etanol generaron ERO. Como control positivo se usó  $\text{H}_2\text{O}_2$ , donde un 93% de las células fueron positivas para ERO (**Fig. 11**).

Se sabe que las ERO producen daño en lípidos y proteínas. Por lo tanto, en esta tesis se investigó si la producción de ellas había producido daño a las biomoléculas del trofozoíto. La primera determinación del daño se realizó midiendo la peroxidación de lípidos, por medio del kit "PeroxidDetect™" (Sigma-Aldrich). El resveratrol indujo la producción de 0.375 nmoles de lípidos peroxidados por cada millón de células. Como control positivo se utilizó  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual, indujo la producción de 1.8 nmoles de lípidos peroxidados por un millón de células. En los trofozoítos sin tratamiento o tratadas con etanol no se detectó la presencia de lípidos peroxidados (**Fig. 12**). Con estos resultados se determinó que el resveratrol induce estrés oxidativo en los trofozoítos de *E. histolytica*.

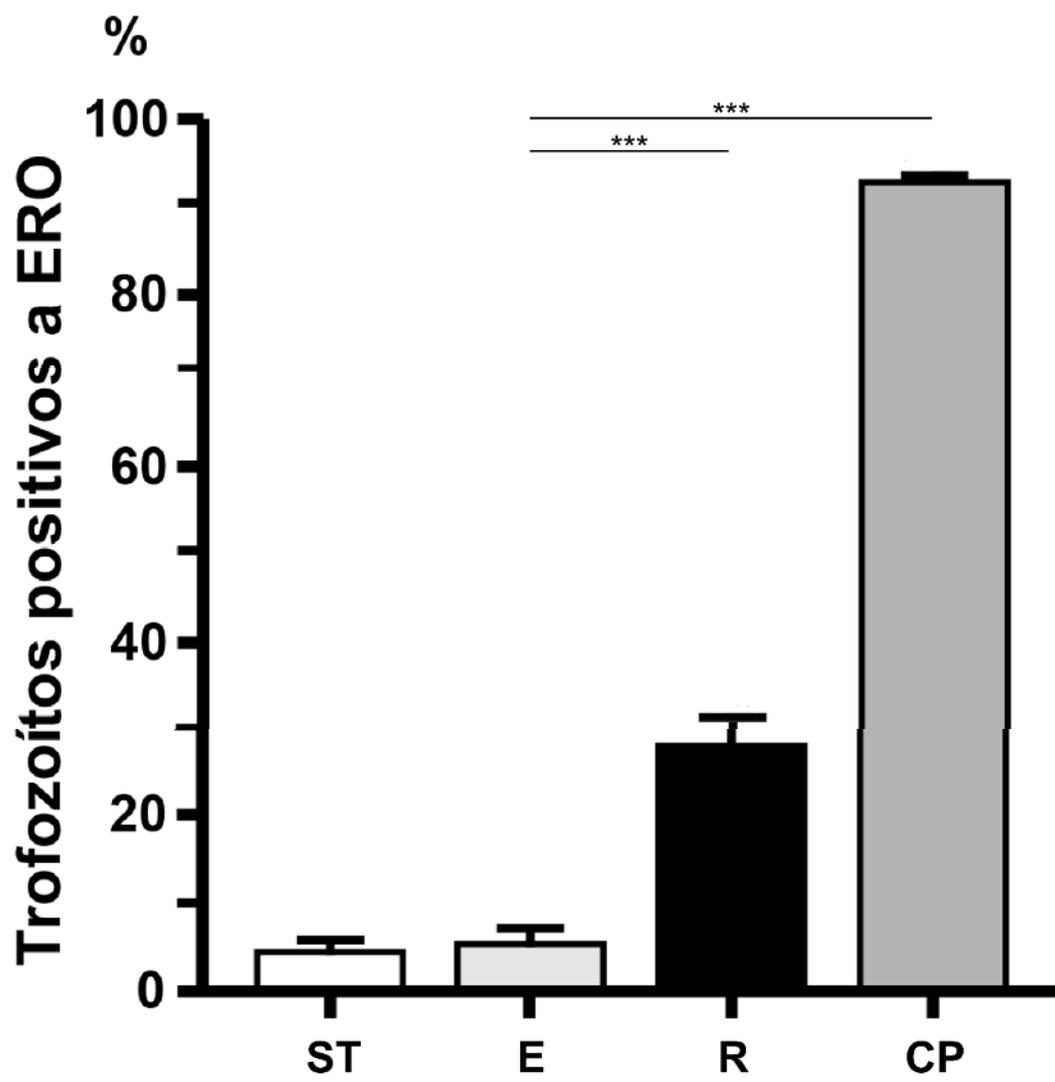
**Figura 10. Cambios ultraestructurales en los trofozoítos de *E. histolytica* tratados con resveratrol. a)** Trofozoíto sin tratamiento **b)** Núcleo de trofozoíto sin tratamiento, **c)** Vacuola citoplasmática de trofozoítos sin tratamiento **d)** Trofozoíto tratado con etanol 0.4% **e)** Núcleo de trofozoíto tratado con etanol 0.4% **f)** Vacuola citoplasmática de trofozoítos sin tratamiento **g)** Trofozoíto tratado con resveratrol **h)** Núcleo de trofozoíto tratado con resveratrol, **i)** Vacuola citoplasmática de trofozoíto tratado con resveratrol **j)** Trofozoíto tratado con 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> **k)** Núcleo de trofozoíto tratado 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, **l)** Vacuola citoplasmática de trofozoíto tratado con 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



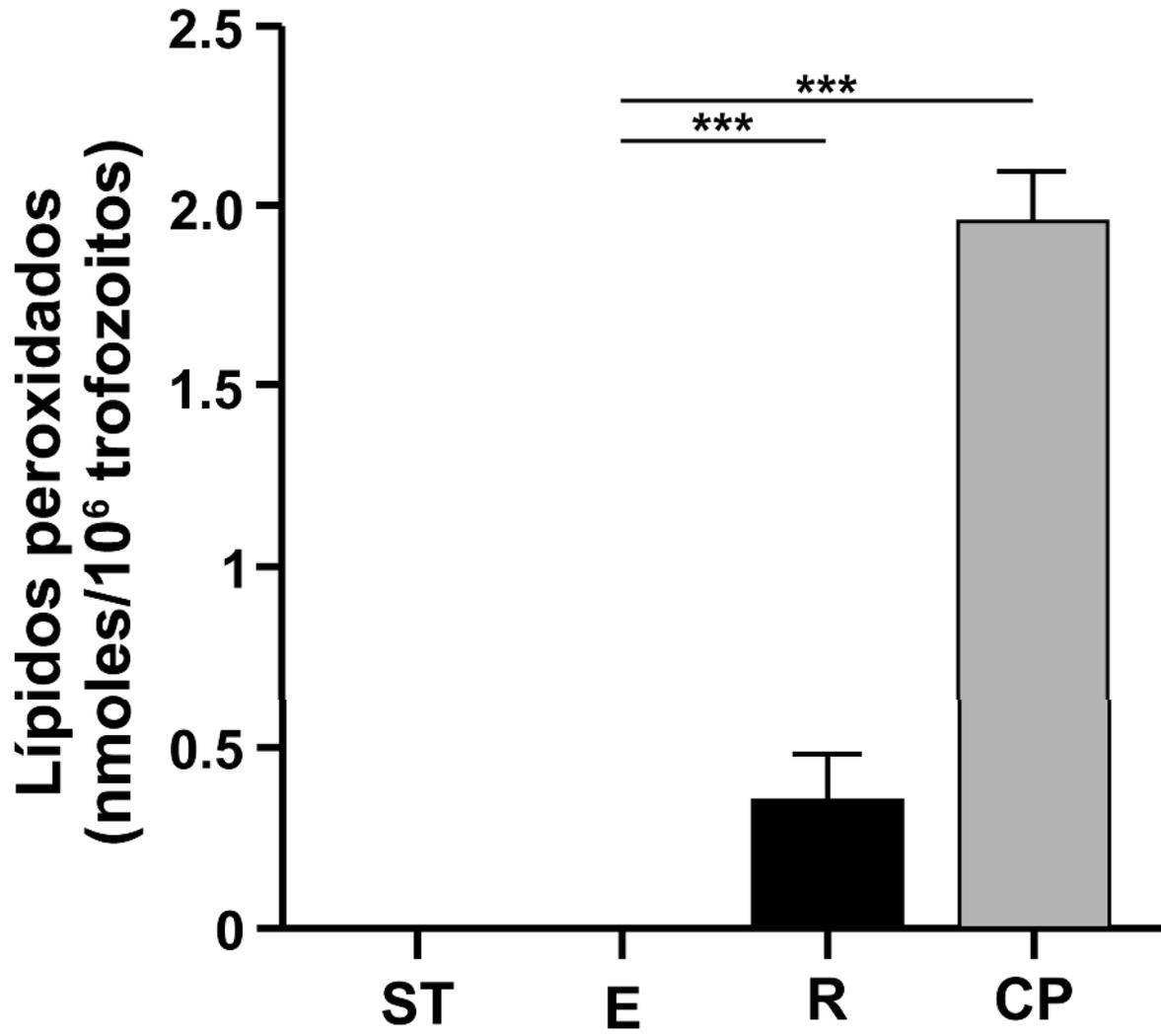
**Figura 11. Generación de ERO en trofozoítos tratados con resveratrol.**

Las ERO se determinaron en trofozoítos si tratamiento, tratados con etanol al 0.4%, resveratrol IC<sub>50</sub>, o con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM. Se utilizó el reactivo DCFDA debido a que la fluorescencia que emite es directamente proporcional a la cantidad de ERO en la célula. El análisis se llevó a cabo por citometría de flujo. El histograma muestra el promedio de células positivas a ERO, la desviación estándar muestra la dispersión que hubo entre los tres experimentos independientes. **ST**: Trofozoítos sin tratamiento. **E**: Trofozoítos tratados con etanol (0.4%). **R**: Trofozoítos tratados con resveratrol con una IC<sub>50</sub> **CP**: Control positivo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM) .Los asteriscos muestran el grado de significancia

\*\* p<0.001



**Figura 12. Cuantificación de lípidos peroxidados en trofozoítos tratados con resveratrol.** La cuantificación de lípidos peroxidados se realizó con el kit PeroxiDetect (Sigma-Aldrich), utilizando extractos totales de lípidos obtenidos de trofozoítos, sin tratamiento, tratados con resveratrol, etanol o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El histograma muestra el promedio de nanomoles de lípidos peroxidados por  $1 \times 10^6$  de trofozoítos, la desviación estándar muestra la dispersión que hubo entre los tres experimentos independientes. **ST:** Trofozoítos sin tratamiento. **E:** Trofozoítos tratados con etanol (0.4%). **R:** Trofozoítos tratados resveratrol con una IC<sub>50</sub> **CP:** Control positivo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM). Los asteriscos muestran el grado de significancia \*\* p<0.001



## **6.5. Análisis *in silico* de las proteínas del sistema de conjugación Atg8 en *E. histolytica***

La autofagia (muerte celular programada tipo II) es un mecanismo proteolítico conservado que degrada el material citoplasmático incluyendo organelos celulares (Isabel-Colombo, y Simon, 2009) y sirve como un mecanismo de defensa bajo condiciones de estrés, como la falta de nutrientes, hipoxia, estrés oxidativo o choque térmico (He y Klionsky, 2009). Sin embargo, la autofagia también se puede inducir con fármacos como la rapamicina, la cual estimula la autofagia por la inhibición del complejo mTOR (Kim, y Col., 2002). Así mismo, los fitofármacos como el resveratrol pueden inducir autofagia en células de cáncer de ovario, así como en el parásito *Philasterides dicentrarchi* (Opirari, y Col., 2004; Moráis, y Col., 2009). Por lo que es probable que el resveratrol pudiera inducir la autofagia en trofozoítos de *E. histolytica*.

En *E. invadens* y en otros parásitos protozoarios durante el enquistamiento se observa el proceso de autofagia (Picazarri, y Col 2008a; Otto, y Col., 2003). Así mismo, otros parásitos con ciclos de vida complejos que dependen del medio ambiente y que implican cambios drásticos en la morfología y el metabolismo, y la autofagia es responsable de los cambios en la composición celular durante su diferenciación (Levine, y Col., 2004. Picazarri, y Col., 2008a).

En *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) se han identificado más de 30 proteínas relacionados con la autofagia conocidas como Atg del inglés (**Autophagy-related**) las cuales participan en la formación de los autofagosomas (Geng, y Klionsky., 2008). Anteriormente se pensaba que las proteínas identificadas en *S. cerevisiae* estaban conservados en todos los eucariontes. Sin

embargo, estudios preliminares muestran que la maquinaria canónica de la autofagia en parasitarios protozoarios es diversa, como posible consecuencia de la adaptación para sus ciclos de vida (Duszenko, y Col., 2011).

Las proteínas Atg se organizan en 6 unidades funcionales, nombrados como: 1) proteína Atg1 y sus reguladores; 2) el complejo Atg12-Atg18; 3) el sistema Atg8; 4) el sistema Atg12; 5) el complejo fosfatidilinositol 3-cinasa, y 6) Atg9 (Suzuki K., y Col. 2007). Así mismo, se ha establecido que la conjugación de la proteína Atg8 a fosfatidiletanolamina (PE) mediada por el complejo Atg12 es esencial para la formación de los autofagosomas (Kuma, y Col., 2002. Mizushima, y Col., 1998). La conjugación de la proteína Atg8 con PE es utilizada ampliamente como un marcador de autofagia incluyendo parásitos (Mann, y Hammarback 1999.

Picazarri, y Col. 2008a)

Para saber si el proceso de autofagia podría ocurrir en *E. histolytica*, en primera instancia se realizó una búsqueda *in silico* de las proteínas de los sistemas de conjugación Atg8 y Atg12 dada su participación en este evento.

Picazarri y Col. (2008a) reportaron la presencia de algunas de las proteínas implicadas en el sistema de conjugación Atg8 (EhAtg3, EhAtg4a, EhAtg4b, EhAtg4c, EhAtg4d, EhAtg7, EhAtg8a y EhAtg8b). Por otro lado, en este trabajo la búsqueda *in silico* de las proteínas del sistema de conjugación Atg8 de *E.*

*histolytica* en la base de datos KEGG se encontró a la proteína EhAtg4e (EHI\_141400), la cual no fue reportada por Picazarri y Col. (2008a). En cuanto al sistema de conjugación Atg12 se encontraron las siguientes proteínas: EhAtg5 (EHI\_022880), EhAtg10 (EHI\_068690), EhAtg16 (EHI\_168370) y EhAtg12 (EHI\_065840). Los valores de identidad con respecto a las proteínas Atg

homólogas de *Homo sapiens* (*H. sapiens*) fueron 26, 29 y 32% respectivamente (**Tabla 5**).

Mientras que, la proteína EhAtg12 no tuvo relación con las homólogas de *H. sapiens* ni de *S. cerevisiae*, pero si se relacionó con la proteína Atg12 de la levadura *Candida guilliermondii*, con una similitud de 57% y una identidad del 34% (**Tabla 5**). Con base en estos resultados se puede sugerir que los sistemas de conjugación Atg8 y Atg12 están presentes en *E. histolytica*, por lo cual, es factible que se lleve a cabo el proceso de autofagia.

Siendo la proteína Atg8 el marcador de autofagia por excelencia, adicionalmente se evaluó in silico la conservación de los dominios proteicos para las proteínas EhAtg8a y EhAtg8b de *E. histolytica* y EiAtg8 de *E. invadens* mediante un alineamiento múltiple (Clustal W y Boxshade), el cual mostró una identidad de 96.1% entre EhAtg8a y EhAtg8b y una identidad del 95% entre las proteínas EhAtg8a y EiAtg8 (**Fig. 13**). Además, se buscó si contenían el dominio conservado Atg8, para lo cual se usó el servidor SMART (<http://smart.embl.de/>). El dominio Atg8 para las proteínas EhAtg8a y EiAtg8 se localizó entre los aminoácidos 17 a 128 y para la proteína EhAtg8b se localizó entre los aminoácidos 22 a 133 (**Fig. 14**). También se compararon las estructuras terciarias de las proteínas Atg8, las cuales están conformadas por un promedio de 27.6% de alfa hélices, 13% de hojas beta y un 57.6% de helicoides enrollados (Colied-coils). La predicción de los modelos de la estructuras se realizó con el servidor RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>) el cual utilizó como molde el cristal de la proteína Atg8 de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) con el número de acceso 3H9D para la

base de datos PDB (del inglés Protein Data Bank) (**Fig. 15**). El dominio Atg8 se caracteriza por tener un núcleo estructural muy similar al de la proteína ubiquitina, sin embargo, es diferente en la composición de aminoácidos. (**Fig. 15**)

La semejanza del plegamiento de las proteínas se evaluó utilizando el TMscore el cual tiene una escala de 0 a 1, donde los valores superiores a 0.6 sugieren que las proteínas tienen un plegamiento similar. La proteína EhAtg8a respecto a EhAtg8b presentó un valor de 0.935 y EhAtg8a respecto a EiAtg8 presentó un valor de 0.92, así mismo, EhAtg8b respecto a EiAtg8 presentó un valor de 0.9. Los valores de la estructura terciaria de las proteínas de *E. histolytica* sugieren que el plegamiento es muy semejante, lo cual sugiere que puede tener actividad biológica como se ha reportado para *E. invadens* (Picazarri, y Col. 2008a).

**Tabla 5. Sistema de conjugación Atg12 en *E. histolytica***

<i>Entamoeba histolytica</i>							
Predicted protein	Accesion number	Protein	Accesion number	Source	e-value	S (%)	I (%)
EhAtg5	EHI_022880	Atg5	Q9H1Y0	<i>Homo sapiens</i>	4e-08	48	26
EhAtg7	EHI_064700	Atg7	P38862	<i>Mus musculus</i>	2e-102	52	35
EhAtg10	EHI_068690	Atg10	Q9H0Y0	<i>Homo sapiens</i>	7e-05	46	29
EhAtg12	EHI_065840	Atg12	A5DK05	<i>Candida guilliermondii</i>	3e-156	57	34
EhAtg16	EHI_168370	Atg16	Q676U5	<i>Homo sapiens</i>	6e-50	51	32

**S= Similitud; I= Identidad.**

**Figura 13. Alineamiento múltiple de las proteínas Atg8.** Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Atg8 de *E. histolytica* y *E. invadens*. El grado de conservación de las proteínas se representa con las cajas. Las cajas negras señalan los residuos idénticos entre las proteínas, mientras que las cajas en gris señalan los aminoácidos similares. Los aminoácidos divergentes se representan en cajas en blanco. Los números a la izquierda en cada proteína indican la posición de los aminoácidos.

*EhAtg8a* 1 - - - - - **MES**QPKLPFKQRVSFEERKAFAI QLRQKKPNYVPLVVESDGTSAI **E**LKKDRFFI  
*EhAtg8b* 1 MDPTFPI N**Q**PKLPFKQRVSFEERKAFAI QLRQKKPNYVPLVVESDGT**S**AI NLKKDRFFI  
*Ei Atg8* 1 - - - - - **MDT**QPKLPFKQRVSFEERKAFAI QLRQKKPNYVPLVV**D**NDGTSAI NLKKDRFFI

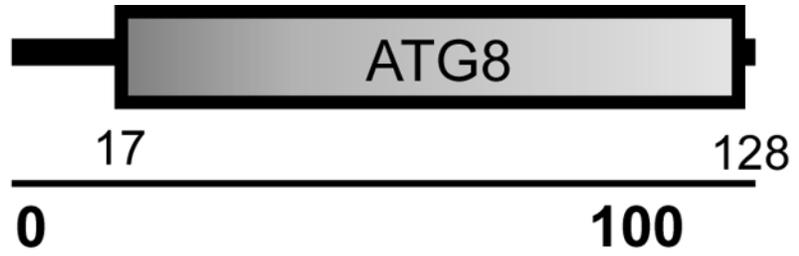
*EhAtg8a* 56 **PEDSKV**SDFVKVLVDKYI **ETDGETPI** STVSVKI QTPSKAI QPSNEDTI GSLYAMYQEEDG  
*EhAtg8b* 61 PE**G**SK**I**SDFVKVLVDKYI **ETDGETPI** STVSVKI QTPSKAI QPSNEDTI GSLYAMYQEEDG  
*Ei Atg8* 56 **PEDSKV**SDFVKVLVDKYI **ETDGETPI** STVSVKI QTPSKA**V**QPSNEDTI GSLYAMYQEEDG

*EhAtg8a* 116 **YLYFI** VYRESVFGN  
*EhAtg8b* 121 **YLYFI** VYRESVFGN  
*Ei Atg8* 116 **YLYFI** VYRESVFG**C**

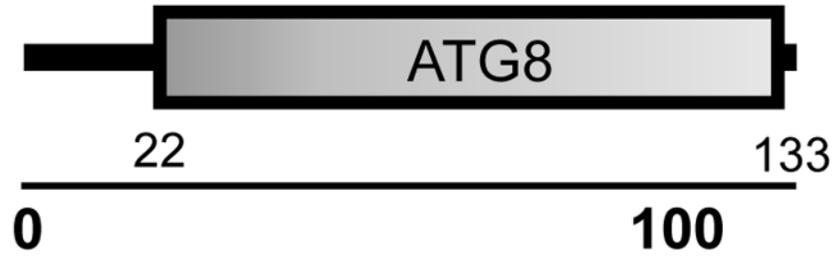
**Figura 14. Análisis de los dominios estructurales de las proteínas Atg8.**

Para predecir los dominios estructurales de las proteínas Atg8 se utilizó el servidor SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). **a)** EhAtg8a presenta una longitud de 129 aminoácidos con un dominio ATG8 ubicado del aminoácido 17 al 128. **b)** EhAtg8b presenta una longitud de 134 aminoácidos con un dominio ATG8 ubicado del aminoácido 22 al 133. **c)** EiAtg8 presenta una longitud de 129 aminoácidos y un dominio ATG8 ubicado del aminoácido 17 al 128.

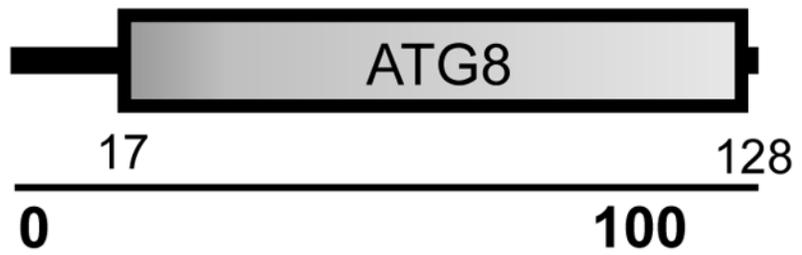
*EhAtg8a*



*EhAtg8b*

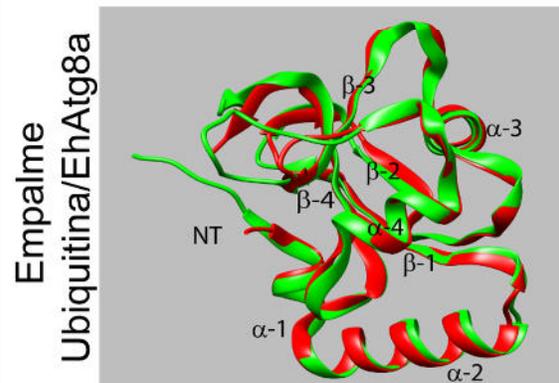
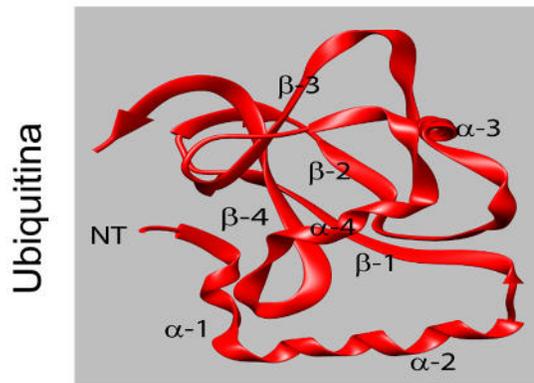
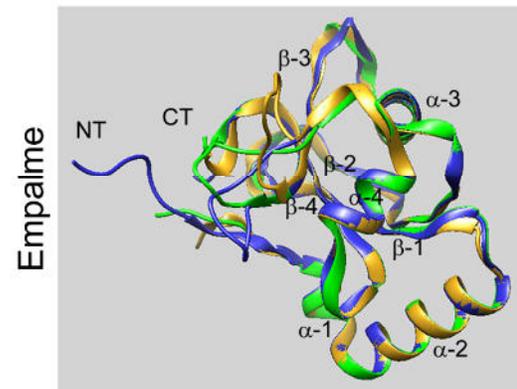
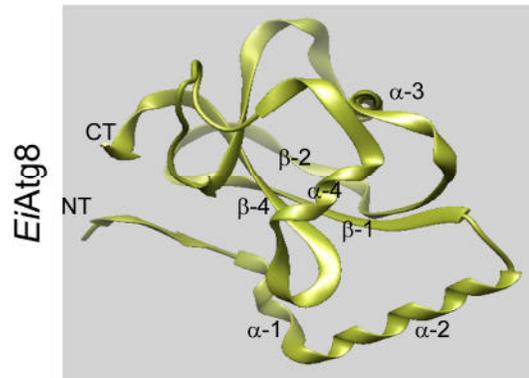
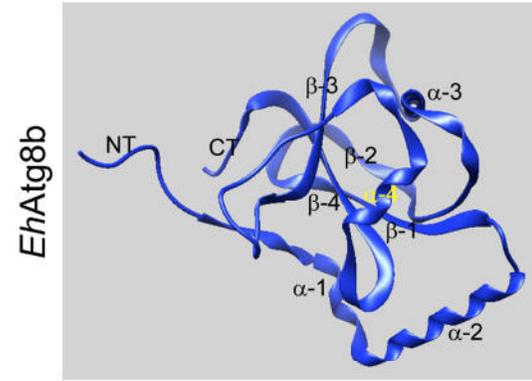
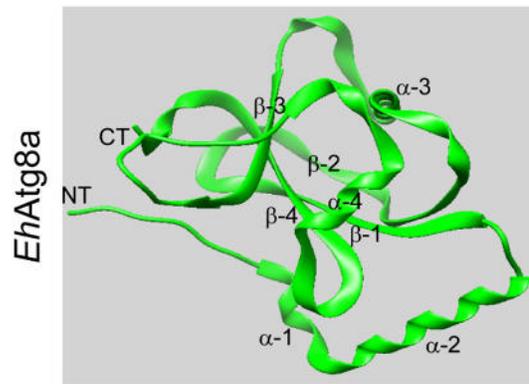


*EiAtg8*



### **Figura 15. Estructura terciaria de las proteínas Atg8.**

Los modelos 3D de las proteínas Atg8 se obtuvieron con el servidor RaptorX, dicho servidor utilizó como molde a la proteína Atg8 de *T. brucei*. Las estructuras de las proteínas Atg8 constan de un núcleo de cuatro hojas  $\beta$  centrales, flanqueadas por dos pares de alfa hélices. Las estructuras terciarias de las proteínas Atg8 tienen un plegamiento muy similar al de la ubiquitina (TMscore de 0.96).



## 6.6. Clonación del gen *Ehatg8a* en el vector pJET1.2

Con el objeto de contar con una herramienta que permitiera estudiar la autofagia en *E. histolytica*, como posible consecuencia del tratamiento con el resveratrol, clonamos el gen completo *Ehatg8a*, el cual se usa como un marcador de autofagia en otros sistemas (Mann, y Hammarback, 1999. Picazarri, y Col. 2008a). La amplificación del gen *Ehatg8a* se realizó mediante un ensayo de PCR a partir del DNA genómico de *E. histolytica*. El producto de PCR se analizó por electroforesis en geles de agarosa y se observó una sola banda de 402 pb, correspondiente al tamaño molecular teórico esperado (**Fig. 16A, carril 2**), mientras que, en la reacción del control negativo en el cual se omitió el DNA no se apreció amplificación, demostrando así, que la reacción de amplificación para el gen *Ehatg8a* fue específica (**Fig. 16A, carril 1**).

El amplicon resultante de la reacción de PCR se ligó al plásmido pJET1.2, dando origen así a la construcción pJET1.2-*Ehatg8a*. Dicha construcción fue analizada mediante restricción enzimática y se observó la liberación de un fragmento de 402 pb correspondiente al tamaño del gen de interés (Fig. **16B**).

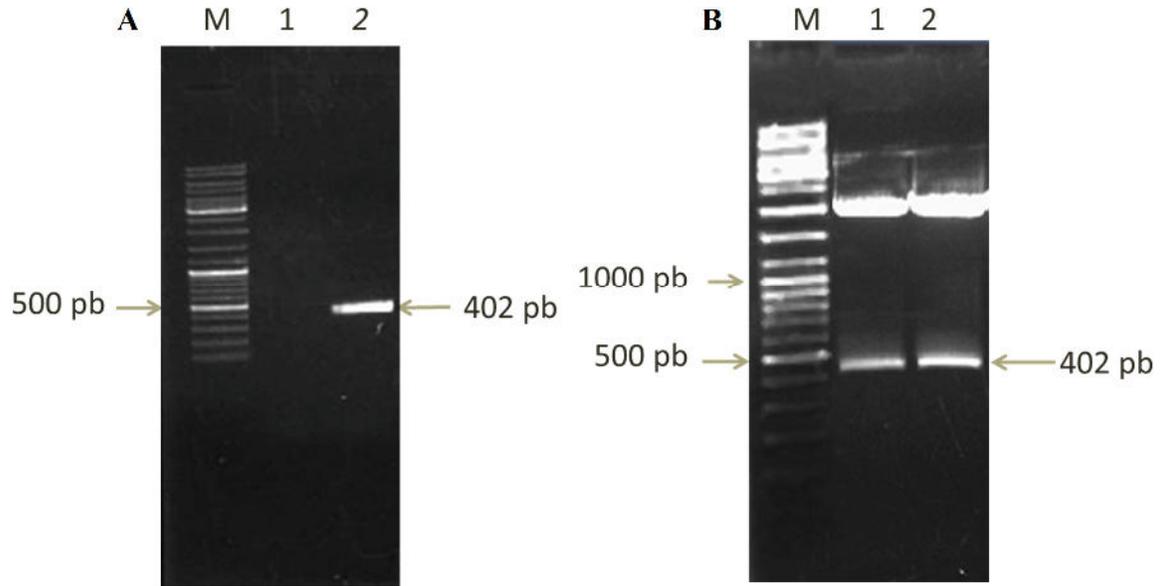
Para confirmar de que efectivamente se clonó el gen *Ehatg8a*, se realizó una reacción de secuenciación automatizada para el plásmido pJET1.2-*Ehatg8a*. Al resultado de la secuencia se le realizó un alineamiento mediante un BLAST, en la base de datos AmoebaDB. El alineamiento mostró que el inserto clonado tenía una identidad de 100% en relación al gen *Ehatg8a*.

## 6.7. Subclonación del gen *Ehatg8a* en el vector pGEX-6P-1.

Para expresar la proteína recombinante GST-EhAtg8a (GST-EhAtg8ar) se utilizó el vector de expresión pGEX-6P-1 debido a que contiene la etiqueta de la enzima glutatión-S-transferasa (GST) que permite purificar a la proteína recombinante mediante su afinidad a glutatión. El vector se linearizó por restricción enzimática y enseguida se realizó una reacción de ligación para insertar el gen *Ehatg8a* liberado del plásmido pJET1.2. Posteriormente, la construcción pGEX-Ehatg8 se analizó por restricción enzimática con *BamH* I y *Xho* I, para corroborar la inserción del gen *Ehatg8a* al plásmido pGEX-6P-1. Los resultados muestran la liberación de un fragmento de 402 pb correspondiente al tamaño molecular del gen *Ehatg8a* (**Fig. 17**). Como control, el plásmido pGEX-6P-1 se restringió con las *BamH* I y *Xho* I por separado y se observó una banda de 4,894 pb correspondiente al tamaño de la forma lineal del plásmido (**Fig. 17**). Una vez confirmada la clonación del gen *Ehatg8a* en el vector pGEX-6P-1 se procedió a inducir la expresión de la proteína recombinante GST-EhAtg8a.

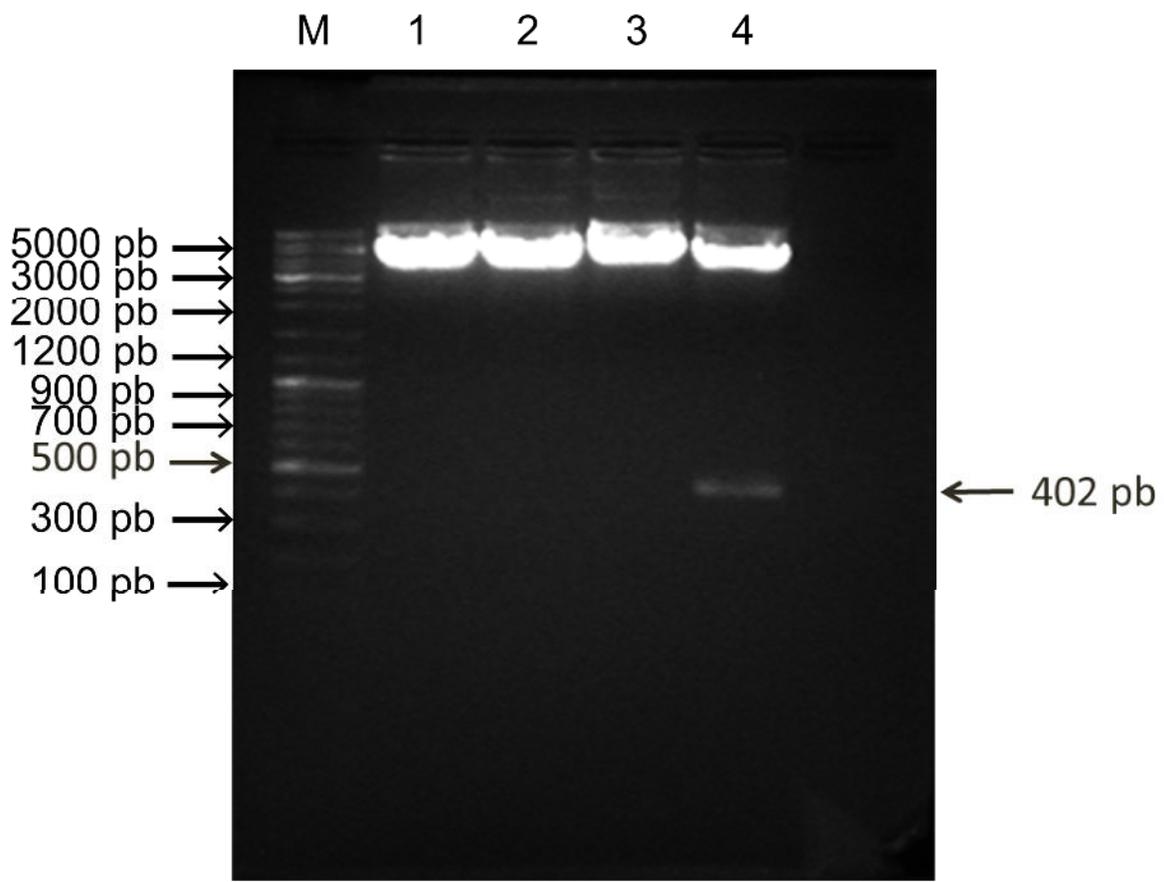
**Figura 16. Amplificación del gen *Ehatg8a* y clonación en el vector pJET 1.2.**

**A)** El gen *Ehatg8a* se amplificó por PCR a partir de DNA genómico, utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. **M)** Marcador de tamaño molecular GeneRuler ladder mix. **Carril 1)** Reacción de PCR sin DNA molde. **Carril 2)** Reacción de PCR con DNA genómico de *E. histolytica*, donde se observa el amplicon del gen *Ehatg8* con un tamaño de 402 pb **B)** El producto de PCR de **A**, fue ligado al vector de clonación pJET1.2. La clonación se analizó por restricción enzimática. **Carril 1)** Marcador de tamaño molecular GeneRuler ladder mix. **Carril 2 y 3)** *Ehatg8a* liberado del vector pJET1.2 a través de restricción enzimática con las endonucleasas *BamH I* y *Xho I*.



**Figura 17. Clonación del gen *Ehatg8a* en el vector pGEX-6P-1.**

La reacción de ligación se realizó utilizando el vector pGEX-6P-1 y el gen *Ehatg8a* digeridos con las enzimas *BamH* I y *Xho* I. Posteriormente, la reacción de ligación se utilizó para transformar bacterias DH5 $\alpha$  y se analizó el DNA plásmido de la clona candidata. **M)** Marcador generuler ladder mix **Carril 1)** Vector pGEX-6P-1 digerido con la enzima *BamH* I; **Carril 2)** Vector pGEX-6P-1 digerido con la enzima *Xho* I; **Carril 3)** Vector linearizado con la enzima *BamH* I y *Xho* I; **Carril 4)** Vector pGEX-6P-1 restringido con *BamH* I y *Xho* I donde se observa la liberación de un fragmento de 402 pb.



## 6.8. Inducción de la GST-EhAtg8a recombinante

La expresión de la proteína recombinante GST-EhAtg8a, se llevó a cabo en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) PLYS, las cuales se transformaron con el plásmido pGEX-6P-1-*Ehatg8a* que se obtuvo previamente. La expresión de la proteína GST-EhAtg8a se analizó a partir de extractos de bacterias inducidas, cuyas proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie (**Fig. 18A**). Las bacterias que poseían el plásmido pGEX-6P-1-*Ehatg8a*, sobre-expresaron una proteína de aproximadamente 41 kDa correspondiente a la suma de los 26 kDa de la etiqueta de GST y los 14.8 kDa correspondientes a la secuencia de aminoácidos de la proteína EhAtg8a (**Fig. 18A**). Por otro lado, los cultivos de bacterias que contenían el plásmido pGEX-6P-1-*Ehatg8a* pero que no se les adicionó IPTG no sobre-expresaron la proteína de interés (**Fig. 18A**).

## 6.9. Prueba de solubilidad de la GST-EhAtg8a recombinante

Antes de purificar la proteína GST-EhAtg8a, se realizó una prueba de solubilidad de la misma. Las fracciones solubles e insolubles se resolvieron en un gel de poliacrilamida con SDS y el gel se tiñó con azul de Coomassie. En dicha prueba se encontró que la proteína recombinante estaba en ambas fracciones (**Fig. 18B**). La prueba de solubilidad mostró que la cantidad de proteína recombinante presente en la fracción soluble era suficiente para realizar la purificación por afinidad mediante a una resina acoplada a glutatión (**Fig. 18B**).

## **6.10. Purificación de la proteína recombinante GST-EhAtg8a**

La purificación de la proteína recombinante, se realizó por afinidad a glutatión sefarosa de acuerdo a las especificaciones recomendadas por el comerciante (Amersham Biosciences). La fracción soluble de los extractos bacterianos con la GST-EhAtg8ar se muestra en la **Figura 19A Carril 1**, las fracciones de los lavados con PBS 7.4 están en la **Figura 19A Carriles 2 al 4**, y las fracciones de la elución se observan en los **Carriles 5 y 7** de la **Figura 19A**.

Con el fin de corroborar que se trataba efectivamente de la proteína GST-EhAtg8ar se realizó un ensayo de inmunodetección, para lo cual se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-GST. Este anticuerpo reconoció una banda de aproximadamente 41 kDa correspondiente al peso molecular teórico de la suma de la secuencia de aminoácidos la etiqueta de GST y de la proteína EhAtg8ar. El reconocimiento de esta banda se observó en todas las fracciones del proceso de purificación de la proteína recombinante (**Fig. 19B**)

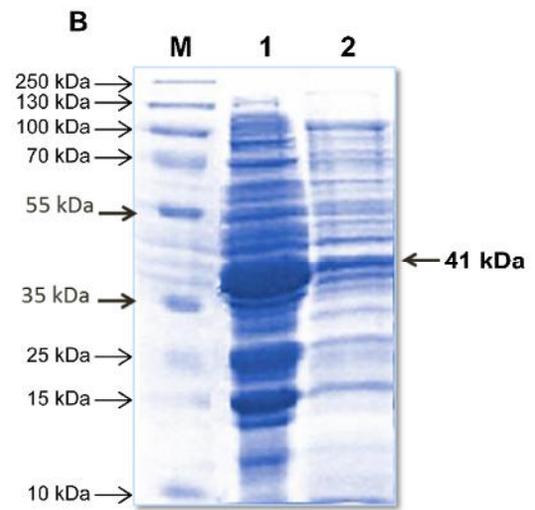
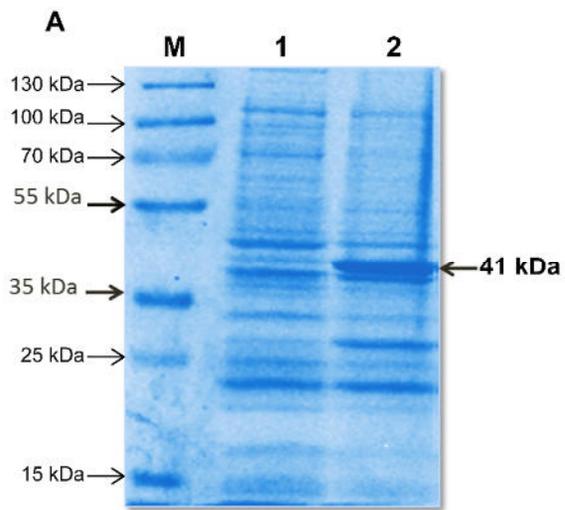
**Figura 18. Expresión y análisis de solubilidad de la proteína GST-EhAtg8a**

**A)** Para la expresión de la proteína EhAtg8a recombinante, se utilizó la construcción obtenida pGEX-6P-1-Ehatg8a con la cual se transformaron bacterias *E. coli* DE3 PLysS. La clona seleccionada se creció en medio LB y se indujo con 1mM de IPTG por 3h. Posteriormente, los extractos bacterianos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%. **M:** Marcador de peso molecular.

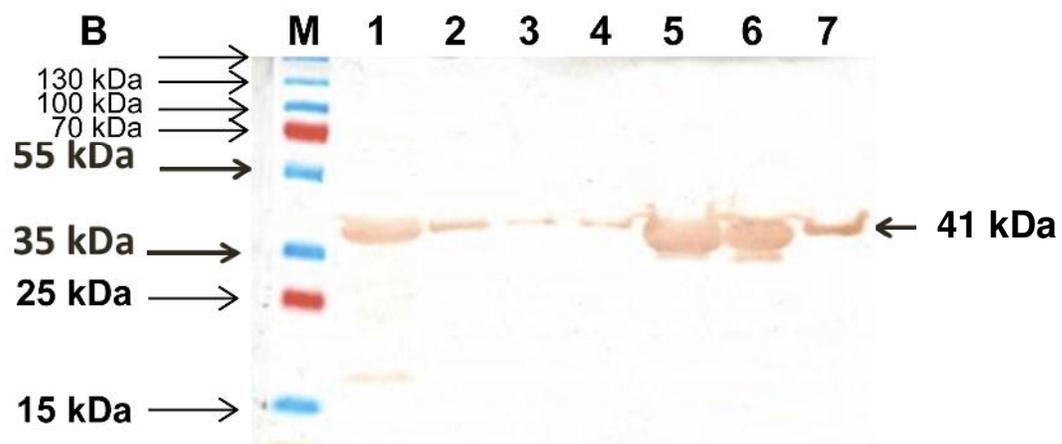
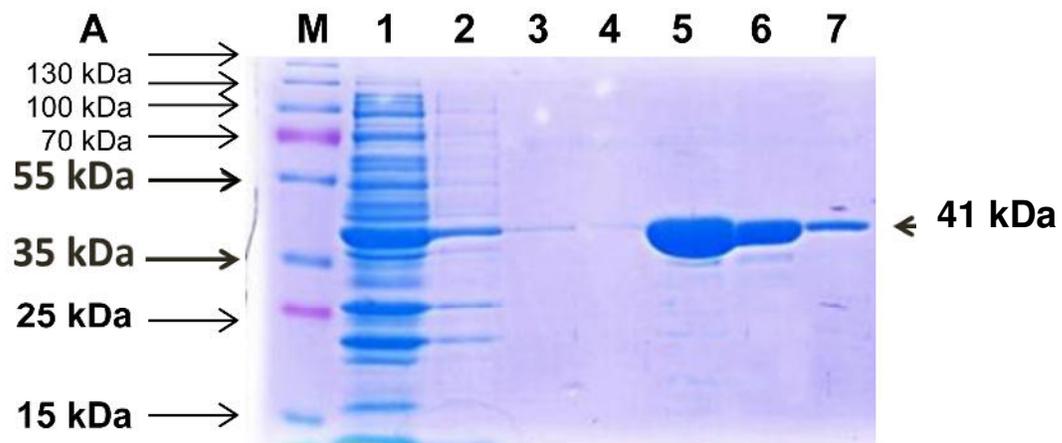
**Carril 1:** Extractos de bacterias no inducidas. **Carril 2:** Extracto de bacterias inducidas.

Posteriormente se analizó la solubilidad de la proteína recombinante. **B) M:** Marcador de peso molecular; **Carril 1:** Fracción soluble del extracto de bacterias transformadas con el plásmido pGEX-6P-1-Ehatg8a e inducidas con IPTG 1mM.

**Carril 2:** Fracción insoluble del extracto de bacterias transformadas con el plásmido pGEX-6P-1-Ehatg8a e inducidas con IPTG 1mM.



**Figura 19. A) Purificación de la proteína GST-EhAtg8ar.** Después de la purificación de la proteína GST-EhAtg8ar las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción de azul de Coomassie **A) M:** Marcadores de peso molecular PageRuler Plus Prestained (Fermentas). **Carril 1:** Fracción soluble. **Carriles 2 al 4:** Fracciones de lavado con PBS pH 7.4. **Carriles 5 al 7:** Fracciones de elución de la proteína GST-EhAtg8ar. **B) Inmunodetección de la proteína GST-EhAtg8ar.** Las proteínas se separaron por SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para la inmunodetección de la proteína GST-EhAtg8ar utilizando el anticuerpo anti-GST. **M:** Marcadores de peso molecular PageRuler Plus Prestained (Fermentas). **Carril 1:** fracción soluble. **Carriles 2 al 4:** Fracciones de lavado con PBS pH 7.4. **Carriles 5 al 7:** Fracciones de elución de la proteína GST-EhAtg8ar



### 6.11. Producción de anticuerpos policlonales anti-EhAtg8

Posteriormente, se obtuvieron los anticuerpos contra la proteína GST-EhAtg8ar para utilizarlos en ensayos de western blot e inmunofluorescencia, los cuales sirvieron para identificar a la proteína en los trofozoítos y determinar así su participación en un posible fenómeno de autofagia debido al efecto del resveratrol.

Para la obtención de los anticuerpos policlonales se inmunizaron ratones machos con la proteína GST-EhAtg8ar y el adyuvante TiterMax. Los sueros hiperinmunes de los ratones, obtenidos de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos, en ensayos de western blot detectaron una banda de aproximadamente 41 kDa correspondiente al peso molecular teórico de la proteína recombinante (**Fig. 20 Carriles 2 al 3**). En contraste, los sueros de los animales al día cero de la inmunización no reconocieron dicha proteína (**Fig. 20 carril 1**), lo que indicó que los anticuerpos policlonales anti GST-EhAtg8ar reconocieron de forma específica a la proteína recombinante contra la cual fueron generados.

Posterior a esto, se llevaron a cabo ensayos de inmunodetección de la proteína en extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica*. Los anticuerpos usando diferentes diluciones detectaron una sola banda de aproximadamente 15 kDa, que corresponde al peso molecular deducido a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína EhAtg8a (**Fig. 21 Carriles 4, 7-9**). Por otro lado, el suero preinmune no reconoció ninguna proteína en los extractos amebianos, lo cual indicó que los anticuerpos anti-EhAtg8a son específicos. (**Fig. 21 carriles 1 al 3**). Sin embargo, cabe destacar que *E. histolytica* tiene una proteína paróloga (EhAtg8b), la cual podría ser reconocida por el anticuerpo específico anti-GSTEhAtg8a, por su alta similitud (96%).

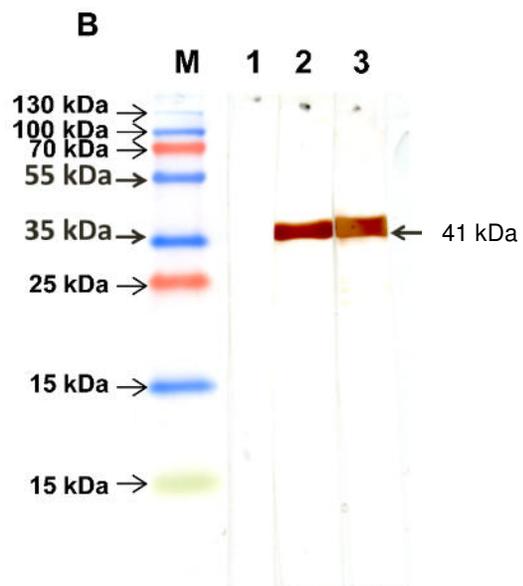
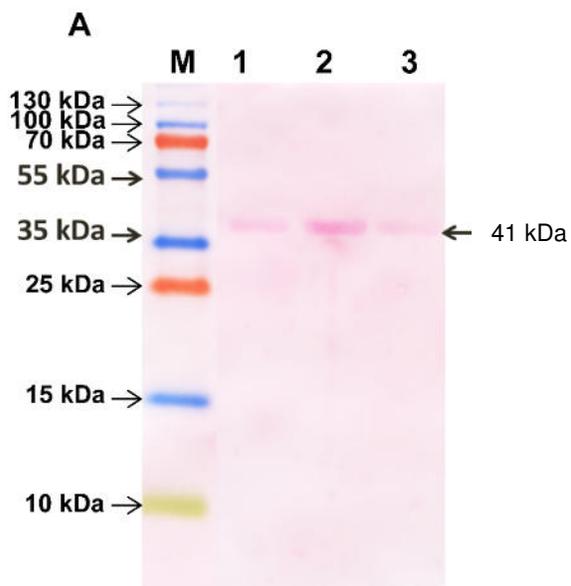
**Figura 20. Inmunodetección de la proteína GST-EhAtg8 recombinante.**

**A) Membrana conteniendo a la GST-EhAtg8ar teñida con rojo de Ponceau. M:**

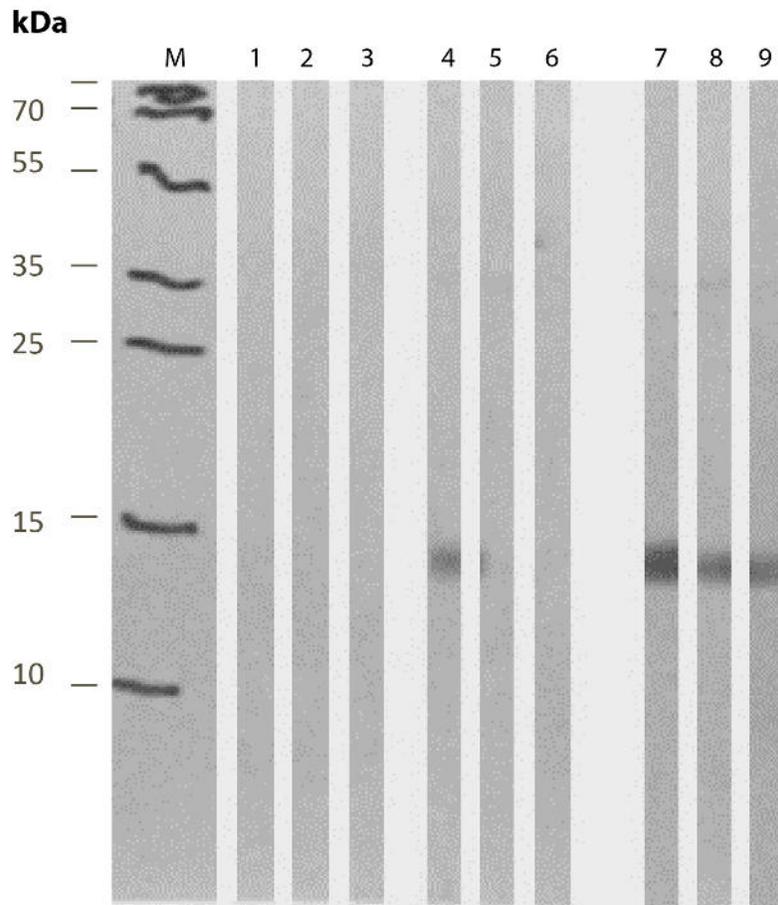
Marcadores de peso molecular PageRuler Plus Prestained (Fermentas). **Carriles**

**1 al 3:** A partir de células de *E. coli* BI21 PLysS transformadas con la construcción pGEX-6P-1-Ehatg8a e inducidas con IPTG 1 mM durante 16 h se purificó la proteína GST-EhAtg8ar, posteriormente, la proteína recombinante se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% y se transfirió a membranas de nitrocelulosa.

**B) Inmunodetección de la proteína GST-EhAtg8ar.** El Western blot de la proteína GST-EhAtg8ar se reveló con diaminobencidina. **M:** Marcadores de peso molecular PageRuler Plus Prestained (Fermentas). **Carril 1:** Inmunodetección con suero preinmune. **Carril 2:** Inmunodetección con suero hiperinmune obtenido después de 15 días de inmunización con la proteína GST-EhAtg8ar **Carril 3:** Inmunodetección con suero hiperinmune obtenido después de 30 días de inmunización con la proteína GST-EhAtg8ar.



**Figura 21. Inmunodetección de la proteína EhAtg8 en trofozoítos de *E. histolytica*.** Extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica* se separaron por SDS-PAGE al 15% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para la inmunodetección de la proteína EhAtg8. **M:** Marcadores de peso molecular PageRuler Plus Prestained (Fermentas). **Carril 1:** Suero preinmune dilución 1:8000. **Carril 2:** Suero preinmune dilución 1:10000. **Carril 3:** Suero preinmune dilución 1:12000. **Carril 4:** Suero hiperinmune obtenido 15 días después de la inmunización con la proteína GST-EhAtg8r, dilución 1:8000. **Carril 5:** Suero hiperinmune obtenido 15 días después de la inmunización con la proteína GST-EhAtg8ar, dilución 1:10000. **Carril 6:** Suero hiperinmune obtenido 15 días después de la inmunización con la proteína GST-EhAtg8ar, dilución 1:12000. **Carril 7:** Suero hiperinmune obtenido 30 días después de la inmunización con la proteína GST-EhAtg8ar, dilución 1:8000. **Carril 8:** Suero hiperinmune obtenido 30 días después de la inmunización con la proteína GST-EhAtg8ar, dilución 1:10000. **Carril 9:** Suero hiperinmune obtenido 30 días después de la inmunización con la proteína GST-EhAtg8ar, dilución 1:12000.



## **6.12. Inmunodetección de la proteína Atg8 en trofozoítos de *E. histolytica* tratados con resveratrol**

Como se dijo anteriormente, la proteína EhAtg8 es un indicador de autofagia porque constituye parte de los autofagosomas que se forman durante el proceso. Para explorar la posibilidad de que el fenómeno de autofagia estuviera ocurriendo en los trofozoítos de *E. histolytica* tratados con resveratrol, se realizaron ensayos de western blot usando los anticuerpos anti-GST-EhAtg8ar. Estos anticuerpos mostraron que la proteína EhAtg8 se expresó de manera similar, tanto en trofozoítos no tratados, así como en los tratados con etanol y con resveratrol. Además, la banda correspondiente a la proteína EhAtg8 conjugada con fosfatidiletanolamina (PE) no fue detectada en los trofozoítos de *E. histolytica* sin tratamiento, ni en los tratados con etanol y resveratrol (**Fig. 22A Carriles 1 al 3 y Fig. 22C**). El análisis densitométrico de las bandas de EhAtg8 en relación al control de carga (actina) confirmó que, en efecto, no hubo diferencias en la cantidad de EhAtg8a en trofozoítos tratados con resveratrol, con respecto a los controles (**Fig. 22A Carriles 1 al 3 y Fig. 22C**).

Sin embargo, en trofozoítos de *E. invadens* usados como control positivo, para evidenciar la conjugación de la proteína EiAtg8 (Picazarri, y Col., 2008a), se detectó una cantidad mínima de EiAtg8-PE (3%) en trofozoítos no tratados; en contraste con los cultivos que se indujeron a enquistamiento donde se encontró un 75% de esta proteína conjugada con PE (**Fig. 22B Carriles 1 al 3 y Fig. 22C**).

Estos resultados sugirieron fuertemente que el resveratrol no induce muerte celular por autofagia en los trofozoítos de *E. histolytica*.

### **6.13. Inmunolocalización de la proteína EhAtg8 en trofozoítos de *E. histolytica* tratados con resveratrol**

Para confirmar que el proceso de autofagia no se inducía bajo el tratamiento del resveratrol en trofozoítos de *E. histolytica* se realizaron ensayos de inmunolocalización de la proteína EhAtg8. Las imágenes obtenidas por microscopia confocal usando los anticuerpos anti-GST-EhAtg8ar revelaron que esta proteína se localiza en pequeños puntos en el citoplasma en los trofozoítos de *E. histolytica* que fueron o no tratados con resveratrol (**Fig. 23A**). Tampoco se observó relocalización de la proteína EhAtg8a estructuras de tipo vesicular semejantes a autofagosomas en los trofozoítos expuestos a IC<sub>50</sub> de resveratrol (**Fig. 23A**). Para confirmar la relocalización de la proteína Atg8 como control positivo se utilizaron trofozoítos de *E. invadens*, En los trofozoítos de esta ameba la proteína EiAtg8 se apreció también distribuida en el citoplasma. Sin embargo, en los trofozoítos de *E. invadens* que se indujeron a enquistamiento, el anticuerpo reconoció estructuras similares a vacuolas, las cuales probablemente corresponden a los autofagosomas (**Fig. 23B**). Estos resultados sugieren nuevamente que el resveratrol no induce una muerte celular por autofagia en trofozoítos de *E. histolytica*.

**Figura 22. Análisis de autofagia mediante la inmunodetección del marcador Atg8 en Entamoeba sp.**

**A) Inmunodetección de la proteína Atg8 en extractos totales de *E.***

***histolytica*.** Extractos totales de trofozoítos tratados con resveratrol y sin tratamiento se separaron por SDS-PAGE al 15% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para la inmunodetección de la proteína EhAtg8 mediante los anticuerpos específicos anti-GST-EhAtg8ar que se generaron en este trabajo. **Carril 1:** Extractos de trofozoítos sin tratamiento. **Carril 2:**

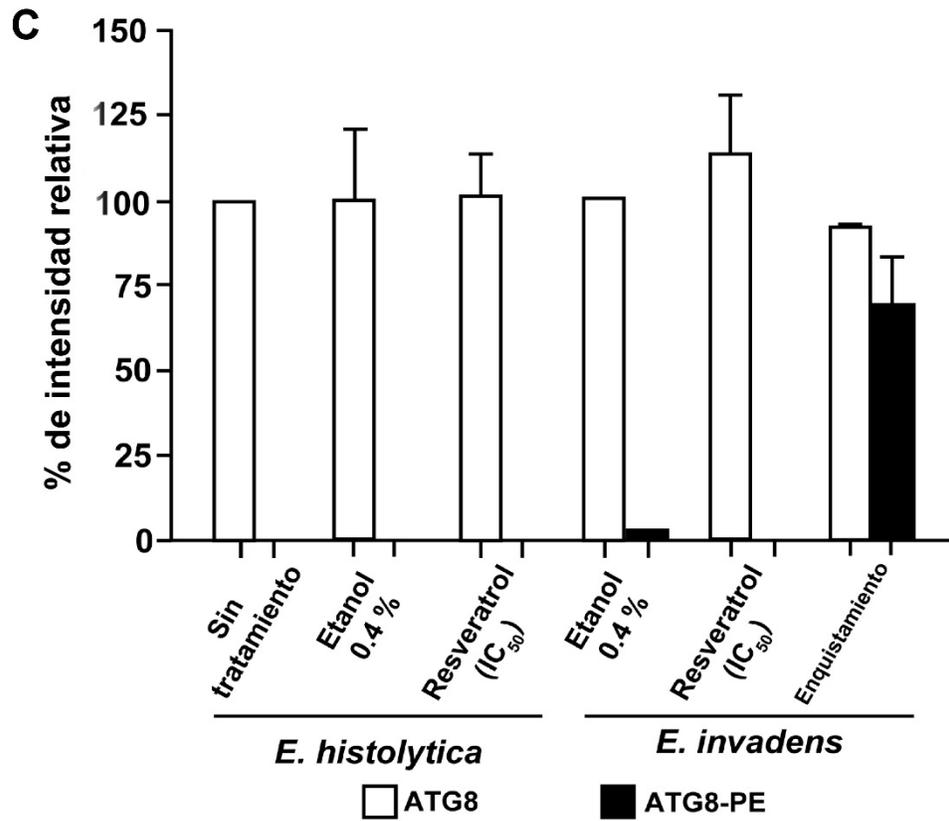
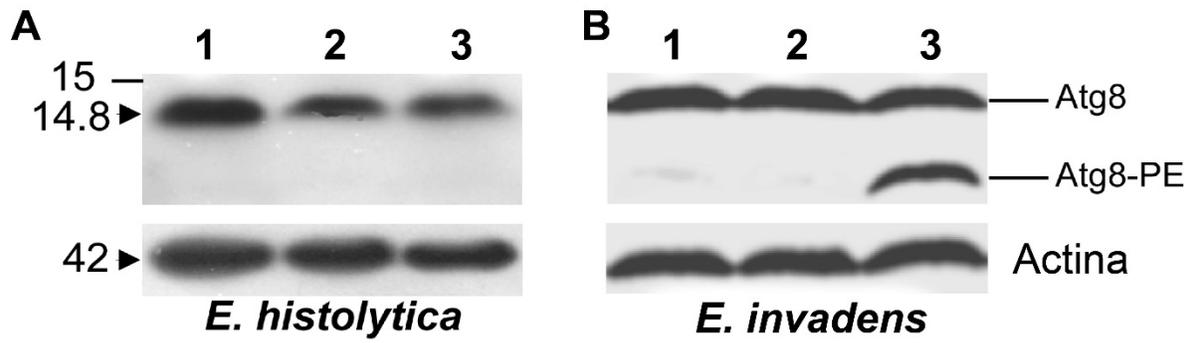
Extractos de trofozoítos tratados con etanol (0.4%). **Carril 3:** extractos de trofozoítos tratados con resveratrol IC<sub>50</sub>. **B) Inmunodetección de la proteína**

**EiAtg8 en extractos totales de *E. invadens*.** Extractos totales de trofozoítos tratados con etanol, resveratrol y quistes se separaron por SDS-PAGE al 15% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para la inmunodetección de la proteína *EiAtg8* mediante los anticuerpos específicos anti-GST-EhAtg8ar que se generaron en este trabajo. Como control de carga se utilizó actina **Carril 1:**

Extractos de trofozoítos tratados con etanol (0.4%). **Carril 2:** Extractos de trofozoítos tratados con resveratrol 219 µM. **Carril 3:** Extractos de trofozoítos

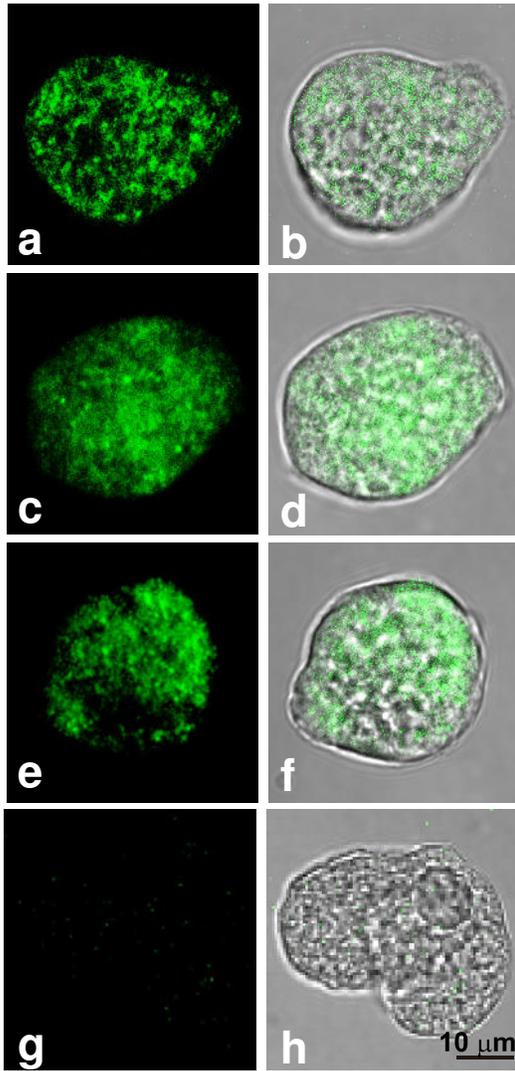
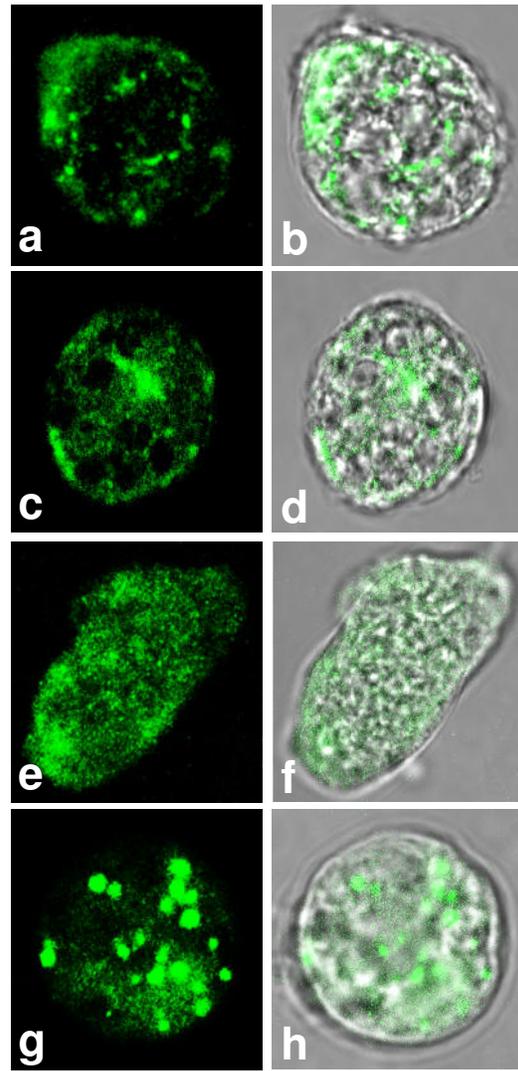
inducidos a enquistamiento **C) Análisis densitométrico para la proteína**

**EhAtg8.** Las bandas de 14.8 kDa y 42 kDa se cuantificaron mediante el programa ImageJ y se obtuvo la proporción Atg8/Actina o Atg8-PE/Actina.



**Figura 23. Localización celular de la proteína Atg8 en trofozoítos amebianos.**

**A) Localización celular de la proteína Atg8 en *E. histolytica*.** Trofozoítos incubados con anticuerpos específicos anti-EhAtg8 y anticuerpos secundarios marcados con FITC observados a través de microscopía confocal. **a y b):** Trofozoítos de *E. histolytica* sin tratamiento. **c y d):** Trofozoítos de *E. histolytica* tratados con etanol (0.4%). **e y f):** Trofozoítos de *E. histolytica* tratados con resveratrol IC<sub>50</sub>. **g y h):** Trofozoítos de *E. histolytica* incubados con suero preinmune. **B) Localización celular de la proteína Atg8 en *E. invadens*.** **a y b):** Trofozoítos de *E. invadens* sin tratamiento. **c y d):** Trofozoítos de *E. invadens* tratados con etanol (0.4%). **e y f):** Trofozoítos de *E. invadens* tratados con resveratrol IC<sub>50</sub>. **g y h):** Trofozoítos de *E. invadens* inducidos a enquistamiento.

**A****B**

## **6.14. Externalización de fosfatidilserina en trofozoítos de *E. histolytica* tratados con resveratrol**

La muerte celular conocida como apoptosis ocurre normalmente durante varios procesos celulares, como; en el desarrollo, envejecimiento y en la homeostasis para el mantenimiento de la población celular en tejidos. Así mismo, ocurre como un mecanismo de defensa cuando las células están dañadas por agentes infecciosos (Elmore, 2007, Dockrell, 2001).

La apoptosis se caracteriza por cambios como: aumento de la granularidad intracelular, incremento de la concentración de calcio citosólico, cambios en la composición de la membrana celular, activación de enzimas como caspasas y calpainas, condensación y fragmentación de la cromatina (Jordan, 2003).

Además, la irradiación o fármacos usados en la terapia contra el cáncer también inducen este tipo de muerte celular (Watters, 1999; Mesner, y Col., 1997). El resveratrol, un compuesto que posee propiedades contra el cáncer pero su mecanismo no está completamente entendido, se sabe que tiene la capacidad de inducir apoptosis en algunas líneas celulares provenientes de cáncer (Shih, y Col., 2004). Por otro lado, se ha observado que este compuesto tiene actividad contra diferentes parásitos y en algunos de ellos induce apoptosis como en el caso de *Leishmania infantum* (Tolomeo, y Col., 2013). Por lo que en esta tesis, para evaluar si el resveratrol inducía apoptosis en los trofozoítos de *E. histolytica* se midieron cambios en la composición de la membrana, fragmentación del DNA y cambios bioquímicos (calcio intracelular, calpainas y superóxido dismutasa).

Normalmente los fosfolípidos de la membrana plasmática son distribuidos de forma asimétrica. Así que, fosfolípidos que contienen colina como fosfatidilcolina y esfingomielina son concentrados hacia el exterior de la membrana, mientras que los fosfolípidos que contienen grupo amino como fosfatidiletanolamina (PE por sus siglas del inglés phosphatidylethanolamine) y fosfatidilserina (PS por sus siglas del

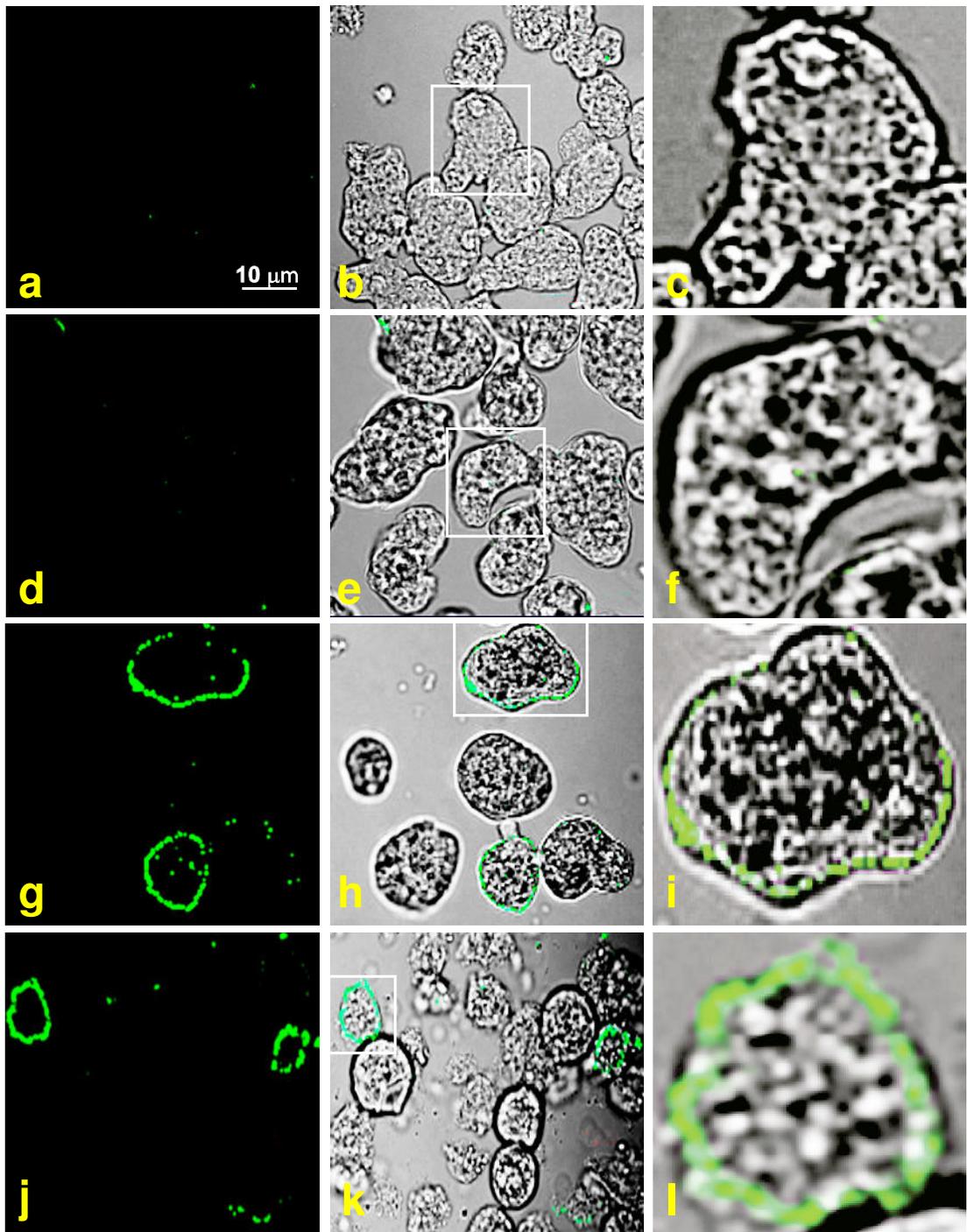
inglés phosphatidylserine) están presentes hacia el interior de la membrana plasmática (Fadok, y Col. 1992). Durante la etapa temprana de la apoptosis la PS interrumpe su asimetría y queda expuesta en la superficie celular debido a la desregulación de enzimas como escramblasas, translocasas y flipasas, encargadas de la homeóstasis de la PS en la membrana plasmática (Marcus, 2011). Por tanto, la externalización de PS en la membrana plasmática es utilizada como un marcador de apoptosis, la cual es detecta por medio de Anexina V marcada con un fluorocromo, dado a su alta afinidad a la PS (Vermes, y Col. 1995).

Para investigar si el resveratrol era capaz de inducir apoptosis en los trofozoítos de *E. histolytica*, se estudió si la PS era externalizada después del tratamiento con dicho compuesto. Para la detección de PS se utilizó Anexina V acoplada a FITC. Las imágenes obtenidas mediante microscopia confocal revelaron que la PS se externalizó en la membrana plasmática de las células tratadas con la IC<sub>50</sub> de resveratrol y con 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, esta última usada como control positivo para la inducción de apoptosis (**Fig. 24**). Por otro lado, los trofozoítos no tratados o tratados con etanol no externalizaron la PS (**Fig. 24**).

Para cuantificar el número de trofozoítos que externalizaron la PS, se realizaron ensayos de citometría de flujo. Los resultados mostraron que el 42% de las células tratadas con resveratrol presentaron señal para Anexina V-FITC, en cambio, los trofozoítos no tratados y trofozoítos tratados con etanol únicamente el 0.24% y 1.19% respectivamente fueron positivos para la señal de Anexina V-FITC. En contraste, el control positivo, trofozoítos tratados con 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, exhibió un 68.5% de células que externalizaron la PS. Estos resultados sugieren que el resveratrol induce una muerte celular por apoptosis en los trofozoítos de *E. histolytica* (**Fig. 25**).

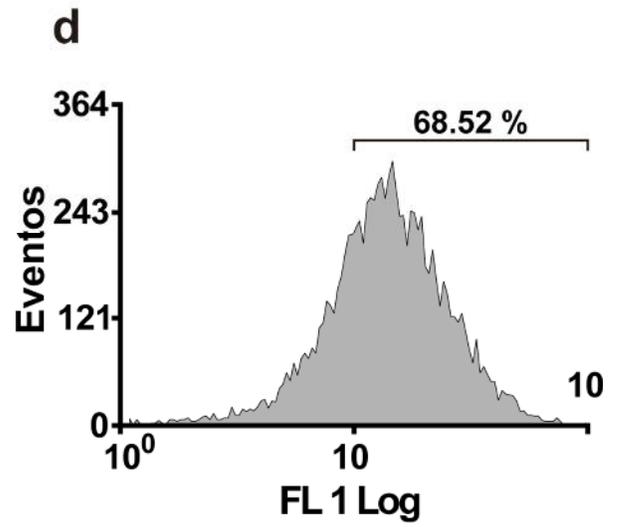
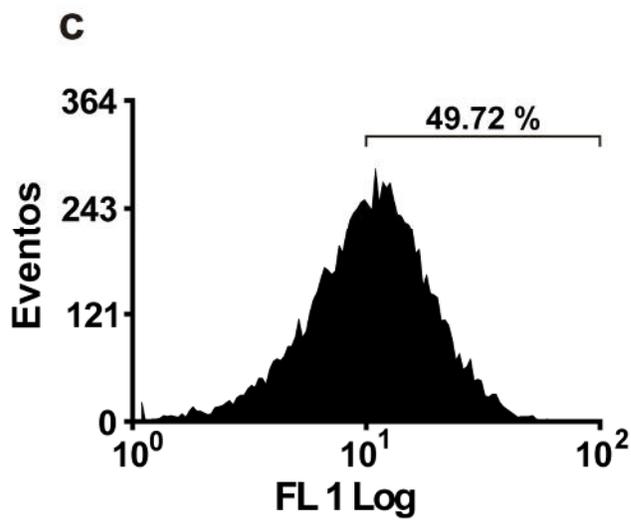
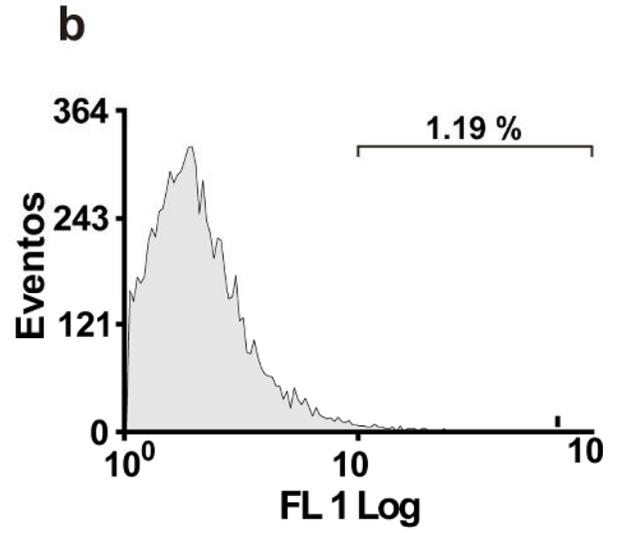
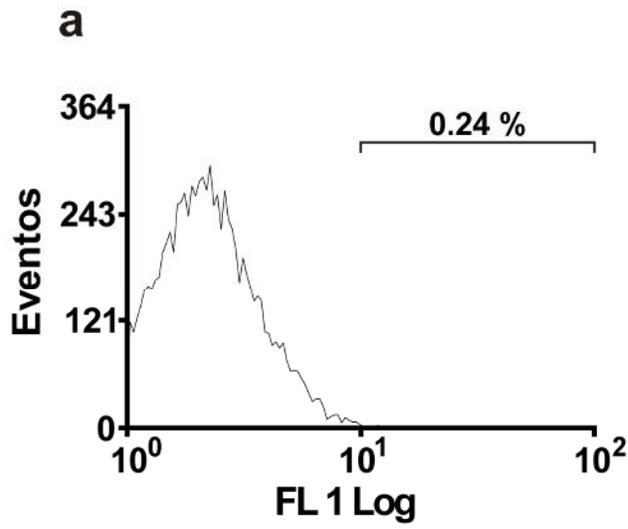
**Figura 24. Análisis de externalización de fosfatidilserina por microscopia**

**confocal.** Trofozoítos de *E. histolytica* fueron incubados con Anexina V acoplada a FITC y observados por microscopia confocal. **a y b):** Trofozoítos sin tratamiento. **c):** Amplificación de un trofozoíto sin tratamiento. **d y e):** Trofozoítos tratados con etanol (0.4%). **f):** Amplificación de un trofozoíto tratado con etanol (0.4%). **g y h):** Trofozoítos tratados con una IC<sub>50</sub> de resveratrol. **i):** Amplificación de un trofozoíto tratado con una IC<sub>50</sub> de resveratrol. **j y k):** Trofozoítos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM. **l)** Amplificación de un trofozoíto tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM.



**Figura 25. Análisis de la externalización de fosfatidilserina por citometría de flujo en trofozoítos tratados con resveratrol.**

Trofozoítos de *E. histolytica* fueron marcados con Anexina V acoplada a FITC y cuantificados por medio de citometría de flujo. **A)** Trofozoítos sin tratamiento **B)** Trofozoítos tratados con etanol (0.4%). **C)** Trofozoítos tratados con una IC<sub>50</sub> de resveratrol. **D)** Trofozoítos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM.



## **6.15. Fragmentación del DNA en trofozoítos de *E. histolytica* tratados con resveratrol**

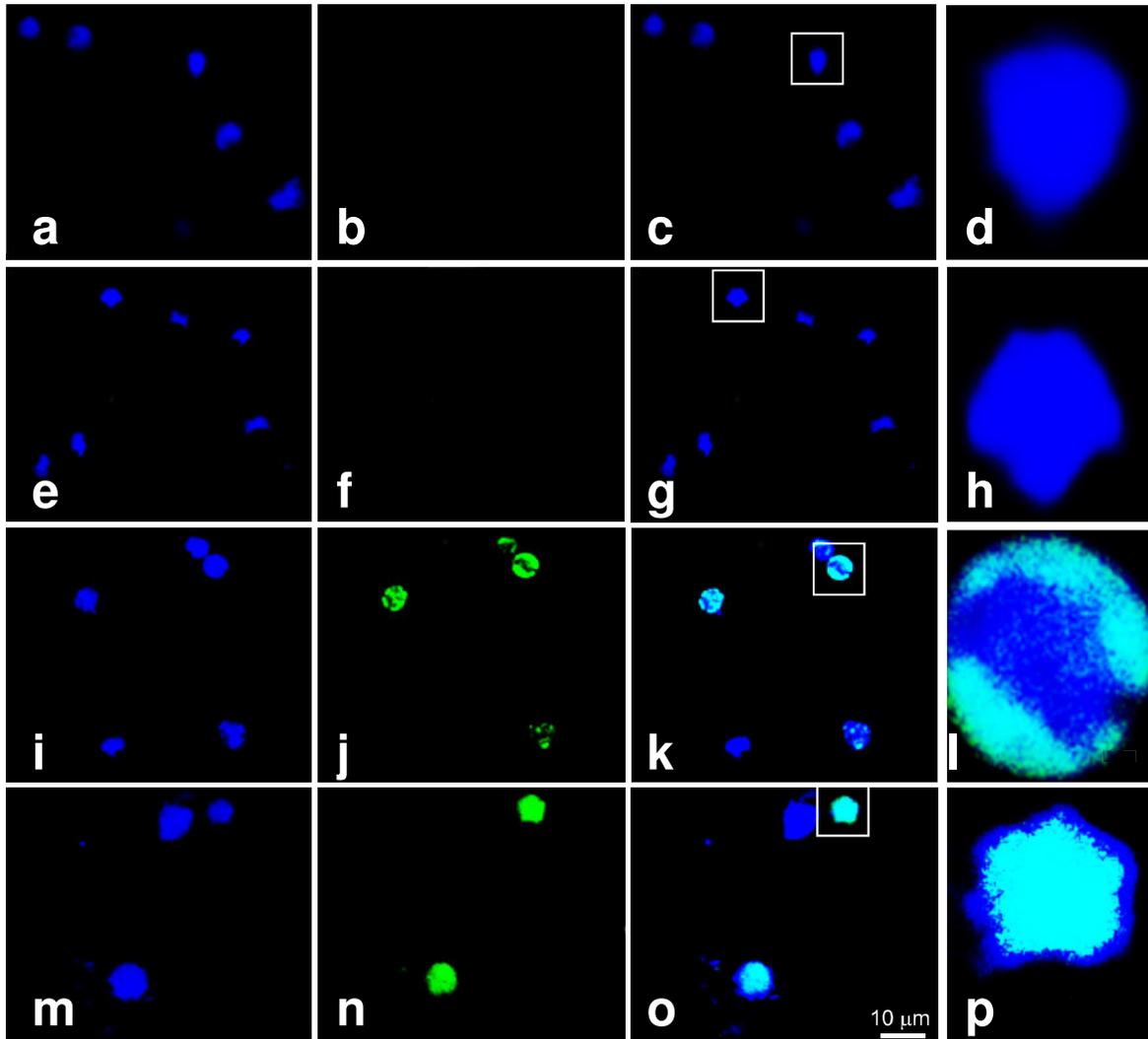
La fragmentación del DNA es una característica importante en células que presentan apoptosis Martin, (1995). Por tanto, para obtener mayores evidencias de que el resveratrol conducía a los trofozoítos a la muerte por apoptosis, usamos la técnica de TUNEL como se indica en materiales y métodos, para evaluar la integridad del DNA en amibas tratadas con la IC<sub>50</sub> resveratrol.

Imágenes obtenidas por microscopia confocal mostraron que los trofozoítos tratados con la IC<sub>50</sub> de resveratrol y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM (control positivo), presentaron señal positiva para TUNEL (**Fig. 26**). Sin embargo, en los trofozoítos no tratados o tratados con etanol no se evidenció señal positiva para TUNEL (**Fig. 26**). En estos experimentos los núcleos se tiñeron con DAPI para observar la colocalización de la señal de TUNEL en el núcleo (**Fig. 26**)

El número de trofozoítos con señal positiva para TUNEL se cuantificó por ensayos de citometría de flujo. Trofozoítos expuestos al resveratrol y al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM presentaron 14.18% y 27.18% señal positiva para la reacción de TUNEL respectivamente. En contraste, los trofozoítos no tratados y tratados con etanol, solo presentaron 0.4% de señal positiva para TUNEL (**Fig. 27**).

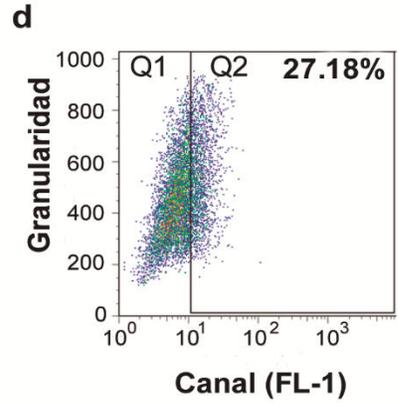
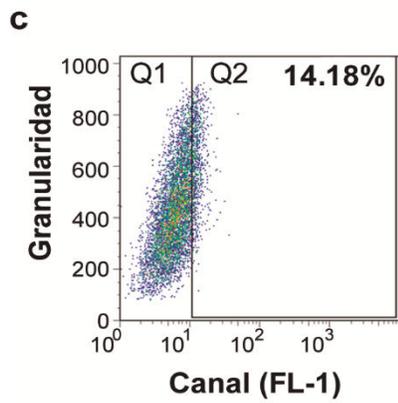
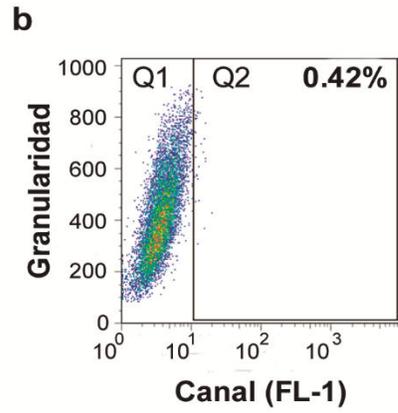
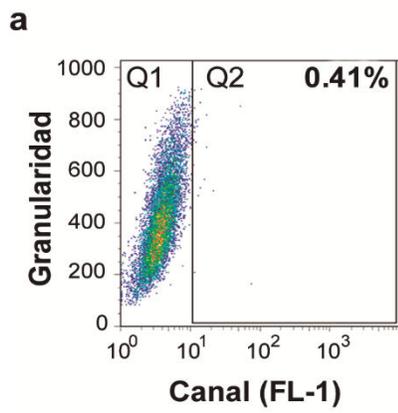
**Figura 26. Determinación de la fragmentación del DNA de trofozoítos de *E. histolytica* por microscopia confocal usando la técnica de TUNEL.**

La fragmentación del DNA en trofozoítos de *E. histolytica* se evidenció por la incorporación de dUTP marcado con FITC utilizando la reacción de TUNEL y se observó por medio de microscopia confocal. **a, e, i y m**): Núcleos de trofozoítos teñidos con DAPI para las condiciones de: sin tratamiento, tratados con etanol (0.4%), tratados con una IC<sub>50</sub> de resveratrol y tratados con 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente. **b y f**): Núcleos con señal negativa para TUNEL para las condiciones de: sin tratamiento, tratados con etanol (0.4%) respectivamente. **j y n**): Núcleos con señal positiva para la señal de TUNEL para las condiciones de: tratados con una IC<sub>50</sub> de resveratrol y tratados con 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente. **c, g, k y o**): Núcleos con sobreposición de los canales azul (DAPI) y verde (FITC) para las condiciones de: sin tratamiento, tratados con etanol (0.4%), tratados con una IC<sub>50</sub> de resveratrol y tratados con 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente. **d, h, l, y p**): Amplificación de núcleos con sobreposición de canales azul y verde para las condiciones de: sin tratamiento, tratados con etanol (0.4%), tratados con una IC<sub>50</sub> de resveratrol y tratados con 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente.



**Figura 27. Análisis de la fragmentación del DNA por la técnica de TUNEL en trofozoítos de *E. histolytica* mediante citometría de flujo.**

La fragmentación del DNA en trofozoítos de *E. histolytica* se evidenció por la incorporación de dUTP marcado con FITC utilizando la reacción de TUNEL y se analizó por medio de citometría de flujo. **a)** Trofozoítos sin tratamiento **b)** Trofozoítos de *E. histolytica* tratados con etanol (0.4%). **c)** Trofozoítos tratados con una IC<sub>50</sub> de resveratrol. **d)** Trofozoítos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM.



## 6.16. Determinación del calcio intracelular, la actividad de calpaina y SOD en trofozoítos de *E. histolytica* tratados con resveratrol.

Otra característica que presentan las células en proceso de apoptosis es el incremento de la concentración intracelular del catión  $\text{Ca}^{2+}$  (McConkey, y Orrenius, 1996). Por tanto, medimos este parámetro bioquímico en trofozoítos tratados con resveratrol, para ello se utilizó el indicador de calcio fluorescente Fluo-4 AM.

Los trofozoítos tratados con resveratrol presentaron una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de 149 nM, a su vez, los tratados con  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.5 mM mostraron 204 nM; en contraste, las células no tratadas y tratadas con etanol presentaron una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de 31 y 39 nM respectivamente (**Fig. 28**).

El incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular conlleva a la activación de enzimas, como caspasas y calpainas (Tantral, y Col., 2004. Squier, y Cohen, 1996). Dichas enzimas pertenecen a la familia de proteasas de cisteína y tienen actividad proteolítica sobre factores de transcripción, proteínas de membrana, proteínas de citoesqueleto y enzimas encargadas de la reparación o degradación del DNA durante el proceso de apoptosis (Jordan, 2003). Sin embargo, hasta la fecha no se ha identificado la actividad caspasas en *E. histolytica*, pero si se ha observado un incremento en la actividad de calpainas durante el proceso de apoptosis en este parásito (Ghosh, y Col., 2010. Nandi, y Col., 2010). Por lo cual, en este trabajo también se midió la actividad de calpaina en los trofozoítos tratados con resveratrol, como un marcador bioquímico para apoptosis. Se utilizó la secuencia Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC previamente reportada por Kohli, (1997), como sustrato de las calpainas, ya que por acción de las calpainas el AMC se libera y tiene la

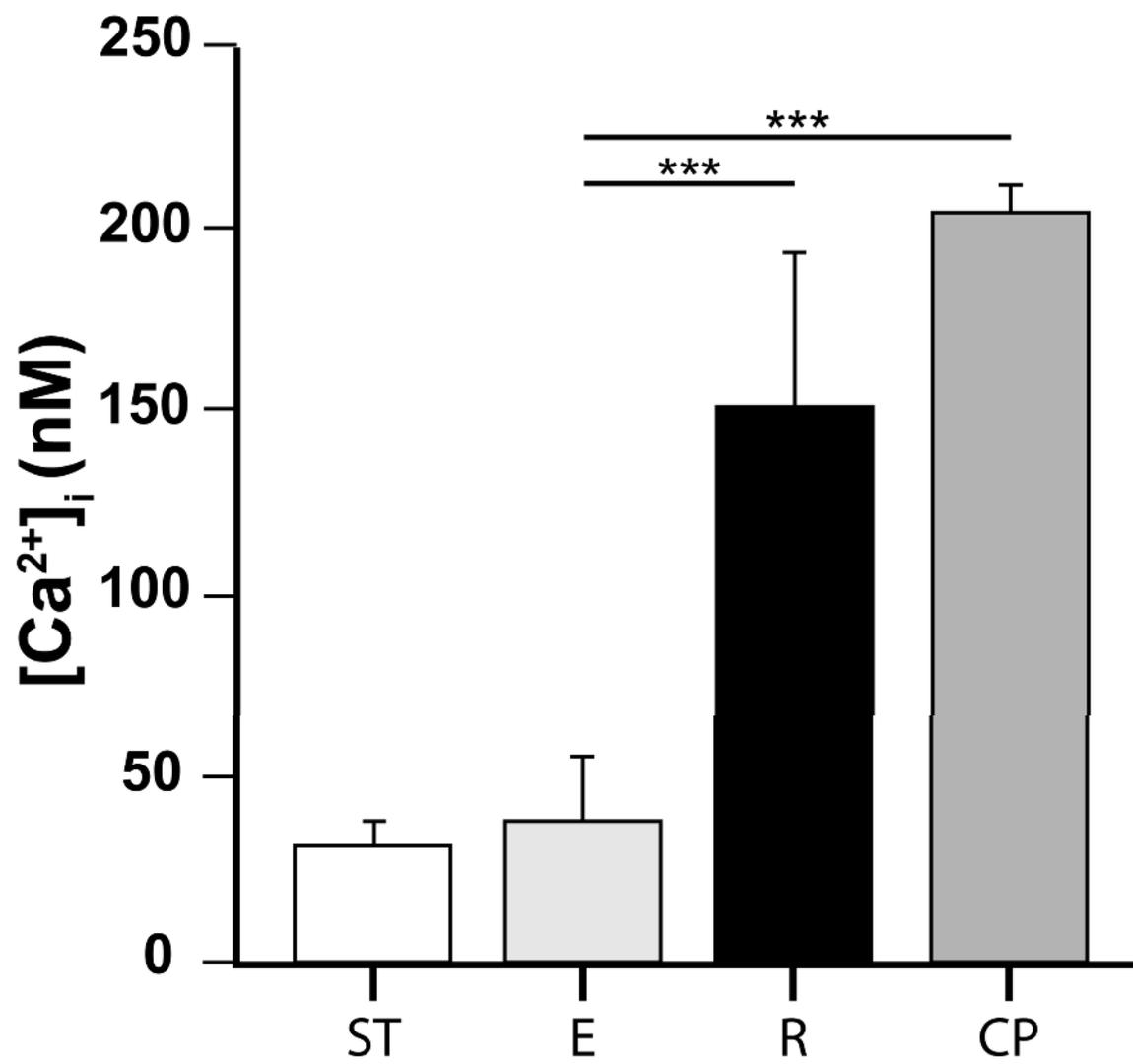
capacidad de emitir fluorescencia cuando se excita a longitudes de onda entre 340 y 360 nm. Los trofozoítos tratados con resveratrol presentaron una actividad enzimática de calpainas de 8 U/mg, mientras que en las células expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la actividad de calpainas fue de 12 U; en contraste, la actividad para las células no tratadas y tratadas con etanol fue de 4 U/mg (**Fig. 29**).

Por otro lado, la SOD es una enzima importante para la protección de la célula contra la oxidación, sin embargo cuando disminuye su expresión, las células se vuelven más susceptibles a la inducción de apoptosis (Matsui, y Col., 2003).

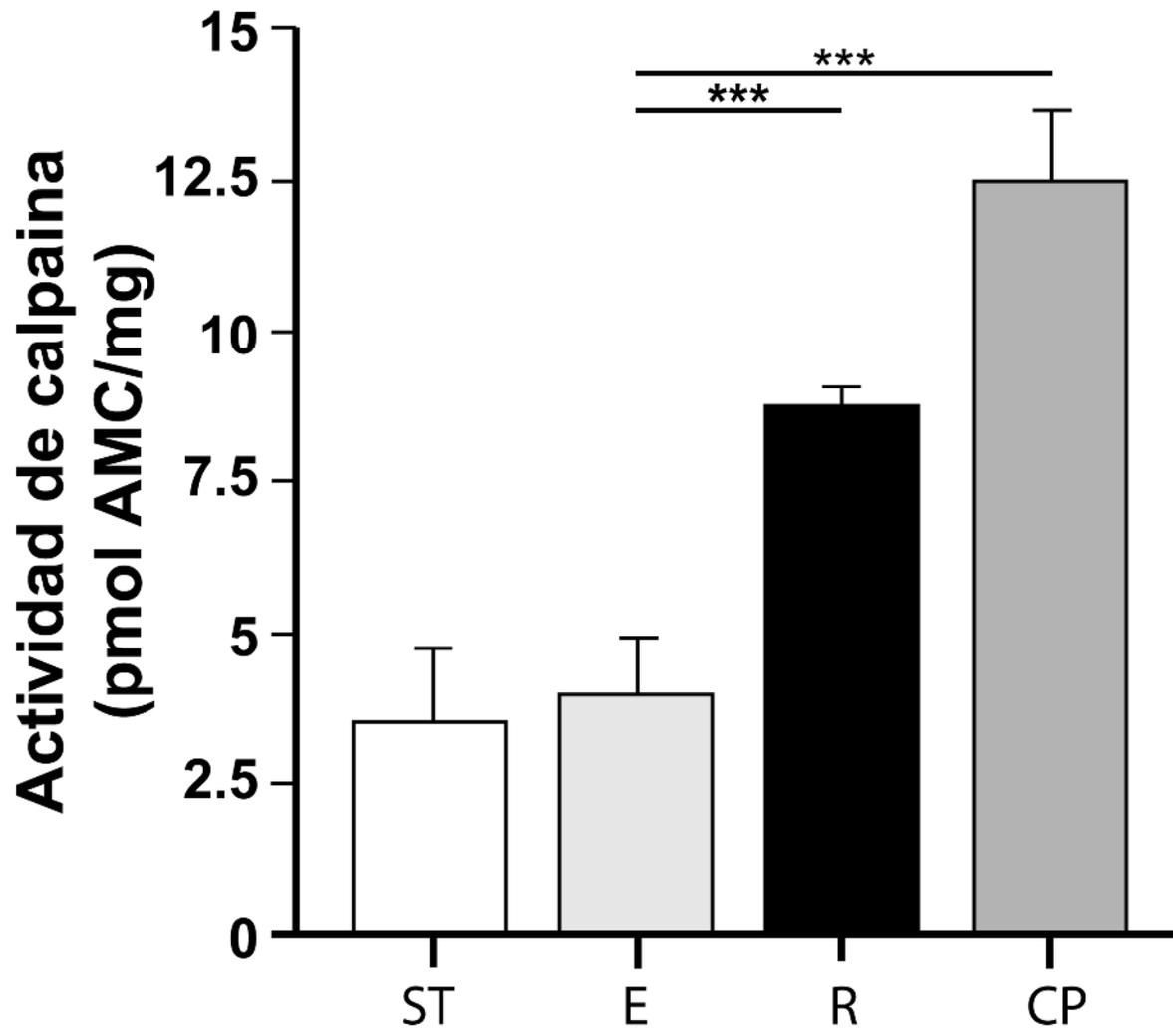
Asimismo, en trofozoítos de *E. histolytica* durante la apoptosis se ha visto la disminución de su expresión y actividad enzimática (Nandi, y Col., 2010). Por lo que, en este trabajo también se midió la actividad enzimática de SOD como un marcador bioquímico de la apoptosis en *E. histolytica*.

Los trofozoítos tratados con resveratrol presentaron 2 U/mg de SOD, en comparación con los trofozoítos no tratados y tratados con etanol, que presentaron 5 y 4 U/mg respectivamente. Los trofozoítos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentaron 1 U/mg (**Fig. 30**). Los resultados bioquímicos presentados en este trabajo son similares a los de otros trabajos donde se estudió la apoptosis en trofozoítos de *E. histolytica* (Ghosh, y Col., 2010. Nandi, y Col., 2010).

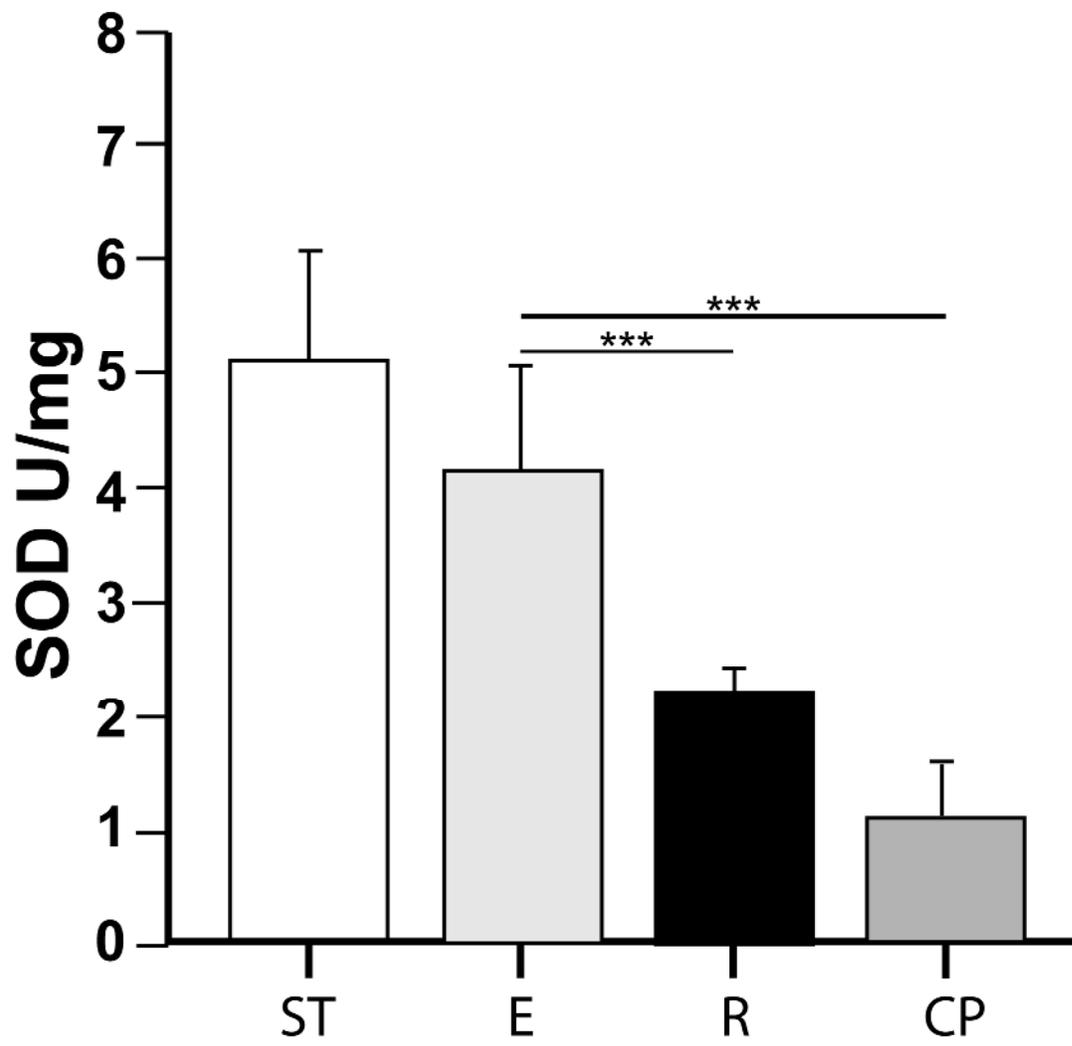
**Figura 28. Cuantificación de calcio intracelular.** El calcio citosólico se midió en trofozoítos de *E. histolytica* y empleando Fluo4-AM se usó como sonda fluorescente para la cuantificación de calcio. **ST:** Trofozoítos sin tratamiento. **E:** Trofozoítos tratados con etanol (0.4%). **R:** Trofozoítos tratados resveratrol con una  $IC_{50}$  **CP:** Control positivo; trofozoítos tratados con  $H_2O_2$  0.5 mM. El histograma muestra el promedio de la concentración del  $Ca^{2+}$  intracelular, la desviación estándar muestra la dispersión que hubo entre los tres experimentos independientes. Los asteriscos muestran el grado de significancia \*\*  $p < 0.001$ .



**Figura 29. Medición de la actividad enzimática de calpaina en trofozoítos de *E. histolytica*.** La actividad de calpaina se midió utilizando extractos proteicos totales de trofozoítos incubados con el sustrato Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Cuando el AMC se libera por la acción de las calpainas tiene la capacidad de emitir fluorescencia, la cual se mide en un fluorómetro. La longitud de excitación para el AMC fue de 355 nm y la longitud de emisión fue de 460 nm. **ST:** Trofozoítos sin tratamiento. **E:** Trofozoítos tratados con etanol (0.4%). **R:** Trofozoítos tratados resveratrol con una IC<sub>50</sub> **CP:** Control positivo; trofozoítos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM. El histograma muestra el promedio de la actividad enzimática de calpainas, la desviación estándar muestra la dispersión que hubo entre los tres experimentos independientes. Los asteriscos muestran el grado de significancia \*\*\* p<0.001.



**Figura 30. Medición de la actividad enzimática de la SOD en trofozoítos de *E. histolytica*.** La actividad de la SOD se midió utilizando extractos proteicos totales de trofozoítos de *E. histolytica* utilizando el SOD kit Assay (Sigma-Aldrich). **ST:** Trofozoítos sin tratamiento. **E:** Trofozoítos tratados con etanol (0.4%). **R:** Trofozoítos tratados resveratrol con una IC<sub>50</sub> **CP:** Control positivo; Trofozoítos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM. El histograma muestra el promedio de la actividad enzimática de SOD, la desviación estándar muestra la dispersión que hubo entre los tres experimentos independientes. Los asteriscos muestran el grado de significancia \*\*\* p<0.001.



### **6.17. Efecto citopático de trofozoítos de *E. histolytica* sobre monocapas de la línea celular MDCK**

El efecto del resveratrol sobre la virulencia en parásitos ha sido muy poco estudiado. Sin embargo, en el 2012 Aqeel y Col., demostraron que el resveratrol tiene la capacidad de afectar la virulencia en el parásito *A. castellanii* ya que dicho compuesto disminuye la adhesión y su efecto citotóxico de *A. castellanii* sobre el cultivo primario de células endoteliales de la microvasculatura de cerebro humano. Por lo que, en esta tesis también se evaluó el efecto de resveratrol sobre la virulencia de *E. histolytica*.

Para determinar si la exposición del resveratrol tenía efectos sobre la habilidad de los trofozoítos de *E. histolytica* para destruir las monocapas de las células MDCK, se realizaron ensayos de interacción entre los trofozoítos no tratados y tratados con resveratrol sobre monocapas de células MDCK.

Los trofozoítos de *E. histolytica* se trataron con diferentes concentraciones de resveratrol a 37 °C durante 12 h. Después se determinó la viabilidad celular y se utilizaron los trofozoítos siempre y cuando la viabilidad fuera mayor del 95%.

Luego de 2 h de interacción con trofozoítos no tratados, las monocapas celulares presentaron un promedio de 65.19% de destrucción (**Fig. 31**). De forma similar, las amibas tratadas con etanol al 0.4% presentaron un 63.93% de destrucción celular. Por el contrario, los trofozoítos tratados con resveratrol presentaron una eficiencia menor para destruir las monocapas de células MDCK, cada vez que estas sólo produjeron un 39.21, 11.01 y 4.91% de destrucción para concentraciones de 72, 109 y 219  $\mu$ M de resveratrol respectivamente (**Fig. 31**).

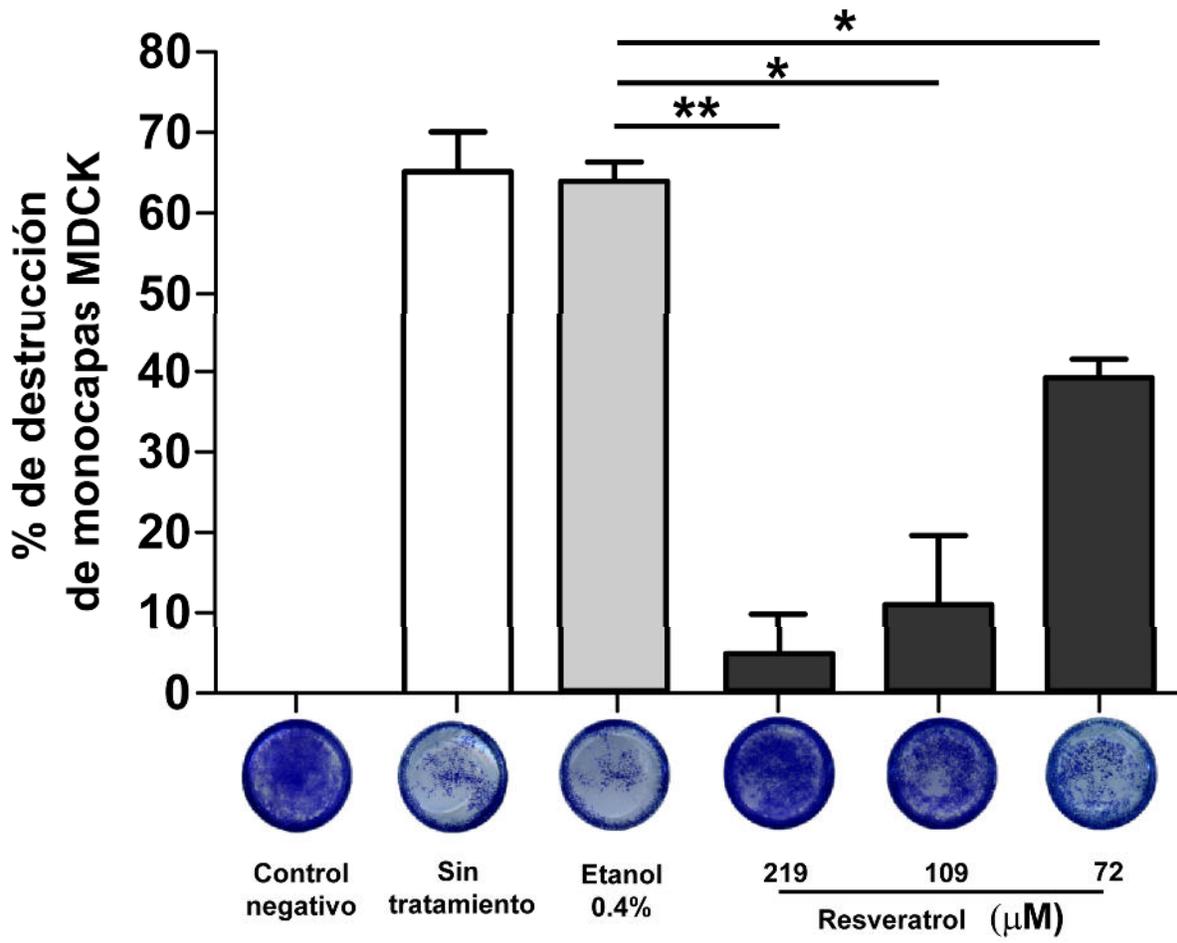
### **6.18. Eritrofagocitosis de los trofozoítos de *E. histolytica* tratados con resveratrol**

Dado que la fagocitosis es considerada un factor de virulencia en *E. histolytica*, se analizó si el resveratrol tenía repercusiones sobre ésta, mediante ensayos de eritrofagocitosis. Los tiempos que se incluyeron en las cinéticas fueron de 0, 2, 5, 10 y 20 min de contacto entre eritrocitos y trofozoítos. Las tasas de eritrofagocitosis entre los trofozoítos no tratados y los trofozoítos tratados durante 12 h con una concentración de resveratrol de 109  $\mu\text{M}$  fueron diferentes de forma significativa, ya que el tratamiento con resveratrol disminuyó la fagocitosis alrededor de un 50%, así mismo, se alcanzó la fase meseta a los 10 min (**Fig. 32**).

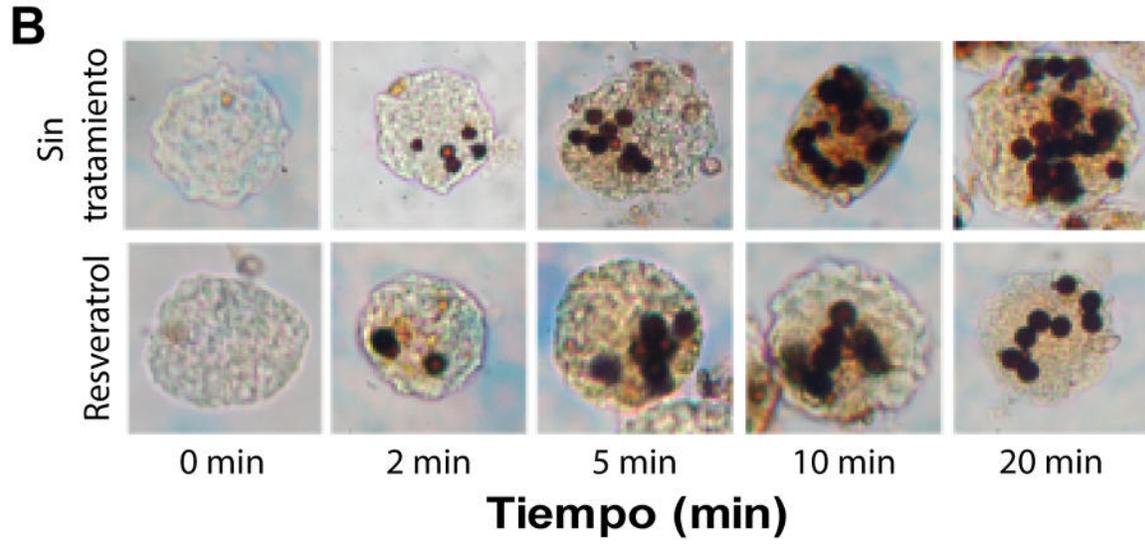
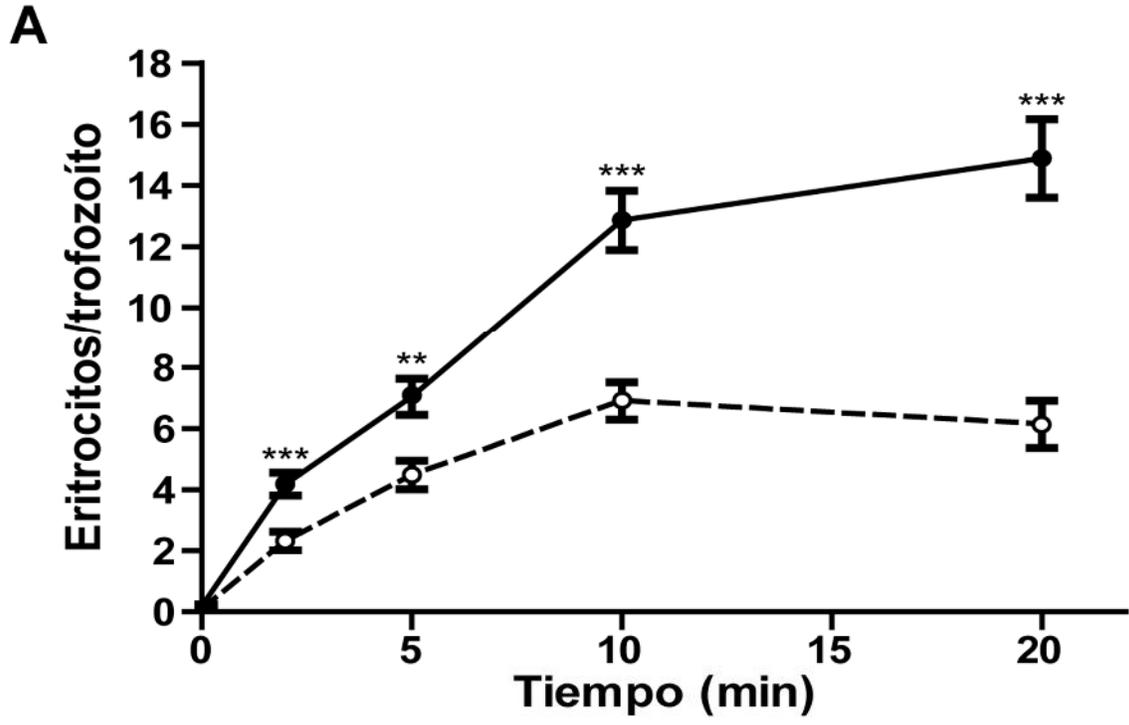
### **6.19. Evaluación del enquistamiento en *E. invadens* durante el tratamiento con resveratrol**

La búsqueda de principios activos que actúen sobre el enquistamiento de *E. histolytica* contribuirá tanto en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la amebiasis, así como, en la generación de estrategias con la finalidad de controlar la diseminación de este parásito. Sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado obtener la producción de quistes de *E. histolytica* de forma experimental. Por lo cual, en este trabajo se determinó el efecto inhibitorio producido por el resveratrol sobre el enquistamiento en *E. invadens* ya que este parasito tiene mucha similitud con *E. histolytica* (López-Romero, y Villagómez-Castro, 1993). Cabe destacar que el resveratrol no afecta la viabilidad de *E. invadens* (datos no mostrados). Al utilizar resveratrol 219  $\mu\text{M}$  se inhibió la generación de quistes en un 81% comparado con los trofozoítos control que se indujeron a enquistamiento, los cuales mostraron un porcentaje relativo del 100%, tanto para aquellos donde no se aplicó tratamiento, así como, aquellos que se trataron con etanol (**Fig. 33**).

**Figura 31. Efecto citopático de trofozoítos de *E. histolytica* sobre monocapas de células MDCK.** Monocapas de células epiteliales MDCK fueron incubadas con trofozoítos de *E. histolytica* durante aproximadamente 2 h. Posteriormente el daño en la monocapa se evaluó por tinción con azul de metileno El histograma muestra el promedio del porcentaje de destrucción de las monocapas de MDCK, la desviación estándar muestra la dispersión que hubo entre los tres experimentos independientes. Los asteriscos muestran el grado de significancia \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



**Figura 32. Eritrofagocitosis de trofozoítos de *E. histolytica*.** La tasa de eritrofagocitosis de los trofozoítos sin tratamiento y tratados con resveratrol a una concentración de 109  $\mu$ M durante 12h se evaluó a 0, 2, 5, 10 y 20 min. **A)** Los puntos muestran el promedio de los eritrocitos fagocitados por cada trofozoíto, la desviación estándar muestra la dispersión que hubo entre los tres experimentos independientes. Los asteriscos muestran el grado de significancia \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . **B)** Imágenes representativas de trofozoítos con eritrocitos fagocitados.



## 6.20 Propiedades de virulencia *in vivo* de los trofozoítos tratados con resveratrol

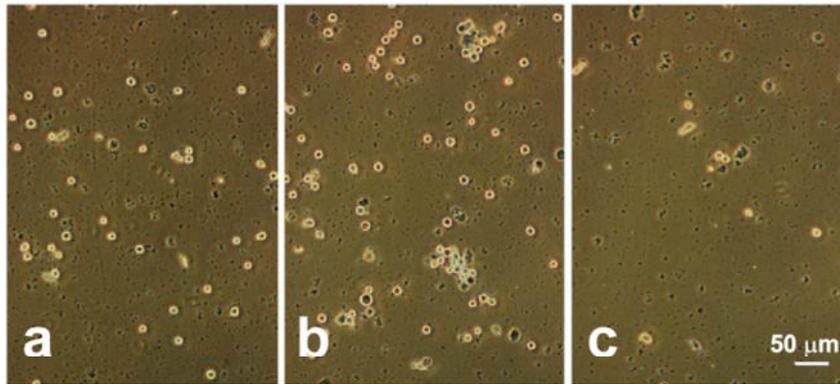
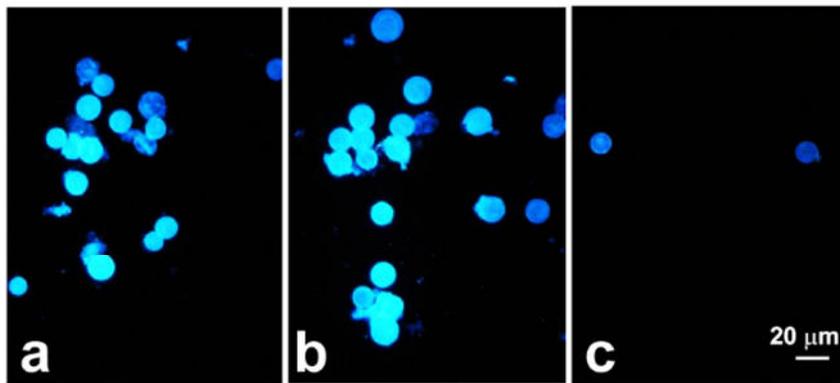
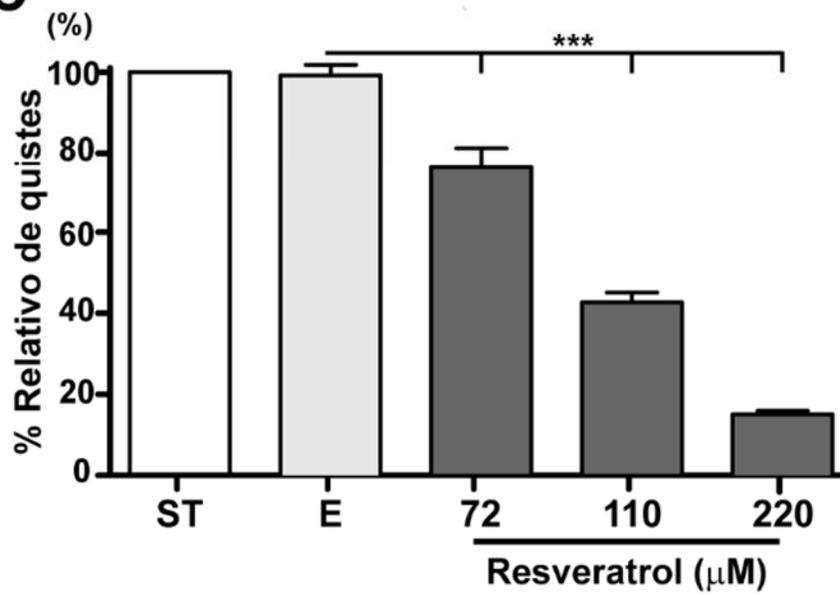
Con la intención de investigar si el tratamiento con resveratrol tenía alguna influencia en las amibas, en su capacidad para inducir la formación de AHA en hámsteres, se realizaron ensayos de virulencia *in vivo* con trofozoítos tratados con resveratrol 109  $\mu$ M durante 12 h. Como control, se analizó la capacidad de inducir el daño hepático de los trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS sin tratamiento. Dos grupos de 8 hámsteres fueron inoculados con trofozoítos de *E. histolytica*. De los cuales, El grupo que fue inoculado con trofozoítos tratados con resveratrol, ninguno de los animales presentó daño hepático (**Fig. 34A**). Por el contrario, los 8 hámsteres infectados con los trofozoítos sin tratamiento desarrollaron AHA con un promedio de 67.9% de daño hepático (**Fig. 34B**). Para descartar, que los trofozoítos que se inocularon estaban en un proceso de muerte celular se realizó una cinética de crecimiento, en la cual, se observó que los trofozoítos que fueron expuestos durante 12 h a resveratrol y después se retiró dicho compuesto, no presentaron diferencia en el crecimiento con respecto a las amibas sin tratamiento (**Fig. 34C**). Con esto se puede concluir que los trofozoítos tratados con resveratrol son viables pero incapaces de generar AHA en hámsteres.

**Figura 33. Enquistamiento de trofozoítos de *E. invadens*.**

Los trofozoítos de *E. invadens* se indujeron a enquistamiento utilizando el medio LG 47%, suplementado con 5% de suero de bovino adulto.

**A)** Imágenes tomadas en un microscopio de contraste de fases.

**a)** Amibas sin tratamiento. **b)** Amibas tratados con etanol (0.4%), **c)** Amibas tratados con una IC<sub>50</sub> de resveratrol. **B)** Imágenes de amibas observadas en un microscopio de epifluorescencia teñidas con blanco de calcofluor. **a)** Amibas sin tratamiento. **b)** Amibas tratados con etanol (0.4%), **c)** Amibas tratados con una IC<sub>50</sub> de resveratrol. **C)** Conteo de quistes de *E. invadens*, el número de quistes de amibas sin tratamiento se tomó como el 100% de enquistamiento. **ST)** Amibas inducidas a enquistamiento sin tratamiento **E)** Amibas inducidas a enquistamiento tratados con etanol (0.4%). **R)** Amibas inducidas a enquistamiento que se trataron con resveratrol. El histograma muestra el promedio del porcentaje del enquistamiento relativo, la desviación estándar muestra la dispersión que hubo entre los tres experimentos independientes. Los asteriscos muestran el grado de significancia \*\*\*  $p < 0.001$ .

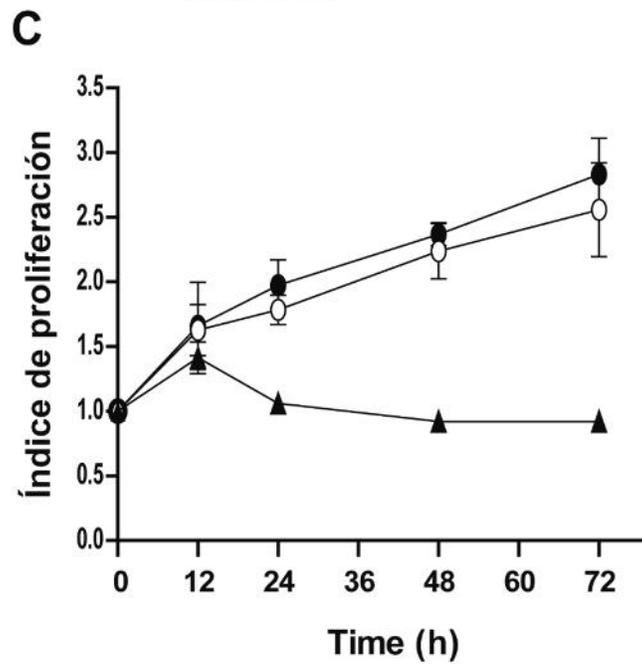
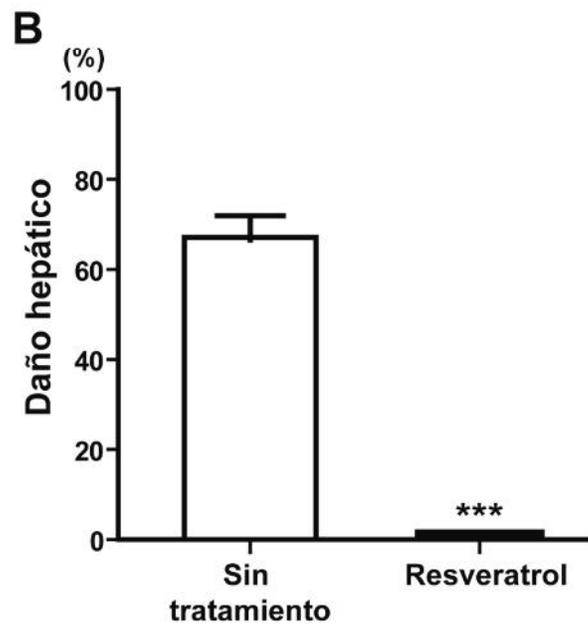
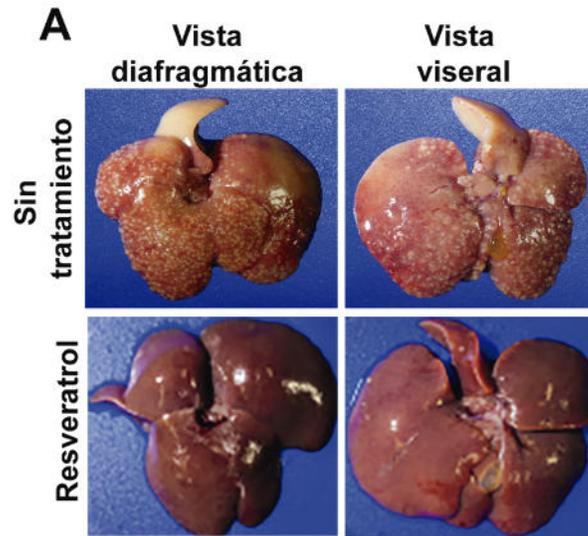
**A****B****C**

**Figura 34. Formación de AHA en hámsteres inducidos por trofozoítos de *E.***

***histolytica*.** Grupos de 8 animales se inocularon con  $2 \times 10^6$  trofozoítos de *E. histolytica*, sin tratamiento, así como, trofozoítos tratados con resveratrol a una concentración de  $119 \mu\text{M}$  durante 12 h. A los siete días del reto los animales se sacrificaron y se diseccionaron los hígados para evaluar el daño hepático. A) Fotografías de las vistas diafragmáticas y viscerales de hígados de hámsteres infectados con  $2 \times 10^6$  trofozoítos de *E. histolytica*.

**B)** El porcentaje de daño hepático se calculó por el peso del daño hepático con respecto al peso total del hígado. La barra horizontal representa el promedio del daño hepático, la caja representa la distribución del 50%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos.

**C)** Grafica del índice de proliferación de trofozoítos Los círculos negros representan trofozoítos sin tratamiento; Los círculos vacíos representan a trofozoítos tratados con resveratrol  $119 \mu\text{M}$  y retirado a las 12 h; Los triángulos representan a trofozoítos tratados con resveratrol  $119 \mu\text{M}$  durante 72 h. Los asteriscos muestran el grado de significancia \*\*\*  $p < 0.01$ .



## **6.21. Actividad amebicida del resveratrol en hámsteres inoculados con trofozoítos virulentos**

Para evaluar el potencial amebicida del resveratrol en animales inoculados con trofozoítos virulentos, a los hámsteres se administró resveratrol con dosis de 100 mg/Kg/ tres veces al día (dos días antes y 10 días después de la inoculación de los trofozoítos amebianos). Los animales a los que se les administró etanol y que no se inocularon con amibas presentaron hígados sanos (**Fig. 35**). Sin embargo, todos los animales que se inocularon con amibas y que se les administró etanol, desarrollaron AHA con un daño del tejido hepático del 80% aproximadamente. En contraste, los hámsteres tratados con resveratrol presentaron un daño de aproximadamente 17.28% (**Fig. 35**). De forma interesante, el 55% de los animales inoculados con trofozoítos y tratados con resveratrol no presentaron AHA, el 33% mostró pequeños abscesos y el 11% presentó daño hepático de alrededor del 30%. Los animales que se trataron con resveratrol presentaron sus órganos como; bazo, riñones y pulmones con apariencia normal. Como control de fármaco se utilizó metronidazol y los animales que fueron tratados con éste no presentaron abscesos.

Para analizar el daño a nivel histológico de los animales, se realizaron cortes histológicos de los hígados y se tiñeron con la técnica de Hematoxilina y Eosina. Los animales que no fueron inoculados con trofozoítos presentaron un parénquima hepático normal (**Fig. 36**). Sin embargo, los animales a los que se les inoculó amibas y se les administró el vehículo presentaron un daño importante en el cual se apreciaron grandes granulomas y un proceso inflamatorio crónico. Los granulomas presentaron áreas extensas de necrosis, las cuales estaban

fusionadas y las amibas estaban mayoritariamente en los bordes de los granulomas (**Fig. 36**). En los animales tratados con resveratrol y que no se observó el AHA, la apariencia del parénquima hepático fue similar a la de los hígados sanos; mientras que los animales que presentaron pequeños abscesos, mostraron una disminución significativa en el tamaño de los granulomas, así mismo, las áreas de inflamación disminuyeron (**Fig.36**). Por su parte, el parénquima hepático de los animales tratados con metronidazol tenía una apariencia normal (**Fig. 36**).

Para evaluar la carga parasitaria en el AHA se realizaron ensayos de inmunohistoquímica empleando el anticuerpo específico contra la proteína EhCP112. Los cortes histológicos de los hígados de los animales no inoculados con trofozoítos, no presentaron señal positiva para la EhCP112 (**Fig. 37 A y G**). Por su parte, la carga parasitaria de los animales que se inocularon con amibas y se les administró etanol presentaron un promedio de 77.5 trofozoítos por  $\text{mm}^2$  (**Fig. 37 B y G**). Mientras que los animales tratados con resveratrol con AHA tuvieron un promedio de 19.2 trofozoítos por  $\text{mm}^2$  (**Fig. 37 D y G**), los animales que se trataron con resveratrol en los cuales no se observó el AHA, no se detectó carga parasitaria (**Fig. 37 C**), de manera similar en las inmunohistoquímicas de los hígados de los animales tratados con metronidazol no se detectó carga parasitaria (**Fig. 37 E y G**). En el control negativo de las inmunohistoquímicas donde las preparaciones se incubaron con suero de conejo preinmune no se detectó señal positiva (**Fig. 37 F**).

**Figura 35. Evaluación del potencial amebicida del resveratrol en hámsteres inoculados con trofozoítos de *E. histolytica*.**

Grupos de ocho animales se inocularon con  $2 \times 10^6$  trofozoítos de *E. histolytica*. **A)** fotografías de las vistas diafragmáticas y viscerales de los hígados de los hámsteres.

**B)** El porcentaje de daño hepático se calculó por el peso del daño hepático con respecto al peso total del hígado. El histograma muestra el promedio del porcentaje del daño hepático, la desviación estándar muestra la dispersión que hubo entre los tres experimentos independientes.

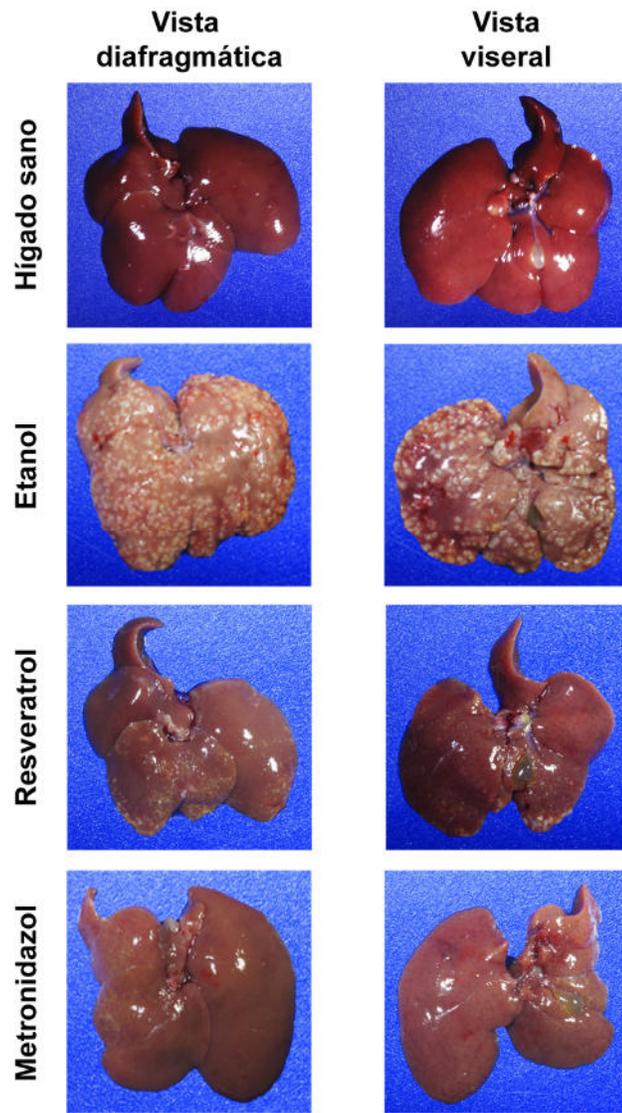
Grupo 1: Animales sin inocular y tratado con etanol, Grupo 2: Animales inoculados y tratados con etanol, Grupo 3: Animales inoculados y tratados con 100 mg/kg de resveratrol cada 8 h (dos días antes y diez días después de la inoculación), Grupo 4: Animales inoculados y tratados con 20 mg/kg de metronidazol cada 8 h por diez días. A los diez días después del reto los animales se sacrificaron y se diseccionaron los hígados para evaluar el daño hepático. Los asteriscos muestran el grado de significancia \*\*\*  $p < 0.001$ .

### **Figura 36. Histología del AHA en hámsteres**

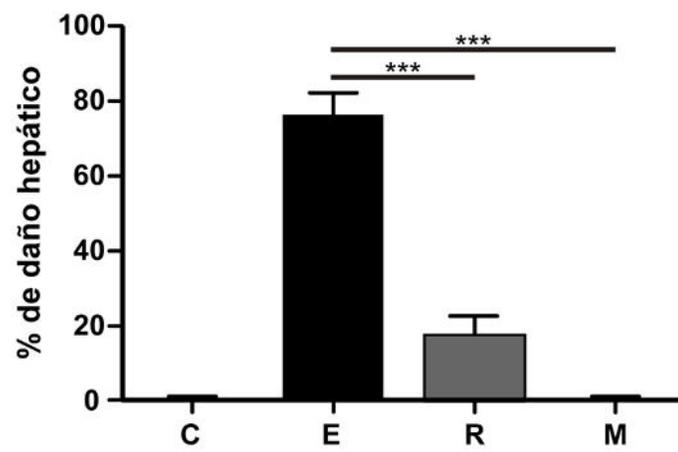
Los cortes histológicos obtenidos de los hígados de los hámsteres se tiñeron con la técnica de Hematoxilina y Eosina y se observaron en un microscopio óptico. **A)** Histología de animales no inoculados con amibas y tratados con etanol y **B) y C)** Histología de animales inoculados con amibas y tratados con etanol (dos días antes y diez días después del reto con amibas virulentas) **D) y E)** Histología de animales inoculados con amibas y tratados con resveratrol **F)** Histología de animales inoculados y tratados con metronidazol.

PH: Parénquima hepático. VC: Vena centro lobulillar, H: hepatocitos, N: Necrosis, RI: Reacción inflamatoria, VP: Vena portal, Cabeza de flecha: Trofozoítos, Flecha: Células epiteloides.

**A**



**B**



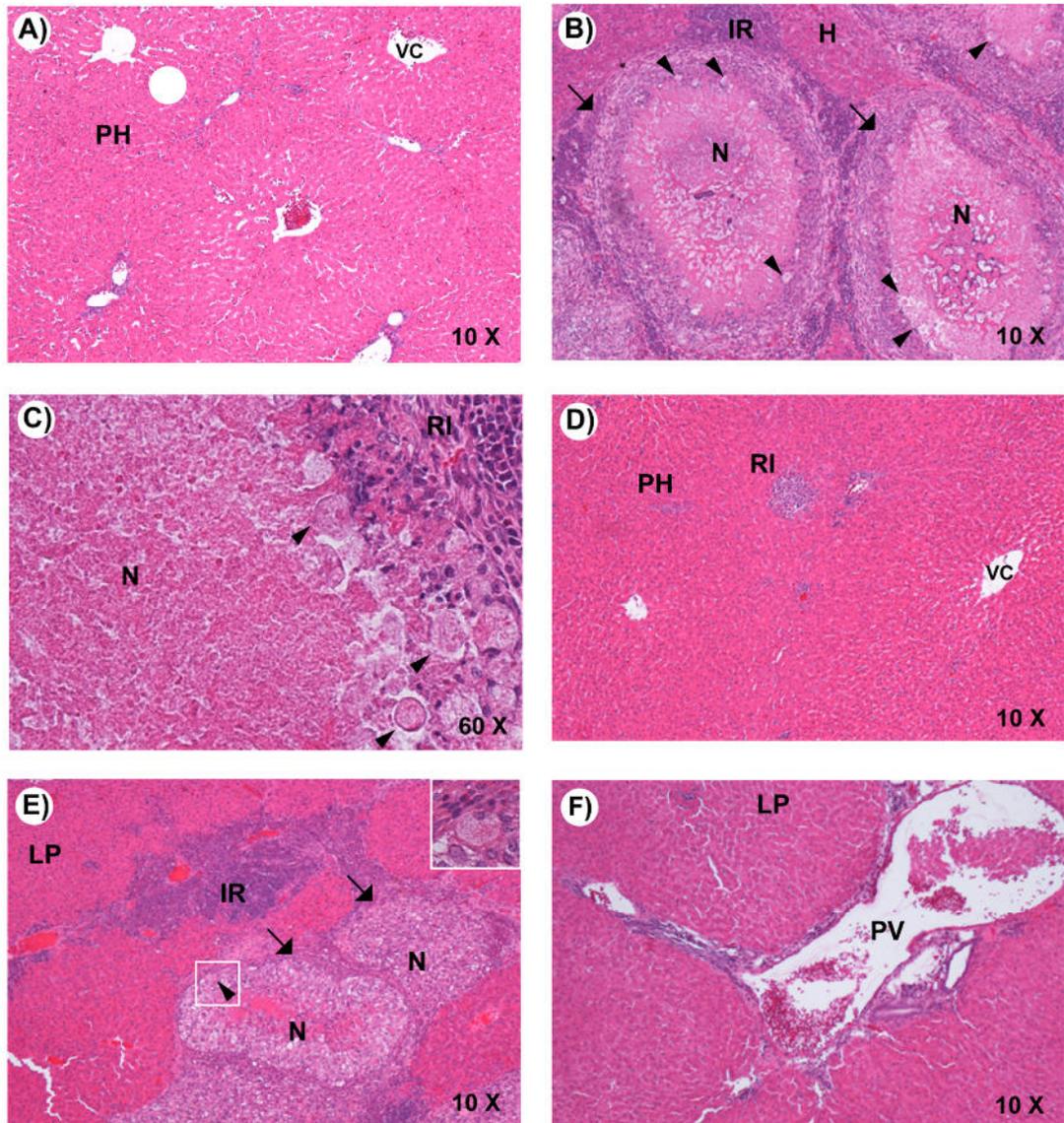
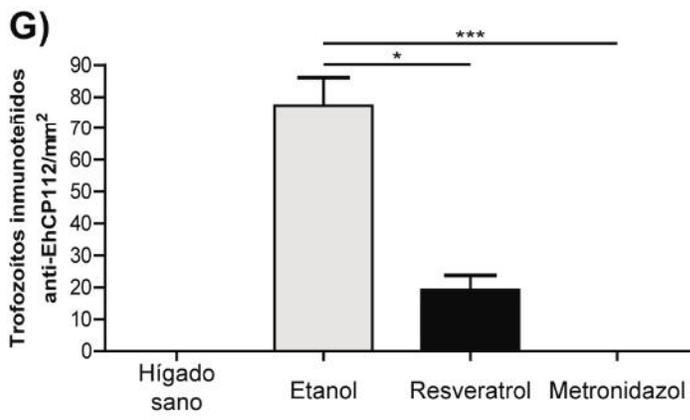
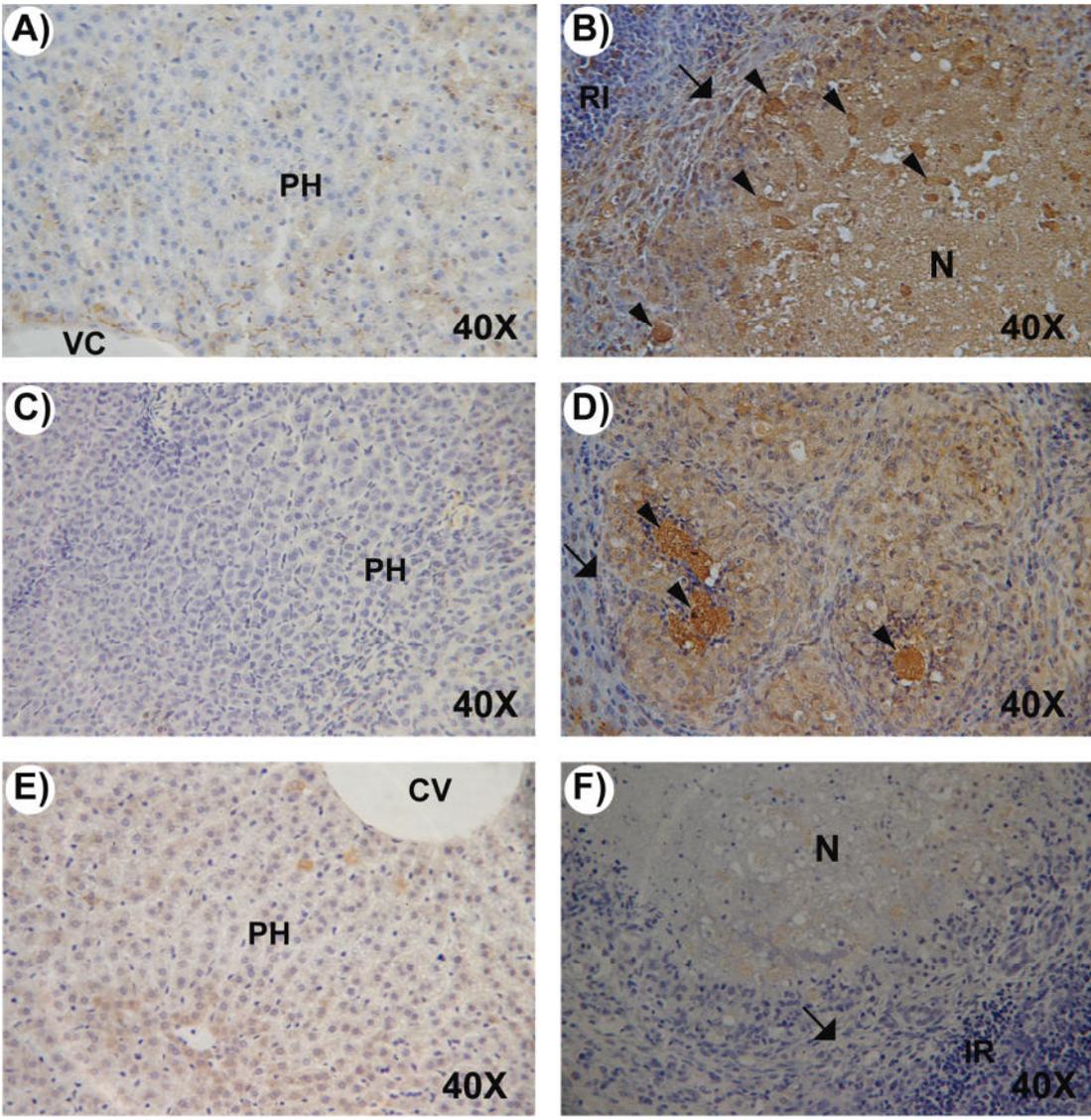


Figura 36. Histología del AHA en hámsteres.

**Figura 37. Evaluación de la carga parasitaria en cortes histológicos del AHA.**

Los cortes histológicos obtenidos de los hígados de los hámsteres se procesaron para inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-EhCP112 para evidenciar a los trofozoítos de *E. histolytica* y evaluar la carga parasitaria por conteo del número de parásitos por mm<sup>2</sup> empleando de un microscopio de luz. Las imágenes se registraron con una cámara Sony alpha 55 **A)** Inmunohistoquímica de animales no inoculados con amibas y tratados con etanol y **B)** Inmunohistoquímica de animales inoculados con amibas y tratados con etanol **C)** y **D)** Inmunohistoquímica de animales inoculados con amibas y tratados con resveratrol **E)** Inmunohistoquímica de animales inoculados y tratados con metronidazol. **F)** Inmunohistoquímica de animales inoculados y tratados con etanol. La Inmunohistoquímica se llevó a cabo sin anticuerpo primario (control de isotipo). **G)** Evaluación de la carga parasitaria (trofozoítos/mm<sup>2</sup>) en cortes histológicos de los AHA. El histograma muestra el promedio de la carga parasitaria y la desviación estándar muestra la dispersión que hubo entre los tres experimentos independientes. Los asteriscos muestran el grado de significancia \* p<0.05.

PH: Parénquima hepático. VC: Vena centro lobulillar, N: Necrosis, RI: Reacción inflamatoria, VP: Vena portal, Cabeza de flecha: Trofozoítos, Flecha: Células epiteloides.



## 6.22. Identificación de blancos moleculares del resveratrol en *E. histolytica*

Se sabe que el resveratrol influye en la actividad de varias proteínas; (Pirola, 2008), sin embargo, pocos blancos moleculares han sido identificados en parásitos. La baja especificidad de unión, el tamaño pequeño y la estructura del resveratrol ha dificultado la identificación de blancos moleculares por medio de afinidad. Sin embargo, en 2009 Lomenick, y Col., desarrollaron la técnica de DARTS para la identificación de blancos moleculares, la cual ofrece la ventaja de que el fármaco no requiere modificaciones en su estructura, y es independiente del mecanismo de acción.

El corrimiento electroforético de los extractos proteicos sometidos a digestión con la enzima termolisina reveló dos bandas que fueron más intensas en los extractos interaccionados con resveratrol, comparados con el vehículo. Las bandas mostraron un peso molecular de aproximadamente de 60 y 34 kDa (**Fig. 38**). El promedio de nivel de cambio de la proteína de 60 kDa que fue protegida por la interacción con el resveratrol fue de 1.11, mientras que, para la proteína de 34 kDa fue de 1.92 (**Tabla 6**). Por otro lado, se buscaron proteínas de *E. histolytica* homólogas a proteínas reportadas que interaccionan con el resveratrol, como posibles blancos terapéuticos y se les realizó un análisis *in silico* (acoplamiento molecular) para obtener: las regiones de interacción, la distancia de interacción y las energías de unión.

La  $\alpha$ -tubulina es una de las proteínas que ha demostrado que interacciona con derivados del resveratrol tanto en *L. infantum* como en células Caco-2. Dicha interacción inhibe la polimerización de la tubulina y arresta el ciclo celular en la mitosis (Tolomeo, y Col., 2013. Schneider, y Col., 2003), lo cual puede llevar a la apoptosis, por un mecanismo aún desconocido (Fan, 1999).

Los resultados del acoplamiento molecular del resveratrol con la  $\alpha$ -tubulina de *E. histolytica* se muestran en las **Fig. 39 y 40**.

También se ha reportado que la miosina-II interacciona con el resveratrol, dicha interacción esta reportada en el cristal 3MNQ de la miosina-II de *Dictyostelium discoideum*. (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=3MNQ>). *E.*

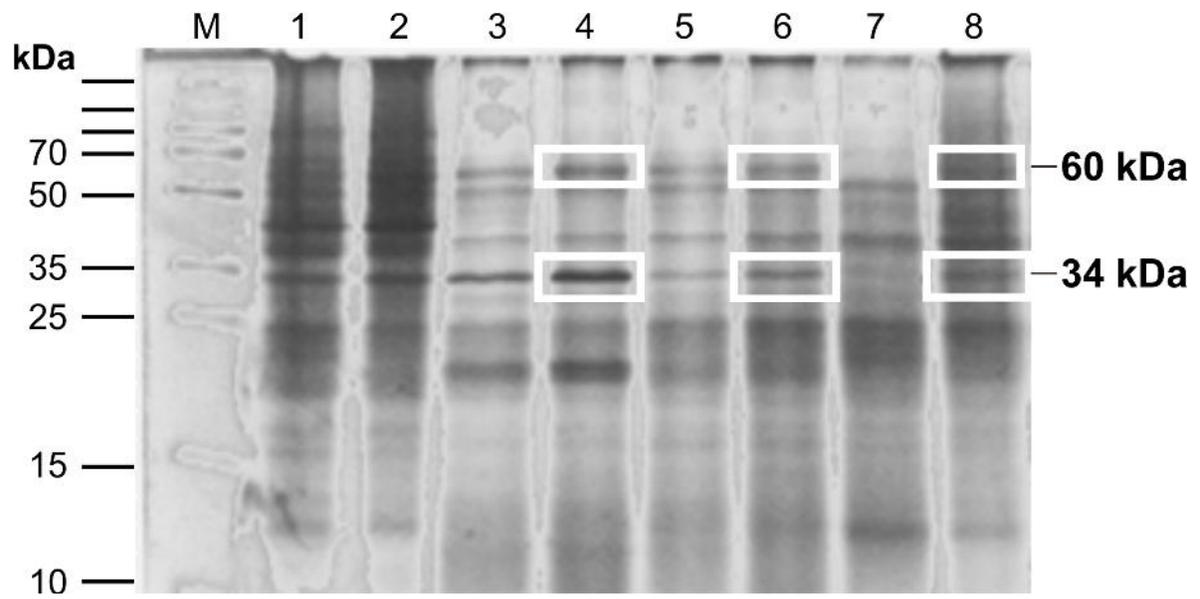
*histolytica* posee miosinas como: la miosina IB y la miosina II, las cuales participan en la movilidad, virulencia y en la división celular (Voigt, y Col., 1999; Arhets, y Col., 1998). Por lo que, dichas proteínas podrían ser blancos para combatir la amebiasis. Los resultados del acoplamiento molecular del resveratrol con la miosina IB de *E. histolytica* se muestran en las **Fig. 41 y 42**.

Por su parte, Zolfaghari, y Col., (2014) publicaron que la anhidrasa carbónica-beta es un posible blanco para el tratamiento de diferentes parásitos incluyendo a *E. histolytica*. Por lo que en ese sentido, se sabe que el resveratrol es un inhibidor de la anhidrasa carbónica (Şentürk, y Col., 2011), por tal motivo en este trabajo también se realizó acoplamiento molecular de la anhidrasa carbónica de *E. histolytica* con el resveratrol (**Fig. 43 y 44**).

De igual forma, proteínas que poseen el dominio RGD (Arg-Gly-Asp) como es el caso de la integrina  $\alpha V\beta 3$  también se han identificado como blancos del resveratrol, donde la unión del resveratrol a esta integrina es esencial para desencadenar señales de transducción que dirigen a las células de cáncer a la muerte celular por un mecanismo dependiente de p53 (Lin, y Col., 2006). Por tal motivo se realizó el acoplamiento molecular entre las proteasas de cisteína que tienen el dominio RGD (EhCP112 y EhCP5) con el resveratrol (**Fig. 45-48**).

**Figura 38. Identificación de blancos moleculares del resveratrol en *E. histolytica* mediante la técnica de DARTS.** Extractos proteicos de trofozoítos de *E. histolytica* se sometieron a interacción con el resveratrol y el vehículo (DMSO), posteriormente se digirieron con la enzima termolisina y se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie.

**M:** Marcadores de peso molecular PageRuler Plus Prestained (Fermentas). **1)** Extractos proteicos de trofozoítos interaccionados con DMSO **2)** Extractos proteicos de trofozoítos interaccionados con resveratrol **3)** Extractos proteicos de trofozoítos interaccionados con DMSO y digeridos con 50 ng de termolisina **4)** Extractos proteicos de trofozoítos interaccionados con resveratrol y digeridos con 50 ng de termolisina **5)** Extractos proteicos de trofozoítos interaccionados con DMSO y digeridos con 10 ng de termolisina **6)** Extractos proteicos de trofozoítos interaccionados con resveratrol y digeridos con 10 ng de termolisina **7)** Extractos proteicos de trofozoítos interaccionados con DMSO y digeridos con 2 ng de termolisina **8)** Extractos proteicos de trofozoítos interaccionados con resveratrol y digeridos con 2 ng de termolisina.

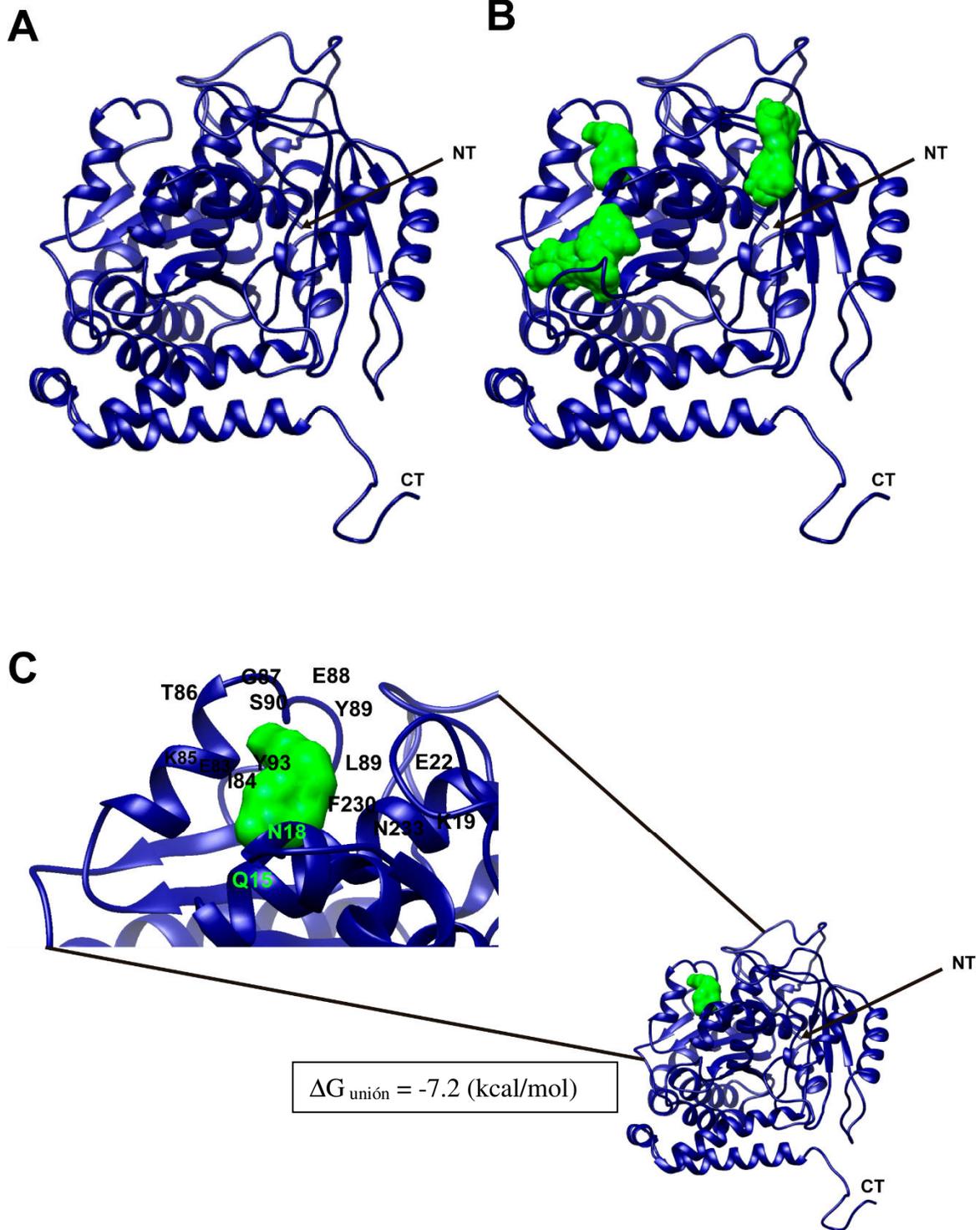


**Tabla 6. Análisis densitométrico de los niveles de cambio**

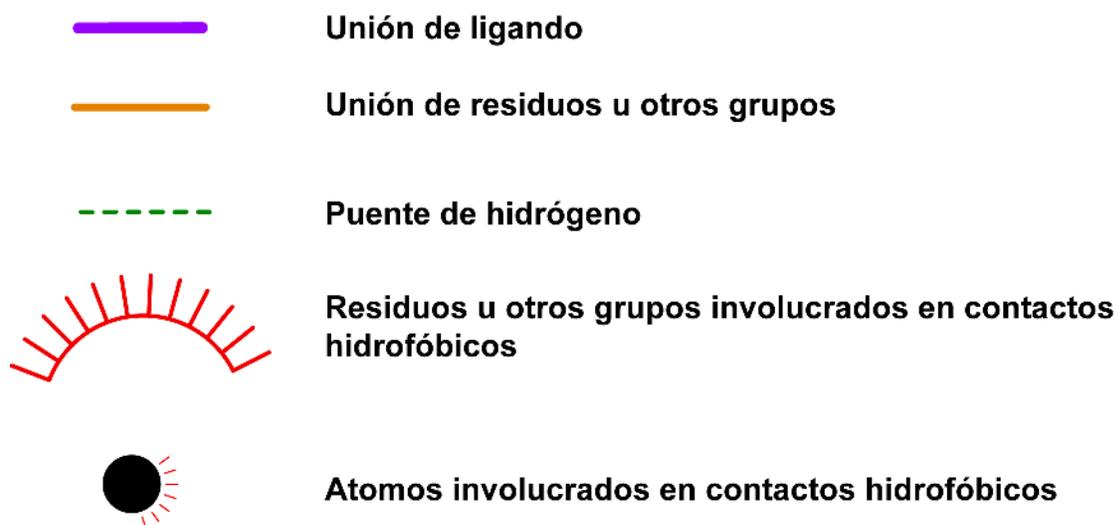
	Nivel de cambio	Promedio del nivel de cambio
(Banda 60) Carril 3 vs Carril 4	1.20	
(Banda 60) Carril 5 vs Carril 6	1.02	1.11
(Banda 60) Carril 7 vs Carril 8	No se detectó en el Carril 7	
(Banda 34) Carril 3 vs Carril 4	1.53	1.92
(Banda 34) Carril 5 vs Carril 6	1.72	
(Banda 34) Carril 7 vs Carril 8	2.5	

**Figura 39. Acoplamiento molecular del resveratrol con  $\alpha$  tubulina de *E.***

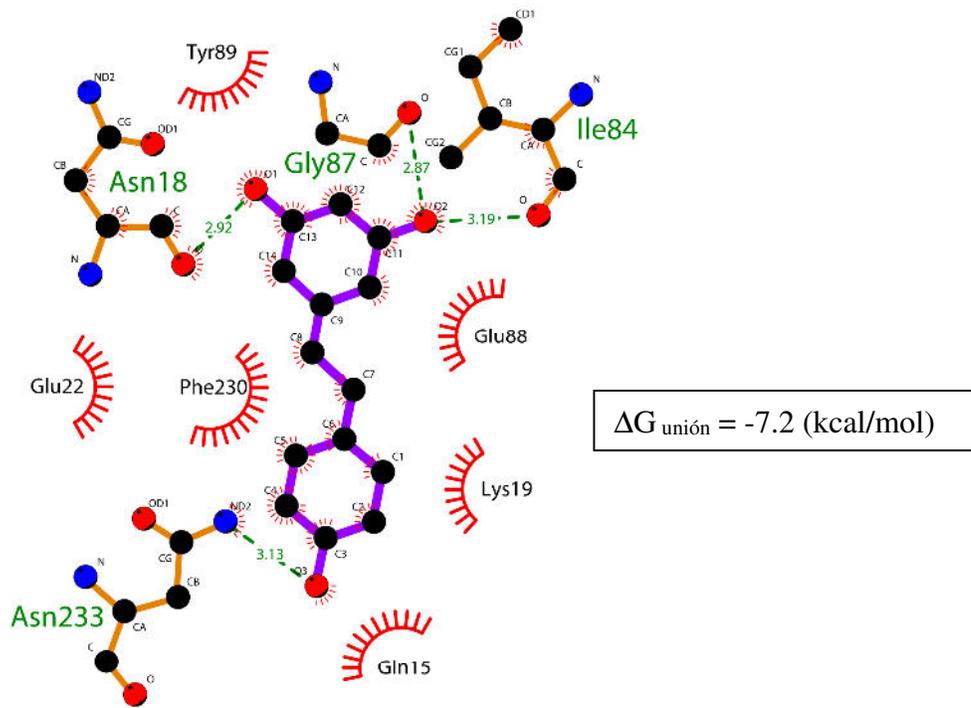
***histolytica*.** El acoplamiento molecular del resveratrol con  $\alpha$  tubulina de amiba se realizó utilizando el programa PyRX con una malla de las siguientes medidas  $x = 78.42$   $y = 66.20$   $z = 89.46$  Å. **A)** Estructura terciaria de  $\alpha$  tubulina de *E. histolytica*. **B)** Conformaciones más probables del acoplamiento molecular del resveratrol (en verde) con  $\alpha$  tubulina de *E. histolytica*. **C)** Amplificación de la conformación más probable, donde se observan los aminoácidos involucrados en la interacción.  $\Delta G =$  Energía de unión, NT: Amino terminal, CT: Carboxilo terminal.



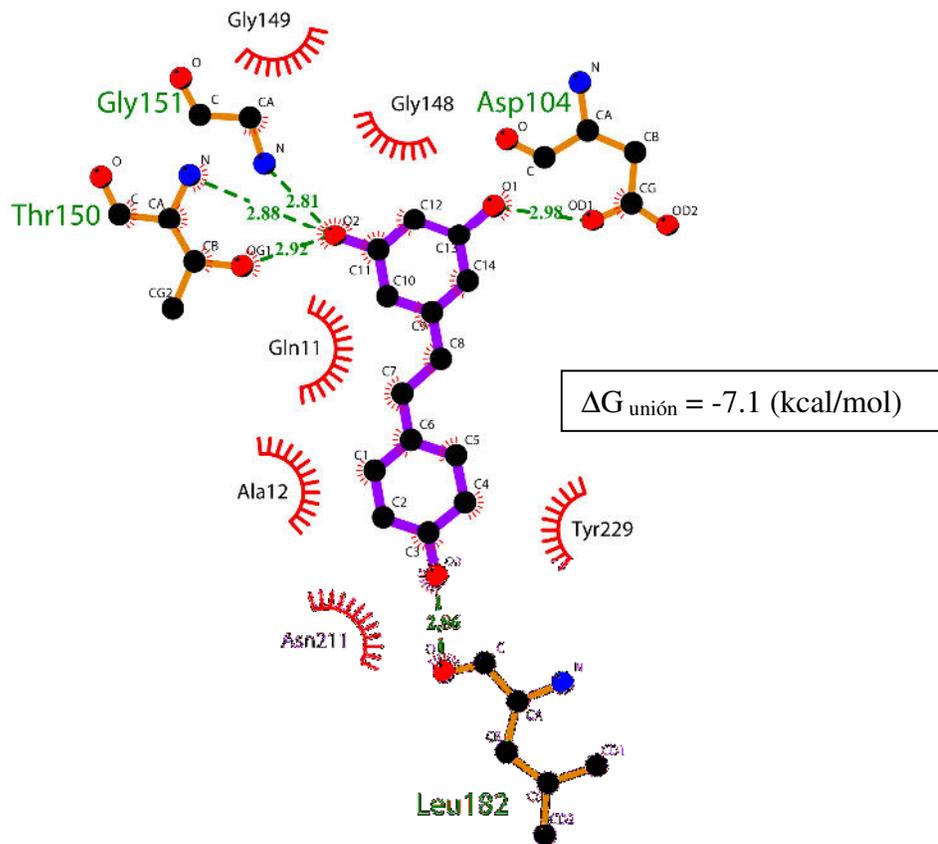
**Figura 40. Representación bidimensional de las interacciones del resveratrol con  $\alpha$  tubulina de *E. histolytica*. A) 1ª conformación probable del acoplamiento molecular del resveratrol con tubulina  $\alpha$  de *E. histolytica*. A) 2ª conformación probable del acoplamiento molecular del resveratrol con tubulina  $\alpha$  de *E. histolytica*.  $\Delta G$ = Energía de unión.**



A

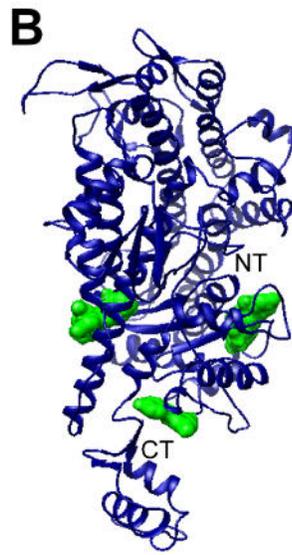
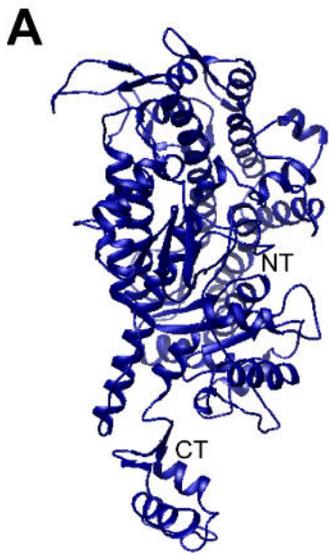


B

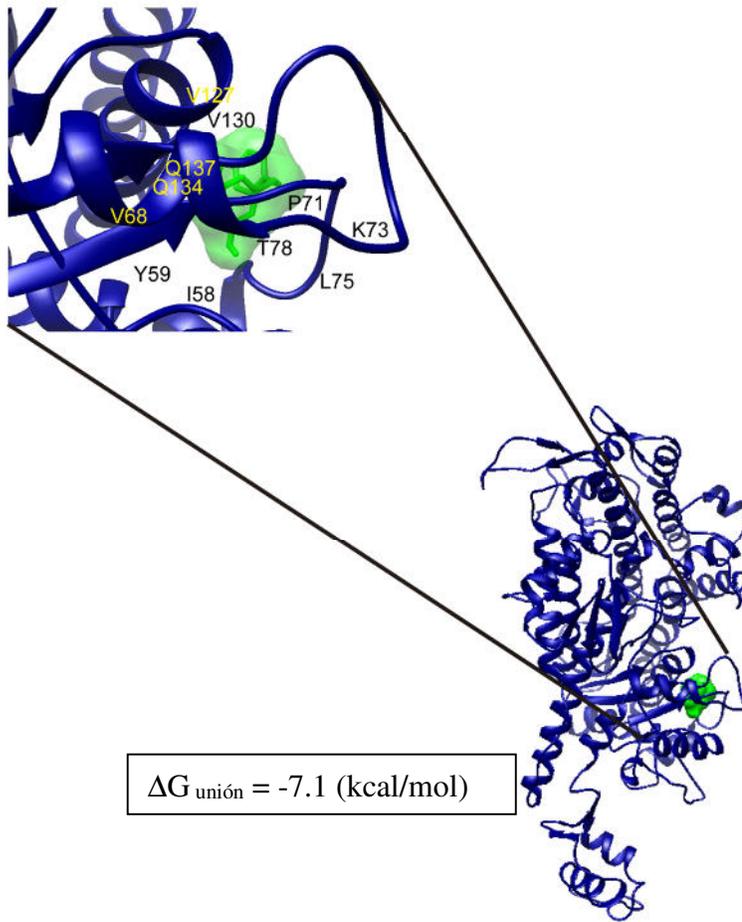


**Figura 41. Acoplamiento molecular del resveratrol con miosina IB de *E.***

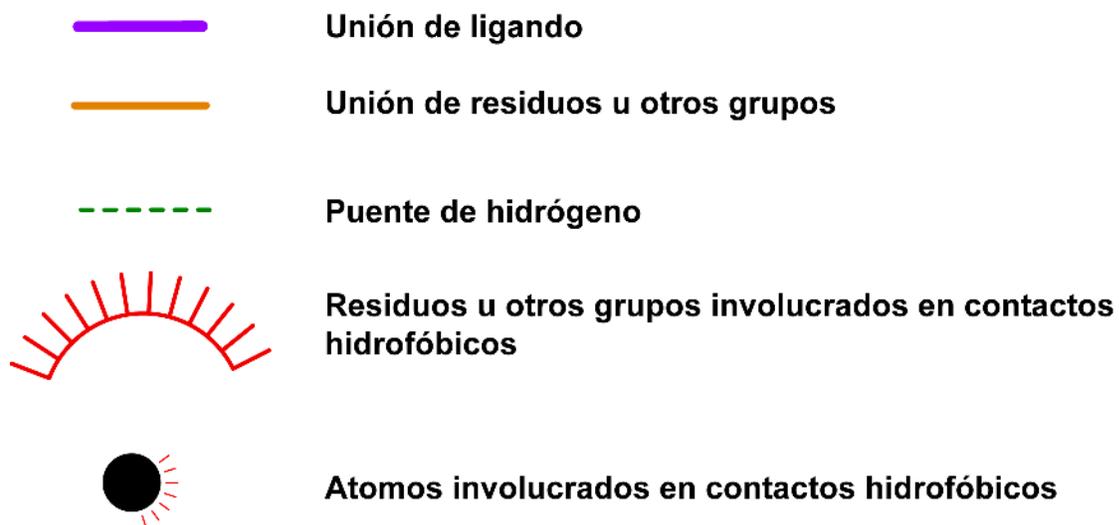
***histolytica*.** El acoplamiento molecular del resveratrol con miosina IB de amiba se realizó utilizando el programa PyRX con una malla de las siguientes medidas  $x = 101.44$   $y = 64.94$   $z = 103.67$  Å **A)** Estructura terciaria de miosina IB de *E. histolytica*. **B)** Conformaciones más probables del acoplamiento molecular del resveratrol con miosina IB de *E. histolytica*. **C)** Amplificación de la conformación más probable, donde se observan los aminoácidos involucrados en la interacción.  $\Delta G$ = Energía de unión, NT: Amino terminal, CT: Carboxilo terminal.

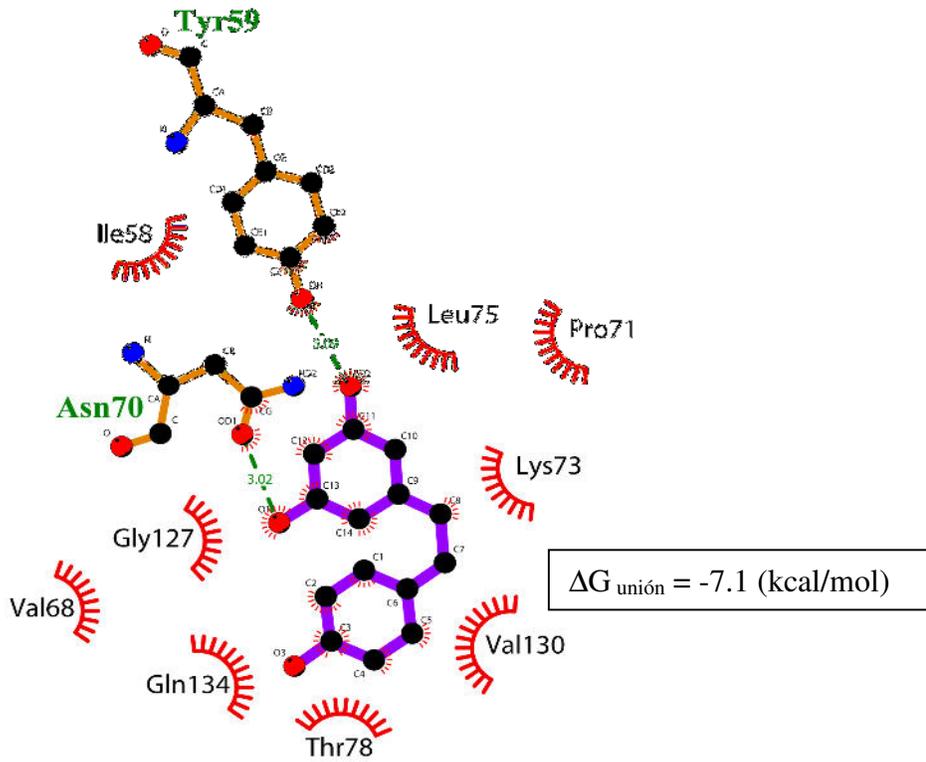
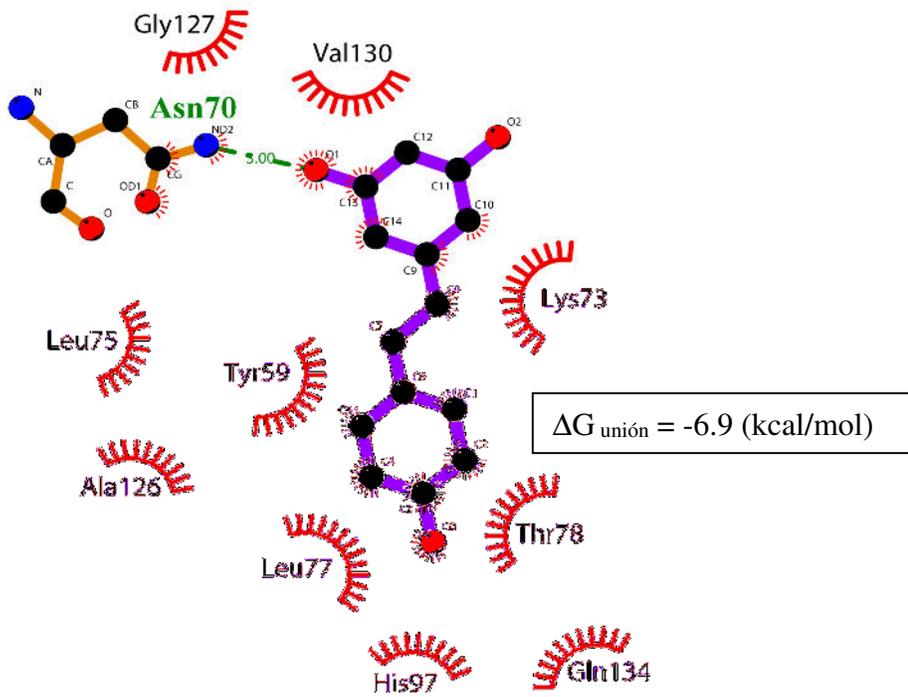


**C**

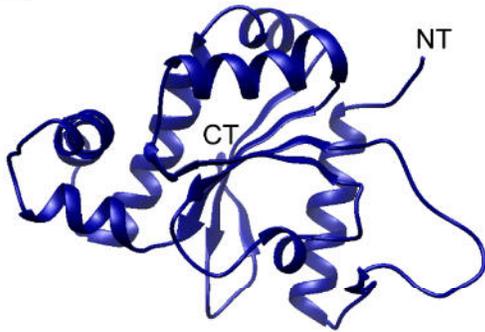
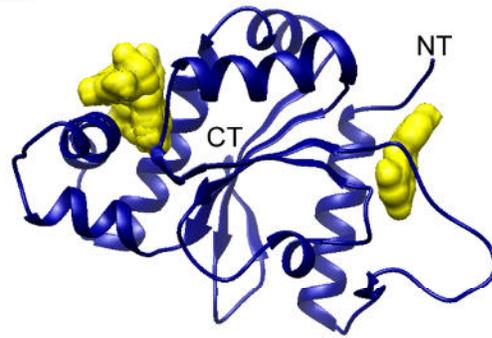
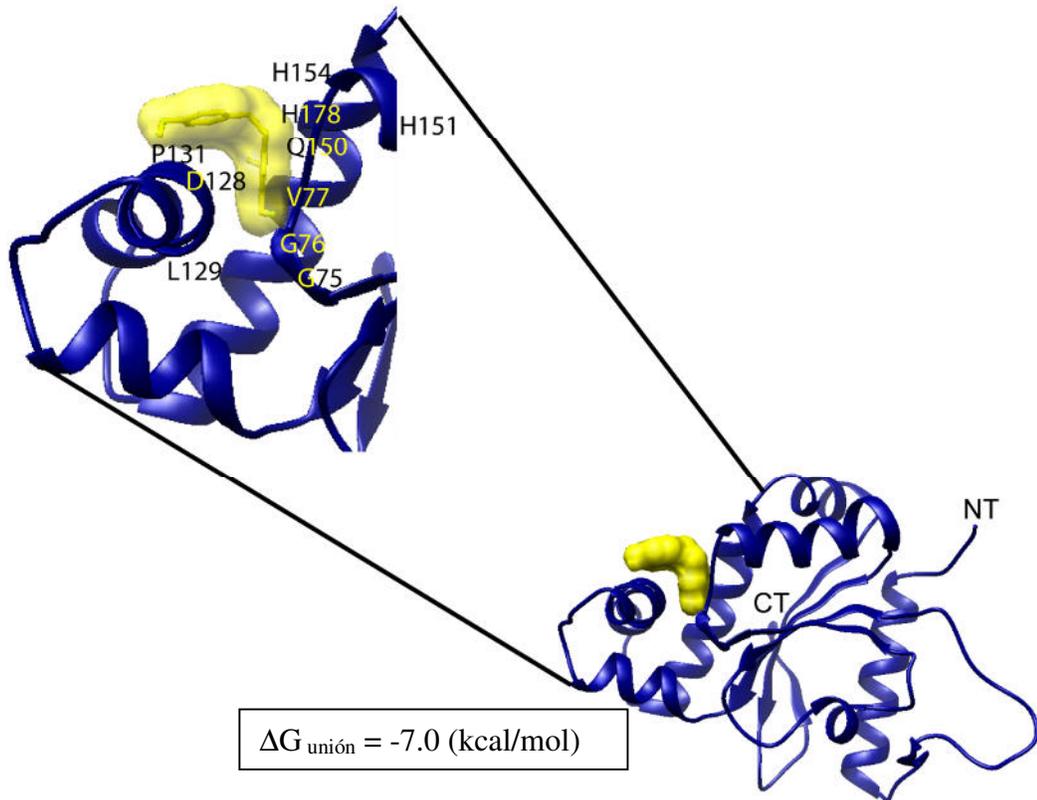


**Figura 42. Representación bidimensional de las interacciones del resveratrol con miosina IB de *E. histolytica*. A) 1ª conformación probable del acoplamiento molecular del resveratrol con miosina IB de *E. histolytica*. A) 2ª conformación probable del acoplamiento molecular del resveratrol con miosina IB de *E. histolytica*.  $\Delta G$ = Energía de unión.**

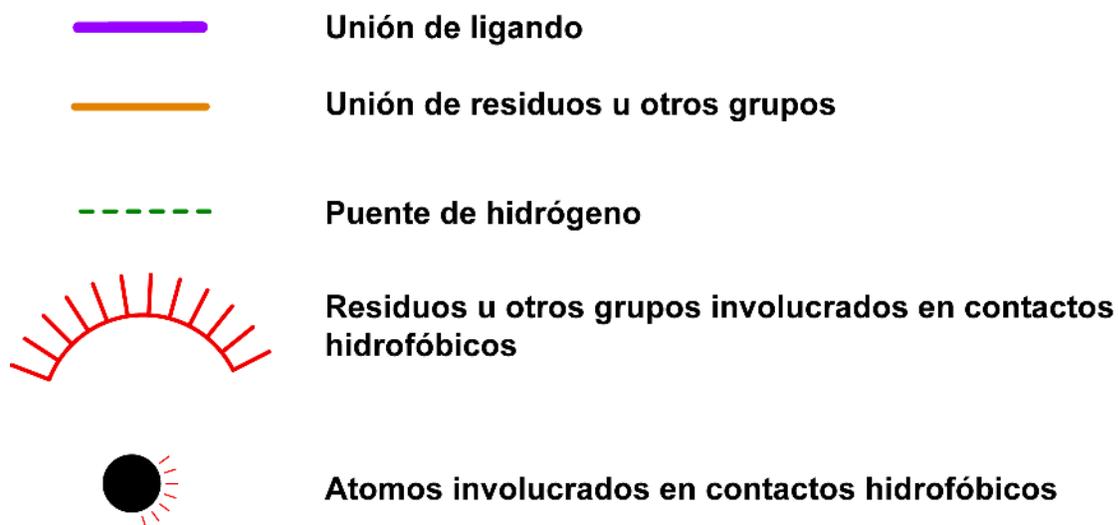


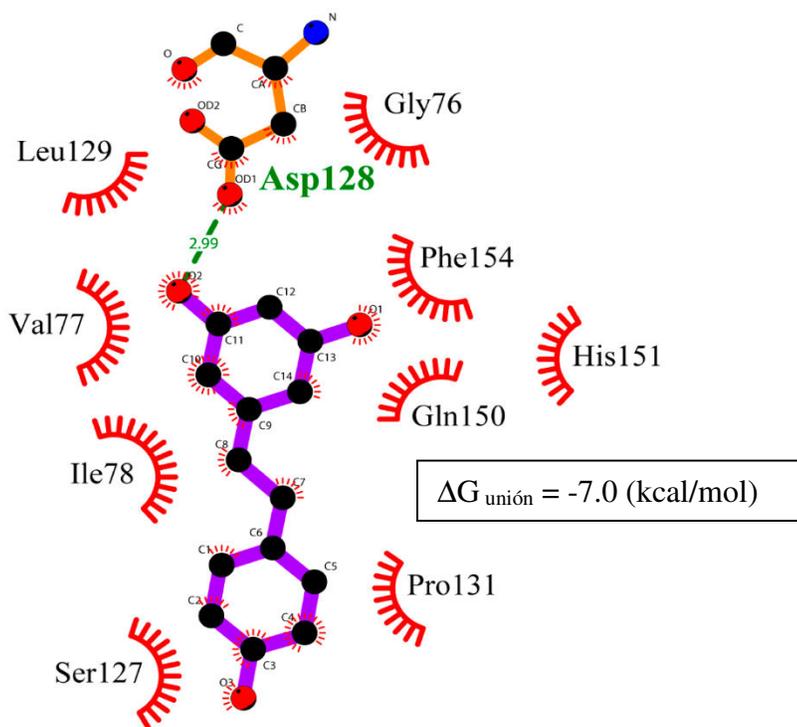
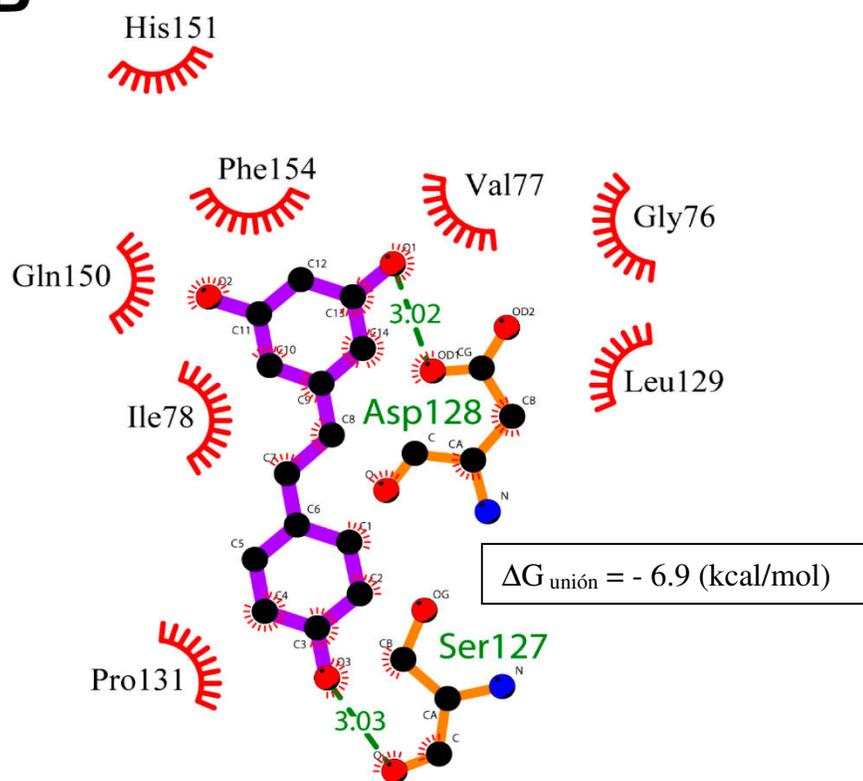
**A****B**

**Figura 43. Acoplamiento molecular del resveratrol con la anhidrasa carbónica de *E. histolytica*.** El acoplamiento molecular del resveratrol con la anhidrasa carbónica de amiba se realizó utilizando el programa PyRX con una malla de las siguientes medidas  $x = 62.69$   $y = 65.93$   $z = 79.00$  Å. **A)** Estructura terciaria de anhidrasa carbónica de *E. histolytica*. **B)** Conformaciones más probables del acoplamiento molecular del resveratrol (en amarillo) con anhidrasa carbónica de *E. histolytica*. **C)** Amplificación de la conformación más probable. Donde se observan los aminoácidos involucrados en la interacción.  $\Delta G$ = Energía de unión, NT: Amino terminal, CT: Carboxilo terminal.

**A****B****C**

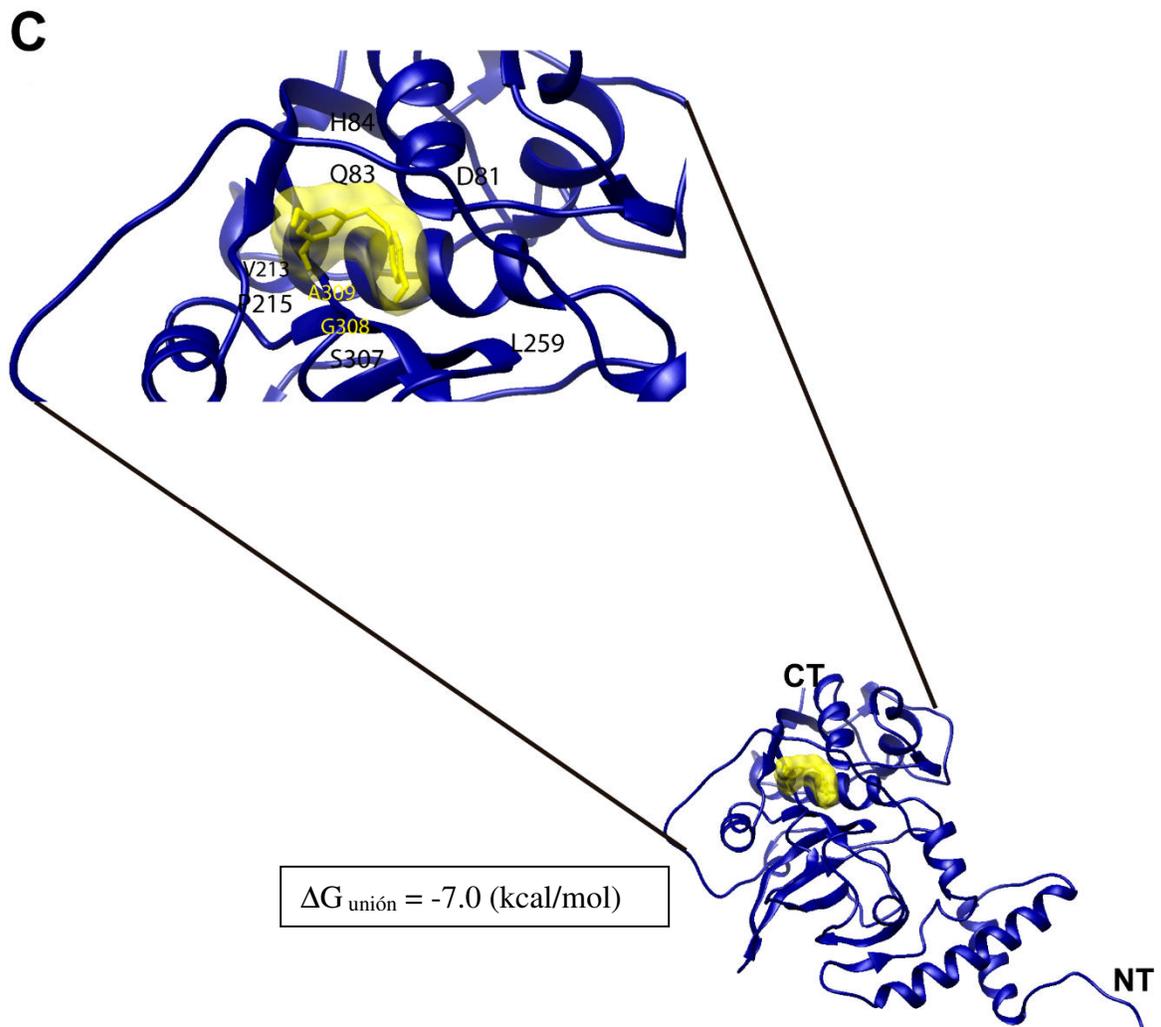
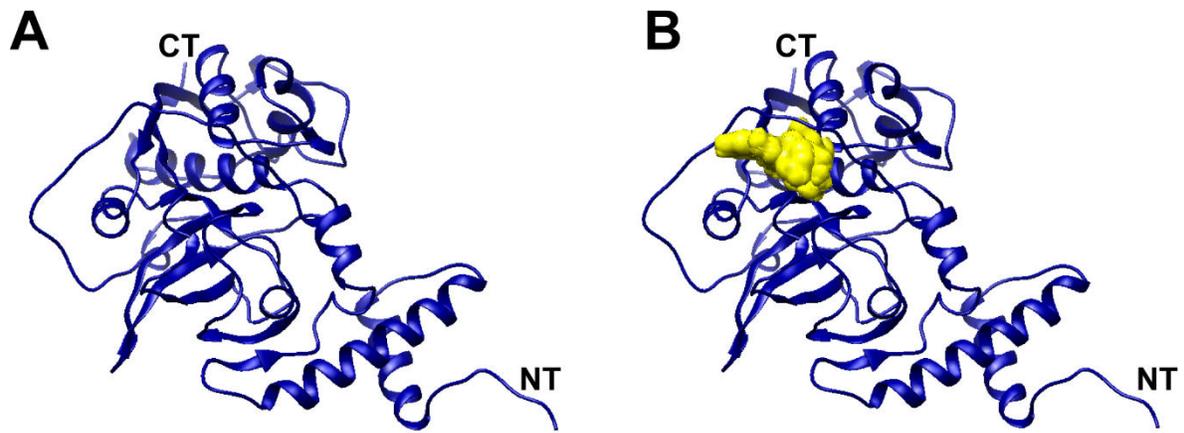
**Figura 44. Representación bidimensional de las interacciones del resveratrol con anhidrasa carbónica de *E. histolytica*. A) 1ª conformación probable del acoplamiento molecular del resveratrol con anhidrasa carbónica de *E. histolytica*. A) 2ª conformación probable del acoplamiento molecular del resveratrol con anhidrasa carbónica de *E. histolytica*. Donde se observan los aminoácidos involucrados en la interacción.  $\Delta G$ = Energía de unión.**



**A****B**

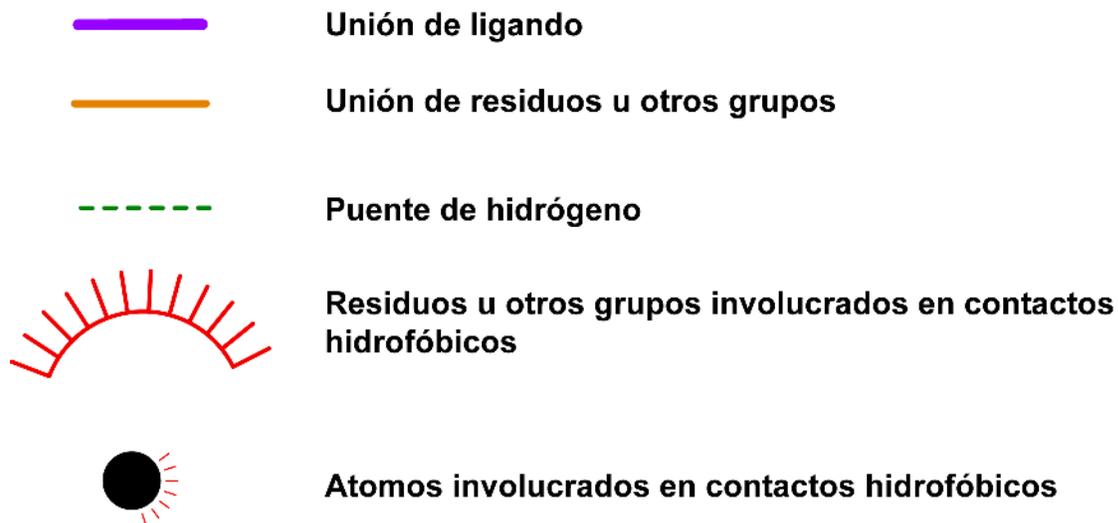
**Figura 45. Acoplamiento molecular del resveratrol con la EhCP5 de *E.***

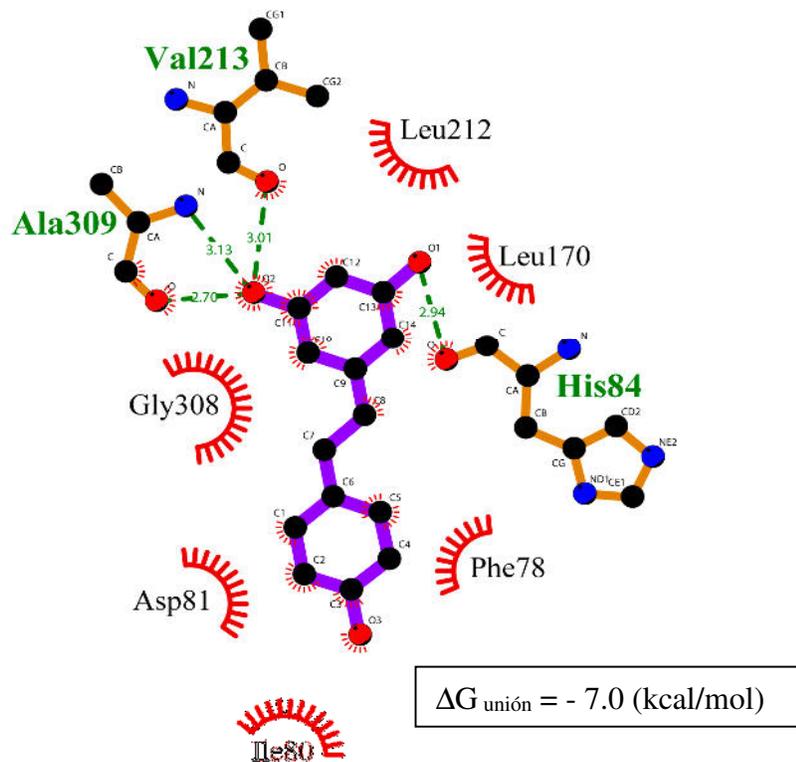
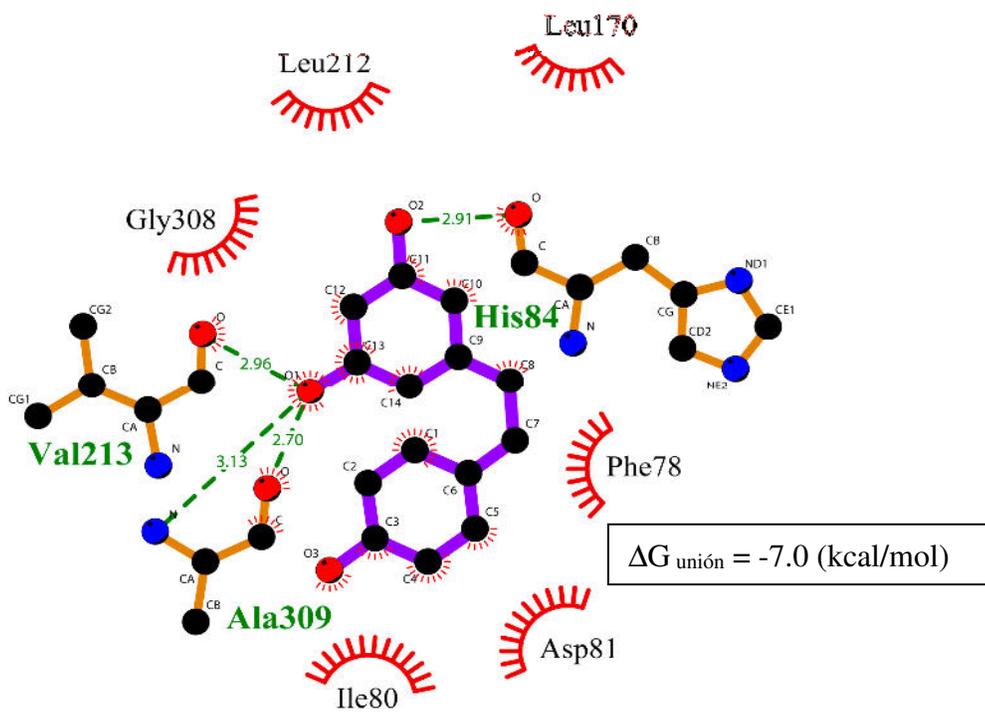
***histolytica***. El acoplamiento molecular del resveratrol con EhCP5 de amiba se realizó utilizando el programa PyRX con una malla de las siguientes medidas  $x = 78.42$   $y = 66.20$   $z = 89.46$  Å. **A)** Estructura terciaria de EhCP5 de *E. histolytica*. **B)** Conformaciones más probables del acoplamiento molecular del resveratrol (en amarillo) con la EhCP5 de *E. histolytica*. **C)** Amplificación de la conformación más probable. Donde se observan los aminoácidos involucrados en la interacción.  $\Delta G$ = Energía de unión, NT: Amino terminal, CT: Carboxilo terminal.



**Figura 46. Representación bidimensional de las interacciones del resveratrol con EhCP5 de *E. histolytica*. A) 1ª conformación probable del acoplamiento molecular del resveratrol con EhCP5 de *E. histolytica*. A) 2ª conformación probable del acoplamiento molecular del resveratrol con EhCP5 de *E. histolytica*.**

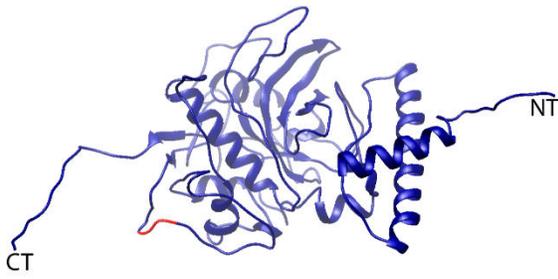
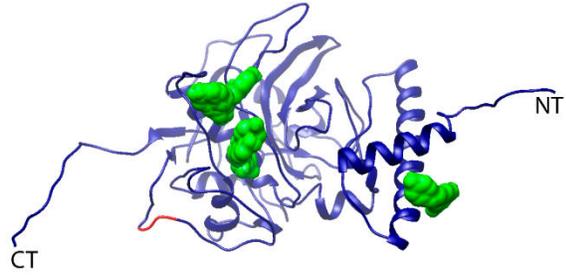
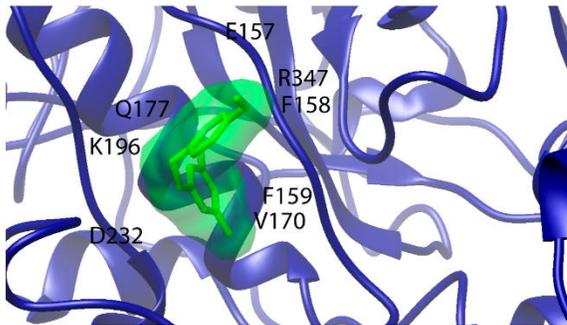
$\Delta G$ = Energía de unión.



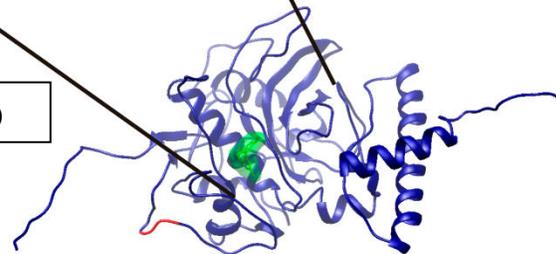
**A****B**

**Figura 47. Acoplamiento molecular del resveratrol con EhCP112 de *E.***

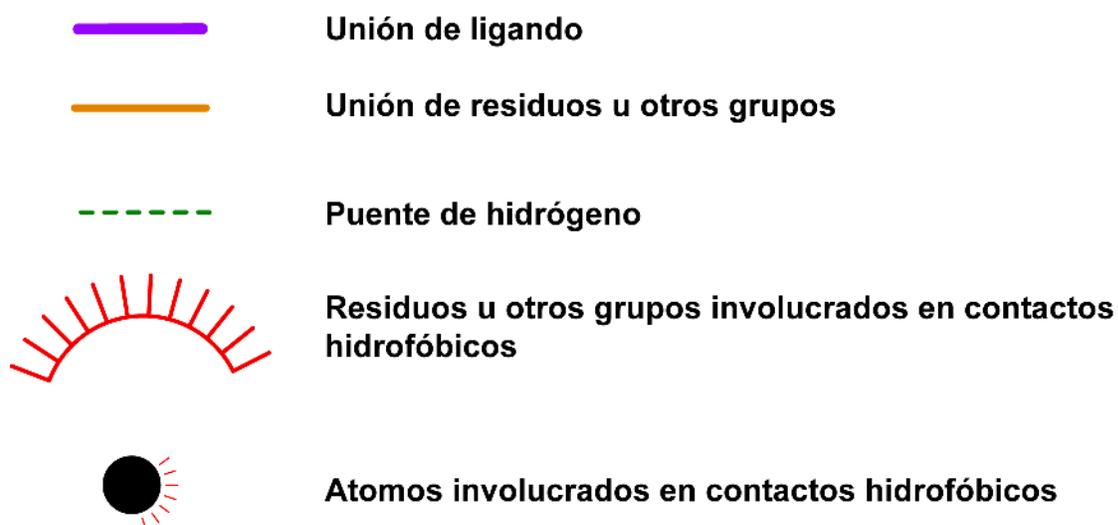
***histolytica***. El acoplamiento molecular del resveratrol con EhCP112 de amiba se realizó utilizando el programa PyRX con una malla de las siguientes medidas  $x = 102.97$   $y = 59.58$   $z = 84.97$  Å. **A)** Estructura terciaria de EhCP112 de *E. histolytica*. **B)** Conformaciones más probables del acoplamiento molecular del resveratrol (en verde) con EhCP112 de *E. histolytica*. **C)** Amplificación de la conformación más probable. Donde se observan los aminoácidos involucrados en la interacción.  $\Delta G =$  Energía de unión, NT: Amino terminal, CT: Carboxilo terminal.

**A****B****C**

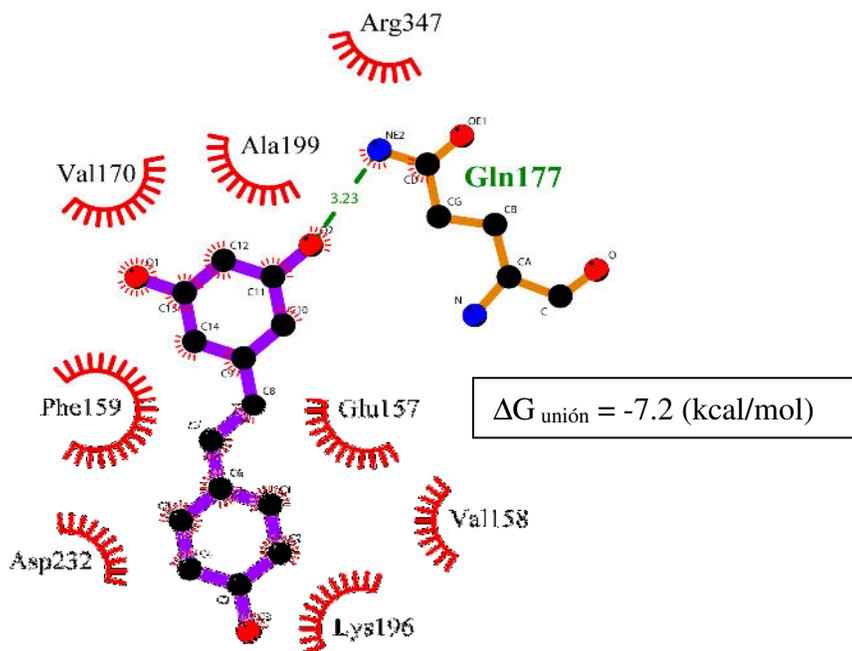
$$\Delta G_{\text{unión}} = -7.2 \text{ (kcal/mol)}$$



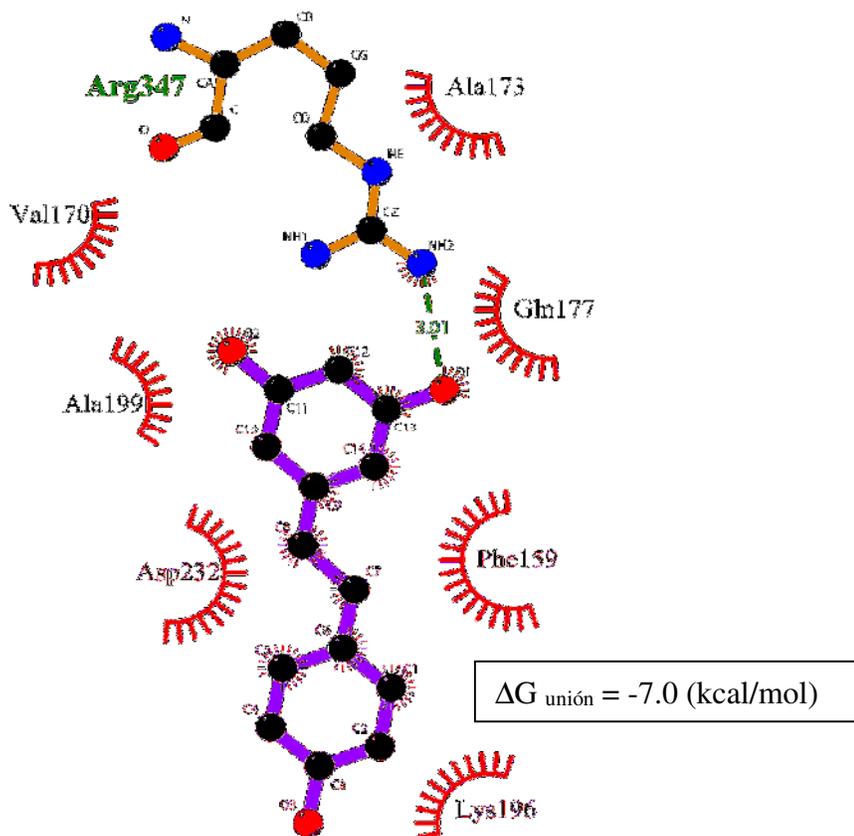
**Figura 48. Representación bidimensional de las interacciones del resveratrol con EhCP112 de *E. histolytica*. A) 1ª conformación probable del acoplamiento molecular del resveratrol con EhCP112 de *E. histolytica*. A) 2ª conformación probable del acoplamiento molecular del resveratrol con EhCP112 de *E. histolytica*.  $\Delta G$ = Energía de unión.**



A



B



## 7. Discusión.

Se sabe que el resveratrol puede inducir muerte celular tanto por apoptosis como por autofagia dependiendo de la línea celular o el parásito (Calamini, y Col., 2010; Tolomeo, y Col., 2013; Morais, y Col., 2009). Con el objetivo de investigar el tipo de muerte celular que inducía el resveratrol en *E. histolytica* en este trabajo se realizaron estudios morfológicos y bioquímicos.

Nuestros resultados revelaron que las amibas expuestas con una IC<sub>50</sub> del resveratrol durante 12 h perdieron su pleomorfismo celular y adquirieron una forma redondeada, además, el tamaño celular disminuyó y estos efectos se acentuaron con el tiempo de exposición. La disminución en el tamaño celular es un cambio morfológico que se observa durante los procesos de muerte celular por apoptosis y autofagia (Ziegler, y Groscurth, 2004; Morais, y Col., 2009).

Mediante ensayos de citometría de flujo también evidenciamos la disminución del tamaño celular, además del incremento de la granularidad celular, lo que sugirió un aumento en los depósitos de glucógeno, el incremento de lisosomas, la presencia de autofagosomas e incluso la condensación de la cromatina. Además, el tratamiento con resveratrol indujo cambios ultra-estructurales en la amibas: el citoplasma se observó más electrodensó y con mayor granularidad celular probablemente por el incremento de gránulos de glucógeno; el núcleo mostró una cromatina distribuida en todo el núcleo con una apariencia difusa y condensada, por su parte las vacuolas presentaron en su interior un contenido membranoso semejante al de los autofagosomas. Los cambios morfológicos y ultraestructurales en los trofozoítos tratados con resveratrol son similares a los observados cuando se induce la muerte celular por apoptosis con G418 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Villalba, y Col., 2007b;

Nandi, y Col., 2010). Sin embargo, la presencia del contenido membranal en las vacuolas es muy similar a lo que se observa en los autofagosomas (Barth, y Col., 2010). Los cambios en el tamaño celular, morfología y ultraestructura sugirieron que las amibas estaban bajo un estrés, por lo que en esta tesis se investigó si el resveratrol inducía un estrés oxidativo como lo reportado para el parásito protozoario *P. dicentrarchi* (Lamas, y Col., 2009). El incremento de trofozoítos positivos a ERO y de lípidos peroxidados confirmaron que efectivamente el resveratrol inducía un estrés oxidativo. La inducción del estrés oxidativo por acción del resveratrol se ha observado en células de cáncer y en parásitos cuando son expuestos a dicho fitofármaco (Sun, y Col., 2008; Lamas, y Col., 2009). El mecanismo por el cual se induce el estrés oxidativo en células de cáncer cuando se trata con el resveratrol es por la inducción de la despolarización de la membrana mitocondrial, lo que causa una disfunción mitocondrial (Sun, y Col., 2008), de la misma forma este compuesto causa disfunción en el hidrogenosoma en *T. vaginalis*, lo que conlleva a la muerte de este parásito (Mallo, y Col., 2013). Sin embargo, aunque *E. histolytica* posee enzimas relacionadas a las mitocondrias este parásito no posee este organelo. Entonces, la explicación de la inducción del estrés oxidativo en *E. histolytica* podría ser similar a la propuesta para el parásito *P. dicentrarchi*, donde el resveratrol reduce significativamente el sistema de defensa contra las ERO, disminuyendo la actividad enzimática de: peroxidasa, catalasa y SOD (Lamas, y Col., 2009).

El desbalance del estado normal redox causado por el estrés oxidativo incrementa la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN causando la muerte

celular ya sea por autofagia o apoptosis (Kaminsky y Col., 2014). La autofagia, es un proceso de auto-digestión que degrada estructuras intracelulares en respuesta a varios estímulos tales como el estrés oxidativo, este proceso está implicada tanto en la supervivencia y la muerte celular (Azad et al. 2008); y la apoptosis ocurre normalmente durante varios procesos celulares, como; en el desarrollo, envejecimiento y en la homeostasis para el mantenimiento de la población celular en tejidos. Así mismo, ocurre como un mecanismo de defensa cuando las células están dañadas por agentes infecciosos (Elmore, 2007, Dockrell, 2001).

Los resultados hasta el momento, no confirmaban que tipo de muerte celular inducía el resveratrol, por lo que, en esta tesis se realizó un análisis *in silico* para saber si se podría llevar a cabo este proceso en *E. histolytica*. Hasta la fecha no se ha podido inducir la formación la autofagia en este parásito, ni con privación de nutrientes (glucosa y suero), ni por estrés térmico y oxidativo (Picazarri, y Col., 2008b). Así mismo, no se ha reportado la maquinaria completa para que se lleva a cabo este proceso, solo se ha reportado la presencia de proteínas implicadas en el sistema de conjugación Atg8 (Picazarri y Col. 2008a). Sin embargo, no se ha reportado la presencia de proteínas relacionadas con el sistema de conjugación Atg12, el cual es esencial para la formación de los autofagosomas. Por lo cual, en este trabajo se realizó la búsqueda *in silico* sobre sobre los sistemas de conjugación Atg8 y Atg12, En el caso del sistema de conjugación Atg8, se encontró la presencia de la proteína EhAtg4e, y para el sistema de conjugación Atg12 se encontraron las siguientes proteínas: EhAtg5, EhAtg10, EhAtg16 y EhAtg12; lo cual indica la factibilidad de que el proceso de autofagia se lleve a cabo en *E. histolytica*. Sin embargo, cuando se trataron los trofozoítos de *E. histolytica* con el resveratrol no se detectó la proteína

conjugada EhAtg8-PE en los ensayos de Western blot, además, por microscopia confocal no se observó la relocalización de la proteína EhAtg8a en estructuras de tipo vesicular o autofagosomas. Cabe destacar que los anticuerpos que se generaron contra la *EhAtg8a* reconocieron a la proteína *EiAtg8* conjugada con PE, ya que dichas proteínas tienen una similitud de 95%, así mismo, por microscopia confocal se observaron los autofagosomas cuando se indujo el enquistamiento en *E. invadens*. Con esto se descartó la posibilidad de que los anticuerpos no reconocieran la conjugación de la proteína EhAtg8 con PE. Estos resultados sugieren que el resveratrol no induce autofagia en trofozoítos de *E. histolytica*, similar a lo observado cuando se ponen bajo estrés de nutrientes, oxidativo o térmico (Picazarri, y Col., 2008b).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, los cambios ultraestructurales y el estrés oxidativo también sugerían la inducción de apoptosis. Estos resultados junto con las evidencias de la externalización de la PS, fragmentación del DNA, incremento de la concentración del calcio citosólico, incremento en la actividad de calpaina y la disminución de la actividad de la SOD, se puede concluir que efectivamente, el resveratrol induce apoptosis. El hecho de encontrar amibas que externalizan PS y presentan fragmentación del DNA, son consistentes con los eventos de apoptosis de las células de mamíferos (Martin, 1995). Durante la etapa temprana de la apoptosis la PS interrumpe su asimetría y queda expuesta en la superficie celular debido a la desregulación de enzimas como escramblasas, translocasas y flipasas, encargadas de la homeóstasis de la PS en la membrana plasmática (Marckus, 2011). La externalización de la PS se observa solo cuando se induce la muerte celular en *E. histolytica* con un estrés oxidativo ( $H_2O_2$ ) como lo

en los reportado en trabajos previos (Ghosh, y Col., 2010; Nandi, y Col., 2010), pero no se externaliza cuando se induce la muerte celular con un estrés nitrosativo por G418 (Villalba, y Col., 2007b). Lo cual, nos indica nuevamente que los trofozoítos tratados con resveratrol sufren un estrés oxidativo.

Por su parte, se sabe que la fragmentación del DNA se lleva a cabo por la activación de una cascada de proteínas apoptóticas como caspasas, AIF (del inglés Apoptosis-inducing factor) y endonucleasa G; sin embargo, varios estudios han demostrado la ausencia de proteínas homólogas relacionadas a la apoptosis, en muchos eucariontes unicelulares incluyendo a *E. histolytica* (Deponte, y Col., 2008; Ghosh, y Col., 2010). Sin embargo, se ha reportado una proteasa de cisteína dependiente de  $Ca^{2+}$  la calpaina, que se relaciona con la apoptosis en *E. histolytica* (Nandi, y Col., 2010; Ghosh, y Col., 2010). En los resultados observados cuando se tratan los trofozoítos de *E. histolytica* con resveratrol se incrementa el calcio citosólico aproximadamente cinco veces. En trabajos previos se ha reportado que el incremento del calcio citosólico durante la apoptosis es aproximadamente dos veces, dicha diferencia podría estar dada a la sonda que se utilizó para cuantificar el calcio, en este trabajo se utilizó Fluo4-AM, mientras en los otros trabajos se utilizó Fura2-AM (Villalba, y Col., 2007b; Nandi, y Col., 2010; Ghosh, y Col., 2010). Se empleó Fluo4-AM debido a que Fura2-AM da resultados erróneos cuando se utiliza el resveratrol ya que éste interfiere con la longitud de excitación a 380 nm (Paudel, y Col., 2014). El incremento del calcio intracelular se ha observado en células expuestas a un estrés oxidativo, que finalmente conduce a la apoptosis (Jiang, y Col., 1994). El aumento del calcio intracelular durante la apoptosis puede darse por el influjo a través de la membrana plasmática o por la

liberación de los reservorios intracelulares, dicho incremento es necesario para la activación de enzimas que participan en la muerte celular incluyendo las calpaínas (Tagliarino, y Col., 2001). La actividad de las calpains en nuestros resultados se observó que se incrementa dos veces cuando se tratan los trofozoítos con resveratrol, dicho aumento es similar a lo reportado por Nandi y Col., (2010) que es de tres veces. El incremento de la actividad de las calpaina fue suficiente para iniciar la fragmentación del DNA, durante la muerte celular en trofozoítos tratados con resveratrol. Adicionalmente, se observó que la actividad de SOD disminuye alrededor de dos veces, cuando los trofozoítos se tratan con el resveratrol. Este resultado es similar a lo observado al trabajo previo cuando los trozoítos de *E. histolytica* son sometidos a un estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> donde la actividad disminuye alrededor de 2.7 veces (Nandi, y Col., 2010). Se sabe que cuando se producen grandes cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la célula inhibe la actividad de la SOD por la oxidación de residuos de aminoácidos cercanos al sitio catalítico (Gottfredsen, y Col., 2013). Nuestro resultados sugieren que cuando los trofozoítos son expuestos al resveratrol de forma prolongada se genera un estrés oxidativo donde la capacidad de destoxificación es ineficiente y las ERO son extremadamente tóxicas para el parásito lo que conlleva a la disminución de su viabilidad celular. Los resultados mencionados anteriormente concuerdan con los resultados obtenidos en los trabajos previos, donde se induce apoptosis en *E. histolytica* con G418 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Villalba, y Col., 2007b; Nandi y Col., 2010; Ghosh y Col., 2010).

Por otro lado, al evaluar el efecto del resveratrol sobre la virulencia de *E. histolytica* se observó una menor eficiencia para destruir las monocapas de células MDCK,

cada vez que estas sólo produjeron un 39.21, 11.01 y 4.91% de destrucción para concentraciones de 72, 109 y 219  $\mu\text{M}$  de resveratrol respectivamente en comparación a las amibas tratadas con etanol al 0.4% las cuales presentaron un 63.93% de destrucción de la monocapa celular, así mismo, se observó que la tasa de eritrofagocitosis disminuyó alrededor de un 50% alcanzando la saturación en un tiempo menor. Quizá la virulencia se vea aminorada en primera instancia por disminuir la adhesión como ocurre con *A. castellanii* (Aqeel y Col., 2012). El resveratrol tiene la capacidad de afectar la virulencia en *A. castellanii* debido a la disminución de la adhesión y del efecto citotóxico sobre cultivos primarios de células endoteliales de la microvasculatura de cerebro humano (Aqeel y Col., 2012).

Así mismo, la capacidad de los trofozoítos tratados con resveratrol para inducir la formación de AHA en hámsteres se vio abatida ya que ninguno de los 8 animales que fueron infectados con los trofozoítos tratados con resveratrol presentó daño hepático. Esto podría explicarse con los resultados de la virulencia *in vitro*, ya que estos trofozoítos tendrían disminuida la capacidad citopática, fagocítica y quizá también la de adhesión. Asimismo, si el mecanismo más probable para inducir el estrés oxidativo es por la disminución de la actividad de las enzimas encargadas de la defensa contra este estrés, entonces, los trofozoítos inoculados y tratados con resveratrol estarían más susceptibles a las ERO generadas por los macrófagos y neutrófilos del sistema inmune, y facilitaría la eliminación de los trofozoítos por parte del hospedero.

Durante mucho tiempo se ha sostenido que la patogenicidad del parásito se debe a su capacidad de destruir tejidos, ya que numerosos experimentos *in vitro* demostraron que *E. histolytica* produce moléculas que causan citólisis o apoptosis en células blanco, así como proteólisis de algunos componentes de la matriz

extracelular (Olivos-García, y Col., 2009). Sin embargo, contrario a esta propuesta, se ha demostrado que *E. histolytica* virulenta *per se* es incapaz de causar daño al hígado en hámsteres leucopénicos y que la inflamación, además de ser la principal responsable de la destrucción tisular, es una condición necesaria para la sobrevivencia del parásito (Olivos-García, y Col., 2004). Con la isquemia que produce la inflamación, se crea un microambiente favorable para la sobrevivencia del parásito, al reducirse el acceso de moléculas potencialmente tóxicas como son el complemento, los anticuerpos y el oxígeno, junto con sus especies reactivas tales como superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (Olivos-García, y Col., 2004).

Por otra parte, se sabe que en condiciones *in vitro* los macrófagos ejercen su actividad amebicida mediante la generación de NO y ERO, generados por la sintetasa de óxido nítrico (iNOS) y la nicotinamida adeninucleótido fosfato reducido (NADPH) oxidasa, respectivamente (Lin, y Chadee, 1992). Sin embargo, ante la pregunta de por qué esta actividad amebicida no sucede durante el desarrollo del AHA, la hipótesis resultante es que los macrófagos que están en vecindad con las amibas podrían reducir su producción de ERO por estar en condiciones hipóxicas, además de que no expresan la iNOS. El por qué, los macrófagos no expresaron iNOS probablemente se deba a la sobreproducción de IL-10 en macrófagos y linfocitos, ambos estimulados por la prostaglandina E2 (PGE2). Esta molécula, puede ser producida por el parásito (Belley, y Chadee, 2000) o de forma local por células del hospedero (Harris, y Col., 2002) y se ha demostrado que inhibe la expresión de la iNOS o por la activación de los genes regulados por la hipoxia, que tiene como consecuencia la inhibición de la

expresión de iNOS (Murdoch, y Col., 2005). Como se mencionó anteriormente, la inflamación, hipoxia y la PGE2, son factores importantes para el desarrollo del AHA, sin embargo el resveratrol tiene la capacidad de actuar contra dichos factores y es por eso que quizá, cuando inoculamos a los hámsteres con trofozoítos virulentos y los tratamos con el resveratrol observamos una disminución considerable en el daño hepático.

La administración del resveratrol previa a la inoculación de trofozoítos virulentos quizá induzca una protección contra la hipoxia e inflamación a través de la disminución de las vías de señalización como NF- $\kappa$ B, ERK (del inglés Extracellular signal-regulated kinase), JNK (del inglés c-Jun N-terminal kinase), y MAPK (Powell, y Col., 2014). Así mismo, este compuesto pudiera estar induciendo la expresión de iNOS, eNOS y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Das, y Col., 2005a). Por otro lado, se ha observado que estas vías de señalización en etapas tempranas del AHA inducen predominantemente apoptosis más que inflamación o regeneración hepática (Pelosof, y Col., 2006), por lo que al disminuir estas vías de señalización con el tratamiento con resveratrol, tal vez se prevenga la muerte celular y por ende el daño tisular del hígado; además se pudiera estar favoreciendo el proceso de regeneración hepática.

Respecto a la PGE2, se sabe que el resveratrol inhibe tanto la expresión del gen *cox2* (Subbaramaiah, y Col., 1998) así como, interacciona directamente con la proteína COX-2 (Zykova, y Col., 2008), Sin embargo, se desconoce si en *E.*

*histolytica* el resveratrol inhibe a la COX-2 de *E. histolytica*, de ser así, entonces se estaría bloqueando un factor de virulencia importante de este parasito.

Resulta interesante que la amiba se encuentre bien conservada fuera del área de necrosis, en donde hipotéticamente estaría en contacto con concentraciones tóxicas de oxígeno y NO. Esto puede deberse a un problema vascular, ya que resultados previos indican que en el AHA las células de la pared sinusoidal producen grandes cantidades de superóxido (Olivos-García, y Col., 2004). Se sabe que este radical, al neutralizar al NO genera vasoconstricción e hipertensión local, lo cual disminuye el riego sanguíneo (Gracia-Sancho, 2008), Esto podría favorecer la sobrevivencia y diseminación de la amiba al disminuir las concentraciones tóxicas de oxígeno y NO. El resveratrol podría inhibir la producción de superóxido en el espacio sinusoidal hepático durante el AHA, por lo cual podría ejercer su acción terapéutica.

El modelo de enquistamiento *in vitro* del parásito *E. invadens*, se usa ampliamente para interpretar el mecanismo de enquistamiento de *E. histolytica*, dado a la semejanza que existe entre estos dos parásitos y por la dificultad de obtener quistes de forma experimental de esta última especie.

Nuestros resultados, mostraron que el resveratrol tiene un efecto de forma dosis dependiente sobre el enquistamiento de *E. invadens*. En un trabajo previo se ha demostrado la importancia de la reorganización del citoesqueleto de actina y la actividad de pequeñas GTPasas, para la formación de vesículas que transportan quitina durante la formación de la pared de los quistes en *E. invadens* (Herrera-Martínez, y Col., 2013). Cuando se analizaron las fracciones subcelulares (soluble e insoluble), durante la cinética de enquistamiento se encontró que la actina polimerizada está en mayor proporción durante dicho proceso. El citoesqueleto de actina se organizó en diferentes estructuras, lo que sugiere que la actina puede

participar en varios eventos durante el enquistamiento. Por su parte, el aumento de la actividad de las GTPasas, se observó a tiempos tempranos, pero disminuyó en los tiempos tardíos del enquistamiento. Por otro lado, cuando se utilizan inhibidores para el citoesqueleto (citocalasina D) o de las pequeñas GTPasas (Y27632), se presentó una reducción del 80% del enquistamiento (Herrera-Martínez, y Col., 2013). Este último resultado es similar a lo que observamos cuando se trataron los trofozoítos de *E. invadens* con 219  $\mu$ M de resveratrol, para inhibir el enquistamiento.

El mecanismo de cómo el resveratrol pudiera disminuir el enquistamiento de *E. invadens* pudiera ser explicado por el trabajo de Azios, y Col., (2007), donde el resveratrol en células de cáncer de mama actúa de manera antiestrogénica, reduce la migración de las células y modula la formación de las estructuras de actina (filopodios y lamelopodios); así mismo, dicho compuesto tiene la capacidad de disminuir la actividad de Rho GTPasas, las cuales son importantes moduladoras en la señalización del citoesqueleto de actina (Azios, y Col., 2007). La inhibición de la formación de quiste podría evitar la diseminación de éstos, y por ende combatir la transmisión de la amibiasis.

Para descubrir los blancos del resveratrol en *E. histolytica* se utilizó la estrategia experimental de DARTS la cual ofrece la ventaja de que el fármaco no requiere modificaciones en su estructura, así como, es independiente del mecanismo de acción. En nuestros resultados se observó la estabilización de dos bandas con peso molecular aproximado de 60 y 34 kDa, sin embargo al hacer la búsqueda en la literatura de proteínas homólogas que interaccionan con el resveratrol y con

peso molecular al observado, no encontramos proteínas que coincidirán con dichas especificaciones, tal vez se trate de proteínas que no han sido reportada su interacción con el resveratrol y sean nuevos blancos terapéuticos, lo cual las hace interesante para seguir estudiando ya sea con otros fármacos que actúen contra estas, o buscar derivados del resveratrol que tengan una afinidad y estabilidad mayor.

Si estas proteínas son exclusivas de *E. histolytica* las hace unos blancos importantes para el diseño de nuevos amebicidas.

Finalmente los resultados del acoplamiento molecular de las proteínas homólogas de *E. histolytica* con proteínas que han sido reportadas que interaccionan con el resveratrol y que mostraron mejor energía de unión fueron la  $\alpha$  tubulina y la CP112 con una energía de (-7.2 kcal/mol), seguidas de la miosina (-7.1 kcal/mol) y la anhidrasa carbónica y la CP5 (-7.0 kcal/mol). En estudios previos se ha demostrado que la  $\alpha$  tubulina es una de las proteínas que interacciona con derivados del resveratrol tanto en *L. infantum*, y en células Caco-2, dicha interacción inhibe la polimerización de la  $\alpha$  tubulina y arresta el ciclo celular en la mitosis (Tolomeo, y Col., 2013. Schneider, y Col., 2003), lo cual lleva a la apoptosis, por un mecanismo aún desconocido (Fan, 1999). Así mismo, los posicionamientos más probables del resveratrol en la tubulina están en la región donde se lleva a cabo la polimerización de dicha proteína. Sin embargo las energías de unión del resveratrol respecto a todas las proteínas analizadas no son tan fuertes, por lo que esto explicaría la discrepancia que se tiene respecto a los resultados del DARTS, donde pueden existir proteínas que tengan una mayor energía de unión y sean protegidas ante la digestión de la termolisina.

## 8. Conclusiones

1. El resveratrol presentó capacidad amebicida *in vitro* contra trofozoítos de *E. histolytica* de forma dosis y tiempo dependiente, presentando una IC<sub>50</sub> de 219  $\mu$ M.
2. Durante el proceso de muerte celular, el resveratrol indujo pérdida del pleomorfismo celular y cambios ultraestructurales como la condensación de la cromatina, incremento en la granularidad celular y formación de vacuolas con contenido membranal.
3. El resveratrol induce la muerte celular en trofozoítos de *E. histolytica* por apoptosis en consecuencia del incremento de las ERO
4. La exposición del resveratrol a dosis menores de la IC<sub>50</sub> disminuye de virulencia de los trofozoítos de *E. histolytica*
5. Al análisis *in silico* sugiere que el blanco molecular más probable del resveratrol en *E. histolytica* es la tubulina.
6. El resveratrol tuvo un efecto inhibitorio en el enquistamiento de *E. invadens* de forma dosis dependiente.
7. El tratamiento con resveratrol tuvo un efecto terapéutico contra el absceso hepático amebiano en los hámsteres inoculados con trofozoítos virulentos

## 9. Perspectivas

1. Analizar la capacidad amebicida *in vitro* e *in vivo* de derivados del resveratrol
2. Identificar mediante espectrometría de masas las proteínas que se estabilizan en los experimentos DARTS.
3. Identificar el patrón de cambio de las proteínas de *E. histolytica* durante el tratamiento con resveratrol.
4. Visualizar las estructuras del citoesqueleto de actina y microtúbulos en trofozoítos de *E. histolytica* tratados con resveratrol.
5. Evaluar la actividad de la RhoA GTPasa de *E. invadens* durante el enquistamiento y tratamiento con resveratrol.
6. Visualizar el grado de la polimerización del citoesqueleto de actina de *E. invadens* durante el enquistamiento y tratamiento con resveratrol.
7. Demostrar si los quistes de *E. invadens* que se formaron durante el tratamiento con resveratrol tienen la capacidad de desenquistar.
8. Evaluar si el resveratrol y sus derivados disminuyen las vías de señalización de JNK, ERK, p38 y NF- $\kappa$ B en el hígado durante el desarrollo del AHA.
9. Estudiar si el resveratrol y sus derivados disminuyen el estrés oxidativo cuando se inoculan trofozoítos virulentos de *E. histolytica* en el hígado de hámster.

## 10. Referencias

- Aggarwal, B. B., Takada, Y., & Oommen, O. V. (2004). From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *13*(10), 1327–1338.
- Aguilar-Díaz, H., Díaz-Gallardo, M., Lacleste, J. P., & Carrero, J. C. (2010). In vitro Induction of *Entamoeba histolytica* Cyst-like Structures from Trophozoites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *4*(2), e607.
- Akira, S., Yamamoto, M., & Takeda, K. (2003). Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochemical Society Transactions*, *31*(Pt 3), 637–642.
- Alanís, A. D., Calzada, F., Cedillo-Rivera, R., & Meckes, M. (2003). Antiprotozoal activity of the constituents of *Rubus coriifolius*. *Phytotherapy Research*, *17*(6), 681–682.
- Anekonda, T. S. (2006). Resveratrol—A boon for treating Alzheimer’s disease? *Brain Research Reviews*, *52*(2), 316–326.
- Anonymous. (1997). WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiological Bulletin*, *18*, 13–14.
- Aqeel, Y., Iqbal, J., Siddiqui, R., Gilani, A. H., & Khan, N. A. (2012). Anti-Acanthamoebic properties of resveratrol and demethoxycurcumin. *Experimental Parasitology*, *132*(4), 519–523.
- Arhets, P., Olivo, J. C., Gounon, P., Sansonetti, P., & Guillén, N. (1998). Virulence and functions of myosin II are inhibited by overexpression of light meromyosin in *Entamoeba histolytica*. *Molecular Biology of the Cell*, *9*(6), 1537–1547.
- Arroyo-Begovich, A., & Cárabez-Trejo, A. (1982). Location on chitin in the cyst wall of *Entamoeba invadens* with colloidal gold tracers. *The Journal of Parasitology*, *68*(2), 253–258.
- Ayala, P., Samuelson, J., Wirth, D., & Orozco, E. (1990). *Entamoeba histolytica*: physiology of multidrug resistance. *Experimental Parasitology*, *71*(2), 169–175.
- Azios, N. G., Krishnamoorthy, L., Harris, M., Cubano, L. A., Cammer, M., & Dharmawardhane, S. F. (2007). Estrogen and resveratrol regulate Rac and Cdc42 signaling to the actin cytoskeleton of metastatic breast cancer cells. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *9*(2), 147–158.
- Bailey, G. B., Day, D. B., & McComer, N. E. (1992). *Entamoeba* motility: Dynamics of cytoplasmic streaming, locomotion and translocation of surface-bound particles, and

- organization of the actin cytoskeleton in *Entamoeba invadens*. *The Journal of Protozoology*, 39(2), 267–272.
- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Sinclair, D. A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444(7117), 337–342.
- Beard, C. M., Noller, K. L., O’Fallon, W. M., Kurland, L. T., & Dockerty, M. B. (1979). Lack of evidence for cancer due to use of metronidazole. *The New England Journal of Medicine*, 301(10), 519–522.
- Belley, A., & Chadee, K. (2000). Production of prostaglandin E2 by *Entamoeba histolytica* via a novel cyclooxygenase. *Archives of Medical Research*, 31(4 SUPPL. 1).
- Bereswill, S., Muñoz, M., Fischer, A., Plickert, R., Haag, L. M., Otto, B., Heimesaat, M. M. (2010). Anti-inflammatory effects of Resveratrol, Curcumin and Simvastatin in acute small intestinal inflammation. *PLoS ONE*, 5(12).
- Biller, L., Schmidt, H., Krause, E., Gelhaus, C., Matthiesen, J., Handal, G., Bruchhaus, I. (2009). Comparison of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. *Proteomics*, 9(17), 4107–20.
- Bolaños, V., Díaz-Martínez, A., Soto, J., Rodríguez, M. a, López-Camarillo, C., Marchat, L. a, & Ramírez-Moreno, E. (2014). The flavonoid (-)-epicatechin affects cytoskeleton proteins and functions in *Entamoeba histolytica*. *Journal of Proteomics*, (239).
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54.
- Braga, L. L., Ninomiya, H., McCoy, J. J., Eacker, S., Wiedmer, T., Pham, C., Petri, W. A. (1992). Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Clinical Investigation*, 90(3), 1131–1137.
- Caballero-Salcedo, A., Viveros-Rogel, M., Salvatierra, B., Tapia-Conyer, R., Sepulveda-Amor, J., Gutierrez, G., & Ortiz-Ortiz, L. (1994). Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50(4), 412–419.
- Calamini, B., Ratia, K., Malkowski, M. G., Cuendet, M., Pezzuto, J. M., Santarsiero, B. D., & Mesecar, A. D. (2010a). Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. *The Biochemical Journal*, 429(2), 273–282.

- Calamini, B., Ratia, K., Malkowski, M. G., Cuendet, M., Pezzuto, J. M., Santarsiero, B. D., & Mesecar, A. D. (2010b). Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. *The Biochemical Journal*, *429*(2), 273–282.
- Calzada, F., Cedillo-Rivera, R., Bye, R., & Mata, R. (2001). Geranins C and D, additional new antiprotozoal A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum*. *Planta Medica*, *67*(7), 677–80.
- Calzada, F., Cerda-García-Rojas, C. M., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R., Bye, R., & Mata, R. (1999). Geranins A and B, new antiprotozoal A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum*. *Journal of Natural Products*, *62*(5), 705–709.
- Calzada, F., Yépez-Mulia, L., & Aguilar, A. (2006). In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, *108*(3), 367–370.
- Calzado Flores, C., Verde Star, J., Morales Vallarta, M., & Segura Luna, J. J. (2007). Inhibición del proceso de enquistamiento de *Entamoeba invadens* por *Castela texana*. *Ciencia UANL*, *X*, 44–48.
- Chadee, K., Keller, K., Forstner, J., Innes, D. J., & Ravdin, J. I. (1991). Mucin and nonmucin secretagogue activity of *Entamoeba histolytica* and cholera toxin in rat colon. *Gastroenterology*, *100*(4), 986–997.
- Chadee, K., Petri, W. A., Innes, D. J., & Ravdin, J. I. (1987). Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Investigation*, *80*(5), 1245–1254.
- Chan, M. M. Y. (2002). Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochemical Pharmacology*, *63*(2), 99–104.
- Chang, C.-C., Chang, C.-Y., Wu, Y.-T., Huang, J.-P., Yen, T.-H., & Hung, L.-M. (2011). Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase. *Journal of Biomedical Science*, *18*(1), 47.
- Chaudhary, N., & Pfluger, P. T. (2009). Metabolic benefits from Sirt1 and Sirt1 activators. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *12*(4), 431–437.
- Chen, Q., Ganapathy, S., Singh, K. P., Shankar, S., & Srivastava, R. K. (2010). Resveratrol induces growth arrest and apoptosis through activation of FOXO transcription factors in prostate cancer cells. *PLoS ONE*, *5*(12).

- Chen, W.-P., Chi, T.-C., Chuang, L.-M., & Su, M.-J. (2007). Resveratrol enhances insulin secretion by blocking KATP and KV channels of beta cells. *European Journal of Pharmacology*, 568(1-3), 269–277.
- Chong, J., Poutaraud, A., & Hugueney, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, 177(3), 143–155.
- Clark, C. G., & Roger, A. J. (1995). Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(14), 6518–6521.
- Clark, C. G., Espinosa Cantellano, M., Bhattacharya, A. (2000). *Entamoeba histolytica: An Overview of the biology of the organism en Amebiasis*. (1–). London, Reino Unido. Imperial College Press
- Clark, M. R. (2011). Flippin' lipids. *Nature Immunology*, 12(5), 373–375.
- Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C. N., Tanese, N., & Krainc, D. (2006). Transcriptional Repression of PGC-1 $\alpha$  by Mutant Huntingtin Leads to Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. *Cell*, 127(1), 59–69.
- Cui, X., Jin, Y., Hofseth, A. B., Pena, E., Habiger, J., Chumanevich, A., Hofseth, L. J. (2010). Resveratrol suppresses colitis and colon cancer associated with colitis. *Cancer Prevention Research*, 3(4), 549–559.
- Culpitt, S. V, Rogers, D. F., Fenwick, P. S., Shah, P., De Matos, C., Russell, R. E. K., Donnelly, L. E. (2003). *Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD*. *Thorax* (Vol. 58).
- Dallakyan, S., & Olson, A. J. (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1263, 243–50.
- Das, S., Alagappan, V. K. T., Bagchi, D., Sharma, H. S., Maulik, N., & Das, D. K. (2005). Coordinated induction of iNOS-VEGF-KDR-eNOS after resveratrol consumption: A potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart. *Vascular Pharmacology*, 42(5-6), 281–289.
- Das, S., Falchi, M., Bertelli, A., Maulik, N., & Das, D. K. (2006). Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by the anti-inflammatory action of resveratrol. *Arzneimittel-Forschung*, 56(10), 700–706.
- Das, S., Tosaki, A., Bagchi, D., Maulik, N., & Das, D. K. (2005). Resveratrol-mediated activation of cAMP response element-binding protein through adenosine A3 receptor by Akt-dependent and -independent pathways. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(2), 762–769.

- Denis, M., & Chadee, K. (1988). In vitro and in vivo studies of macrophage functions in amebiasis. *Infection and Immunity*, *56*(12), 3126–3131.
- Descoteaux, S., Ayala, P., Samuelson, J., & Orozco, E. (1995). Increase in mRNA of multiple Eh pgp genes encoding P-glycoprotein homologues in emetine-resistant *Entamoeba histolytica* parasites. *Gene*, *164*(1), 179–184.
- D'Annunzio, V., Donato, M., Buchholz, B., Pérez, V., Miksztowicz, V., Berg, G., & Gelpi, R. J. (2012). High cholesterol diet effects on ischemia-reperfusion injury of the heart. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *90*(9), 1185–96.
- Diamond, L. S., Harlow, D. R., & Cunnick, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *72*(4), 431–432.
- Docherty, J. J., Fu, M. M., Stiffler, B. S., Limperos, R. J., Pokabla, C. M., & DeLucia, A. L. (1999). Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. *Antiviral Research*, *43*(3), 145–155.
- Dockrell, D. H. (2001). Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious diseases. *The Journal of Infection*, *42*(4), 227–234.
- Donnelly, L. E., Newton, R., Kennedy, G. E., Fenwick, P. S., Leung, R. H. F., Ito, K., Barnes, P. J. (2004). Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *287*(4), L774–L783.
- Dörrie, J., Gerauer, H., Wachter, Y., & Zunino, S. J. (2001). Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Research*, *61*(12), 4731–4739.
- Duszenko, M., Ginger, M. L., Brennand, A., Gualdrón-López, M., Colombo, M. I., Coombs, G. H., Michels, P. A. M. (2011). Autophagy in protists. *Autophagy*, *7*(2), 127–158.
- Ehrenkaufer, G. M., Hackney, J. A., & Singh, U. (2009). A developmentally regulated Myb domain protein regulates expression of a subset of stage-specific genes in *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology*, *11*(6), 898–910.
- Ehrenkaufer, G. M., Haque, R., Hackney, J. A., Eichinger, D. J., & Singh, U. (2007). Identification of developmentally regulated genes in *Entamoeba histolytica*: Insights into mechanisms of stage conversion in a protozoan parasite. *Cellular Microbiology*, *9*(6), 1426–1444.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 495–516.

- Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 594, 57–72.
- Espinosa-Cantellano, M., & Martinez-Palomo, A. (2000). Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2), 318–331.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., & Jürgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine*, 13(4), 341–390.
- Estrov, Z., Shishodia, S., Faderl, S., Harris, D., Van, Q., Kantarjian, H. M., Aggarwal, B. B. (2003). Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappaB, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 102(3), 987–995.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., & Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 148(7), 2207–2216.
- Fan, W. (1999). Possible Mechanisms of Paclitaxel-Induced Apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 57(11), 1215–1221.
- Filice, C., Di Perri, G., Strosselli, M., Brunetti, E., Dughetti, S., Van Thiel, D. H., & Scotti-Foglieni, C. (1992). Outcome of hepatic amebic abscesses managed with three different therapeutic strategies. *Digestive Diseases and Sciences*, 37(2), 240–7.
- Filippi-Chiela, E. C., Villodre, E. S., Zamin, L. L., & Lenz, G. (2011). Autophagy Interplay with Apoptosis and Cell Cycle Regulation in the Growth Inhibiting Effect of Resveratrol in Glioma Cells. *PLoS ONE*, 6(6), e20849.
- Flores-Romo, L., Tsutsumi, V., Estrada-García, T., Shibayama, M., Aubry, J.-P., Bacon, K. B., & Martínez-Palomo, A. (1994). CD59 (protectin) molecule, resistance to complement, and virulence of *Entamoeba histolytica*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(1), 116–117.
- Frémont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, 66(8), 663–673.
- Garcia-Rivera, G., Rodriguez, M. A., Ocadiz, R., Martinez-Lopez, M. C., Arroyo, R., Gonzalez-Robles, A., & Orozco, E. (1999). *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular Microbiology*, 33(3), 556–568.

- Garza, M. D. LA, Gallegos, B., & Meza, I. (1989). Characterization of a cytochalasin D-resistant mutant of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Protozoology*, 36(6), 556–560.
- Geng, J., & Klionsky, D. J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. “Protein modifications: beyond the usual suspects” review series. *EMBO Reports*, 9(9), 859–864.
- Gewirtz, D. A. (2013). Autophagy and senescence: A partnership in search of definition. *Autophagy*, 9(5), 808–812.
- Ghosh, A. S., Dutta, S., & Raha, S. (2010). Hydrogen peroxide-induced apoptosis-like cell death in *Entamoeba histolytica*. *Parasitology International*, 59(2), 166–72.
- Godbold, G. D., & Mann, B. J. (1998). Involvement of the actin cytoskeleton and p21rho-family GTPases in the pathogenesis of the human protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31(8), 1049–1058.
- Gonzalez-Mariscal, L., Chávez de Ramírez, B., & Cerejido, M. (1985). Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *The Journal of Membrane Biology*, 86(2), 113–125.
- Gracia-Sancho, J., Laviña, B., Rodríguez-Vilarrupla, A., García-Calderó, H., Fernández, M., Bosch, J., & García-Pagán, J. C. (2008). Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology*, 47(4), 1248–1256.
- Graham Clark, C., Cunnick, C. C., & Diamond, L. S. (1993). *Entamoeba histolytica*: Is conversion of “nonpathogenic” amebae to the “pathogenic” form a real phenomenon? *Experimental Parasitology*, 74(4), 456–460.
- Grollman, A. P. (1968). Inhibitors of protein biosynthesis. V. Effects of emetine on protein and nucleic acid biosynthesis in HeLa cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 243(15), 4089–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4299101>
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*.
- Guerrant, R. L., Van Gilder, T., Steiner, T. S., Thielman, N. M., Slutsker, L., Tauxe, R. V, Pickering, L. K. (2001). Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(3), 331–351.
- Guillén, N. (1996). Role of signalling and cytoskeletal rearrangements in the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Trends in Microbiology*.

- Gutiérrez-Kobeh, L., Cabrera, N., & Pérez-Montfort, R. (1997). A mechanism of acquired resistance to complement-mediated lysis by *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Parasitology*, 83(2), 234–241.
- Hamelmann, C., Urban, B., Foerster, B., & Horstmann, R. D. (1993). Complement resistance of pathogenic *Entamoeba histolytica* mediated by trypsin-sensitive surface component(s). *Infection and Immunity*, 61(5), 1636–1640.
- Hanna, R. M., Dahniya, M. H., Badr, S. S., & El-Betagy, A. (2000). Percutaneous catheter drainage in drug-resistant amoebic liver abscess. *Tropical Medicine and International Health*, 5(8), 578–581.
- Haque, R., Huston, C. D., Hughes, M., Houpt, E., & Petri, W. A. (2003). Amebiasis. *The New England Journal of Medicine*, 348(16), 1565–1573.
- Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., & Phipps, R. P. (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology*.
- Hassan-Khabbar, S., Cottart, C. H., Wendum, D., Vibert, F., Clot, J. P., Savouret, J. F., Nivet-Antoine, V. (2008). Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia-reperfusion: A possible strategy in liver surgery. *Liver Transplantation*, 14(4), 451–459.
- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics*, 43, 67–93.
- Herrera-Martínez, M., Hernández-Ramírez, V. I., Lagunes-Guillén, a E., Chávez-Munguía, B., & Talamás-Rohana, P. (2013). Actin, RhoA, and Rab11 Participation during Encystment in *Entamoeba invadens*. *BioMed Research International*, 2013, 1–13.
- Hiroto, Y., Tadokoro, K., Tsuda, T., Nakazono, E., Ohnaka, K., Takayanagi, R., Tsuda, H. (2011). Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine, down-regulates protein S expression in HepG2 cells. *Thrombosis Research*, 127(1), e1–e7.
- Ho, D. J., Calingasan, N. Y., Wille, E., Dumont, M., & Beal, M. F. (2010). Resveratrol protects against peripheral deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Experimental Neurology*, 225(1), 74–84.
- International Agency for Research on Cancer. (1977). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: some miscellaneous pharmaceutical substances, 13, 1–255.
- Isabel Colombo, M., & Simon, H.-U. (2009). Autophagy. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

- Ivory, C. P. A., Keller, K., & Chadee, K. (2006). CpG-Oligodeoxynucleotide is a potent adjuvant with an *Entamoeba histolytica* Gal-Inhibitable lectin vaccine against amoebic liver abscess in gerbils. *Infection and Immunity*, 74(1), 528–536.
- Jarillo-Luna, R. A., Campos-Rodríguez, R., & Tsutsumi, V. (2002). *Entamoeba histolytica*: Immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. *Experimental Parasitology*, 101(1), 40–56.
- Jarillo-Luna, R. A., Campos-Rodríguez, R., & Tsutsumi, V. (2000). Morphological changes of mouse liver infected with trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research*, 31(4), S251–S253.
- Jordán, J. (2003). Apoptosis : muerte celular programada. *Bioquímica*, 22, 100–6.
- Kammanadiminti, S. J., Mann, B. J., Dutil, L., & Chadee, K. (2004). Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica*. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(1), 155–157.
- Karuppagounder, S. S., Pinto, J. T., Xu, H., Chen, H. L., Beal, M. F., & Gibson, G. E. (2009). Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 54(2), 111–118.
- Kazy, Z., Puhó, E., & Czeizel, A. E. (2005). Teratogenic potential of vaginal metronidazole treatment during pregnancy. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 123(2), 174–178.
- Kedzierski, L., Curtis, J. M., Kaminska, M., Jodynis-Liebert, J., & Murias, M. (2007). In vitro antileishmanial activity of resveratrol and its hydroxylated analogues against *Leishmania major* promastigotes and amastigotes. *Parasitology Research*, 102(1), 91–97.
- Kelly, G. S. (2010). A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: Part 2. *Alternative Medicine Review*.
- Kelsall, B. L., & Ravdin, J. I. (1993). Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Infectious Diseases*, 168(5), 1319–1322.
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110(2), 163–175.
- Knight, R. (1980). The chemotherapy of amoebiasis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 6(5), 577–593.

- Kohli, V., Gao, W., Camargo, C. A., & Clavien, P. A. (1997). Calpain is a mediator of preservation-reperfusion injury in rat liver transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(17), 9354–9359.
- Kongara, S., & Karantza, V. (2012). The interplay between autophagy and ROS in tumorigenesis. *Frontiers in Oncology*, *2*.
- Krupp, I. M., & Powell, S. J. (1971). Comparative study of the antibody response in amebiasis. Persistence after successful treatment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *20*(3), 421–424.
- Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2002). Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(21), 18619–18625.
- Kumar, A., & Sharma, S. S. (2010). NF- $\kappa$ B inhibitory action of resveratrol: A probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *394*(2), 360–365.
- Krüger, R., Vieira-Saecker, A. M., Kuhn, W., Berg, D., Müller, T., Kühnl, N., Riess, O. (1999). Increased susceptibility to sporadic Parkinson's disease by a certain combined alpha-synuclein/apolipoprotein E genotype. *Annals of Neurology*, *45*(5), 611–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10319883>
- Lamas, J., Morais, P., Arranz, J. A., Sanmartín, M. L., Orallo, F., & Leiro, J. (2009). Resveratrol promotes an inhibitory effect on the turbot scuticociliate parasite *Philasterides dicentrarchi* by mechanisms related to cellular detoxification. *Veterinary Parasitology*, *161*(3-4), 307–315.
- Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell*.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Wallace, F. G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of Protozoology*, *27*(1), 37–58.
- Lin, H. Y., Lansing, L., Merillon, J. M., Davis, F. B., Tang, H. Y., Shih, A., Davis, P. J. (2006). Integrin alpha V beta 3 contains a receptor site for resveratrol. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *20*(10), 1742–1744.

- Lin, J., Wu, P. H., Tarr, P. T., Lindenberg, K. S., St-Pierre, J., Zhang, C. Y., Spiegelman, B. M. (2004). Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 $\alpha$  null mice. *Cell*, *119*(1), 121–135.
- Lin, J. Y., & Chadee, K. (1992). Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *148*(12), 3999–4005.
- Lin, J. Y., Seguin, R., Keller, K., & Chadee, K. (1994). Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. *Infection and Immunity*, *62*(5), 1534–1541.
- Lomenick, B., Hao, R., Jonai, N., Chin, R. M., Aghajan, M., Warburton, S., Huang, J. (2009). Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(51), 21984–21989.
- López-Camarillo, C., Luna-Arias, J. P., Marchat, L. A., & Orozco, E. (2003). EhPgp5 mRNA stability is a regulatory event in the *Entamoeba histolytica* multidrug resistance phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(13), 11273–11280.
- López-Romero, E., & Villagómez-Castro, J. C. (1993). Encystation in *Entamoeba invadens*. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, *9*(6), 225–227.
- Ludvík, J., & Shipstone, A. C. (1970). The ultrastructure of *Entamoeba histolytica*. *Bulletin of the World Health Organization*, *43*(2), 301–308.
- Madriz, X., Martínez, M. B., Rodríguez, M. A., Sierra, G., Martínez-López, C., Riverón, A. M., Orozco, E. (2004). Expression in fibroblasts and in live animals of *Entamoeba histolytica* polypeptides EhCP112 and EhADH112. *Microbiology*, *150*(5), 1251–1260.
- Makioka, A., Kumagai, M., Kobayashi, S., & Takeuchi, T. (2002). Possible role of calcium ions, calcium channels and calmodulin in excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. *Parasitology Research*, *88*(9), 837–43.
- Makioka, A., Kumagai, M., Kobayashi, S., & Takeuchi, T. (2003). Involvement of signaling through protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase in the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. *Parasitology Research*, *91*(3), 204–8.
- Makioka, A., Kumagai, M., Kobayashi, S., & Takeuchi, T. (2005). *Entamoeba invadens*: cysteine protease inhibitors block excystation and metacystic development. *Experimental Parasitology*, *109*(1), 27–32.

- Maldonado-Bernal, C., Kirschning, C. J., Rosenstein, Y., Rocha, L. M., Rios-Sarabia, N., Espinosa-Cantellano, M., Isibasi, A. (2005). The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. *Parasite Immunology*, 27(4), 127–137.
- Mann, S. S., & Hammarback, J. A. (1994). Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *Journal of Biological Chemistry*, 269(15), 11492–11497.
- Marinets, A., Zhang, T., Guillén, N., Gounon, P., Bohle, B., Vollmann, U., Duchêne, M. (1997). Protection against invasive amebiasis by a single monoclonal antibody directed against a lipophosphoglycan antigen localized on the surface of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Experimental Medicine*, 186(9), 1557–1565.
- Marion, S., Wilhelm, C., Voigt, H., Bacri, J.-C., & Guillén, N. (2004). Overexpression of myosin IB in living *Entamoeba histolytica* enhances cytoplasm viscosity and reduces phagocytosis. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 15), 3271–3279.
- Martínez, M. B., Rodríguez, M. A., García-Rivera, G., Sánchez, T., Hernández-Pando, R., Aguilar, D., & Orozco, E. (2009). A pcDNA-Ehcpadh vaccine against *Entamoeba histolytica* elicits a protective Th1-like response in hamster liver. *Vaccine*, 27(31), 4176–4186.
- Martínez-López, C., Orozco, E., Sánchez, T., García-Pérez, R. M., Hernández-Hernández, F., & Rodríguez, M. A. (2004). The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cellular Microbiology*, 6(4), 367–376.
- Martínez-Palomo, A. (1987). The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 3(4), 111–118.
- Matsui, H., Lin, L.-R., Ho, Y.-S., & Reddy, V. N. (2003). The effect of up- and downregulation of MnSOD enzyme on oxidative stress in human lens epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(8), 3467–3475.
- McConkey, D. J., & Orrenius, S. (1996). Signal transduction pathways in apoptosis. *Stem Cells*, 14(6), 619–631.
- Mesner, P. W., Budihardjo, I. I., & Kaufmann, S. H. (1997). Chemotherapy-Induced Apoptosis. *Advances in Pharmacology*, 41(C), 461–499.
- Mikstacka, R., Rimando, A. M., & Ignatowicz, E. (2010). Antioxidant effect of trans-Resveratrol, pterostilbene, quercetin and their combinations in human erythrocytes In vitro. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(1), 57–63.

- Minta, A., Kao, J. P. Y., & Tsien, R. Y. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *Journal of Biological Chemistry*, 264(14), 8171–8178.
- Mizushima, N., & Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature Cell Biology*, 12(9), 823–830.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395(6700), 395–398.
- Morais, P., Lamas, J., Sanmartín, M. L., Orallo, F., & Leiro, J. (2009). Resveratrol Induces Mitochondrial Alterations, Autophagy and a Cryptobiosis-like State in Scuticociliates. *Protist*, 160(4), 552–564.
- Morales-Espinoza, E. M., Sánchez-Pérez, H. J., Del Mar Garcia-Gil, M., Vargas-Morales, G., Méndez-Sánchez, J. D., & Pérez-Ramírez, M. (2003). Intestinal parasites in children, in highly deprived areas in the border region of Chiapas, Mexico. *Salud Publica de Mexico*, 45(5), 379–388.
- Moreno-Fierros, L., Campos-Rodríguez, R., & Enríquez-Rincón, F. (1992). Kinetics of the anti-amebic antibody producing cells response in Peyer's patches and spleen after both local and systemic stimulation in Balb/c mice. *Archives of Medical Research*, 23(2), 165–168.
- Murdoch, C., Muthana, M., & Lewis, C. E. (2005). Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(10), 6257–6263.
- Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124–1136.
- Nandi, N., Sen, A., Banerjee, R., Kumar, S., Kumar, V., Ghosh, A. N., & Das, P. (2010). Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 7), 1926–41.
- Narayanan, B. A., Geoffroy, O., Willingham, M. C., Re, G. G., & Nixon, D. W. (1999). p53/p21(WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. *Cancer Letters*, 136(2), 215–221.
- Ngamwongsatit, P., Banada, P. P., Panbangred, W., & Bhunia, A. K. (2008). WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *Journal of Microbiological Methods*, 73(3), 211–215.

- Nichols W. K. (2003). *Drogas antiinfecciosas en Farmacia de Remington (1210-1865)*. Buenos Aires Argentina.: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Novikoff, A. B., Novikoff, P. M., Davis, C., & Quintana, N. (1972). Studies on microperoxisomes. II. A cytochemical method for light and electron microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 20(12), 1006–1023.
- Olivos-García, A., Nequiz-Avendaño, M., Tello, E., Martínez, R. D., González-Canto, A., López-Vancell, R., Pérez-Tamayo, R. (2004). Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. *Experimental and Molecular Pathology*, 77(1), 66–71.
- Olivos-García, A., Saavedra, E., Ramos-Martínez, E., Nequiz, M., & Pérez-Tamayo, R. (2009). Molecular nature of virulence in *Entamoeba histolytica*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1033–1037.
- Opipari, A. W., Tan, L., Boitano, A. E., Sorenson, D. R., Aurora, A., & Liu, J. R. (2004). Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Research*, 64(2), 696–703.
- Orozco, E., de la Cruz Hernández, F., & Rodríguez, M. A. (1985). Isolation and characterization of *Entamoeba histolytica* mutants resistant to emetine. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 15(1), 49–59.
- Orozco, E., Guarneros, G., Martinez-Palomo, A., & Sánchez, T. (1983). *Entamoeba histolytica*. phagocytosis as a virulence factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 158(5), 1511–1521.
- Otto, G. P., Wu, M. Y., Kazgan, N., Anderson, O. R., & Kessin, R. H. (2003). Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 17636–17645.
- Ozkoc, S., Tuncay, S., Delibas, S. B., & Akisu, C. (2009). In vitro effects of resveratrol on *Trichinella spiralis*. *Parasitology Research*, 105(4), 1139–1143.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. (1998). *Mexico en: Health in the americas (357-371)*. Washington, D.C.
- Pearson, K. J., Baur, J. A., Lewis, K. N., Peshkin, L., Price, N. L., Labinskyy, N., de Cabo, R. (2008). Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metabolism*, 8(2), 157–168.
- Pelosof, L. C., Davis, P. H., Zhang, Z., Zhang, X., & Stanley, S. L. (2006). Co-ordinate but disproportionate activation of apoptotic, regenerative and inflammatory pathways

characterizes the liver response to acute amebic infection. *Cellular Microbiology*, 8(3), 508–22.

- Petri, W. A., Haque, R., & Mann, B. J. (2002). The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annual Review of Microbiology*, 56, 39–64.
- Picazarri, K., Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2008). Autophagy during proliferation and encystation in the protozoan parasite *Entamoeba invadens*. *Infection and Immunity*, 76(1), 278–288.
- Picazarri, K., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., & Nozaki, T. (2008). Analysis of autophagy in the enteric protozoan parasite *Entamoeba*. *Methods in Enzymology*, 451, 359–371.
- Pirola, L., & Fröjdö, S. (2008). Resveratrol: One molecule, many targets. *IUBMB Life*, 60(5), 323–332.
- Pizarro, J. G., Verdaguer, E., Ancrenaz, V., Junyent, F., Sureda, F., Pallàs, M., Camins, A. (2011a). Resveratrol inhibits proliferation and promotes apoptosis of neuroblastoma cells: Role of sirtuin 1. *Neurochemical Research*, 36(2), 187–194.
- Pizarro, J. G., Verdaguer, E., Ancrenaz, V., Junyent, F., Sureda, F., Pallàs, M., Camins, A. (2011b). Resveratrol inhibits proliferation and promotes apoptosis of neuroblastoma cells: Role of sirtuin 1. *Neurochemical Research*, 36(2), 187–194.
- Powell, R. D., Swet, J. H., Kennedy, K. L., Huynh, T. T., McKillop, I. H., & Evans, S. L. (2014). Resveratrol attenuates hypoxic injury in a primary hepatocyte model of hemorrhagic shock and resuscitation. *J Trauma Acute Care Surg*, 76(2), 409–417.
- Que, X., & Reed, S. L. (2000). Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2), 196–206.
- Ravdin, J. I., Jackson, T. F., Petri, W. A., Murphy, C. F., Ungar, B. L., Gathiram, V., Simjee, A. E. (1990). Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Infectious Diseases*, 162(3), 768–772.
- Reed, S. L., & Gigli, I. (1990). Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. Initiation of complement activation by an extracellular neutral cysteine proteinase. *Journal of Clinical Investigation*, 86(6), 1815–1822.
- Rico, G., Leandro, E., Rojas, S., Gimenez, J. A., & Kretschmer, R. (2000). The effect of monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon nitric oxide production by human leukocytes. *Archives of Medical Research*, 31(4 SUPPL. 1).

- Rico, G., Leandro, E., Rojas, S., Gimenez, J. A., & Kretschmer, R. R. (2003). The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Parasitology Research*, *90*(4), 264–267.
- Robb, E. L., Page, M. M., Wiens, B. E., & Stuart, J. A. (2008). Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *367*(2), 406–412.
- Rustia, M., & Shubik, P. (1972). Induction of lung tumors and malignant lymphomas in mice by metronidazole. *Journal of the National Cancer Institute*, *48*(3), 721–729.
- Salata, R. A., Cox, J. G., & Ravdin, J. I. (1987). The interaction of human T-lymphocytes and *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amoebae by lectin-dependent lymphocytes. *Parasite Immunology*, *9*(2), 249–261.
- Salata, R. A., Martinez-Palomo, A., Murray, H. W., Conales, L., Trevino, N., Segovia, E., Ravdin, J. I. (1986). Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune responses effective in vitro against *Entamoeba histolytica*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *136*(7), 2633–2639.
- Samarawickrema, N. A., Brown, D. M., Upcroft, J. A., Thammapalerd, N., & Upcroft, P. (1997). Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *40*(6), 833–840.
- Sánchez-Fidalgo, S., Cárdeno, A., Villegas, I., Talero, E., & de la Lastra, C. A. (2010). Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology*, *633*(1-3), 78–84.
- Sánchez-Guillén, M. D. C., Pérez-Fuentes, R., Salgado-Rosas, H., Ruiz-Argüelles, A., Ackers, J., Shire, A., & Talamás-Rohana, P. (2002). Differentiation of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *66*(6), 731–737.
- Scarlatti, F., Granata, R., Meijer, A. J., & Codogno, P. (2009). Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death and Differentiation*, *16*(1), 12–20.
- Schneider, Y., Chabert, P., Stutzmann, J., Coelho, D., Fougerousse, A., Gossé, F., Raul, F. (2003). Resveratrol analog (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene is a potent anti-mitotic drug inhibiting tubulin polymerization. *International Journal of Cancer*, *107*(2), 189–196.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Henning, S. M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M. G., & Heber, D. (2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin,

- ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(6), 360–367.
- Séguin, R., Mann, B. J., Keller, K., & Chadee, K. (1997). The tumor necrosis factor alpha-stimulating region of galactose-inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica* activates gamma interferon-primed macrophages for amebicidal activity mediated by nitric oxide. *Infection and Immunity*, 65(7), 2522–2527.
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö. İ., & Supuran, C. T. (2011). In vitro inhibition of human carbonic anhydrase I and II isozymes with natural phenolic compounds. *Chemical Biology & Drug Design*, 77(6), 494–499.
- Sepúlveda, B. (1982). Amebiasis: host-pathogen biology. *Reviews of Infectious Diseases*, 4(6), 1247–1253.
- Seydel, K. B., Li, E., Swanson, P. E., & Stanley, S. L. (1997). Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infection and Immunity*, 65(5), 1631–1639.
- Seydel, K. B., Smith, S. J., & Stanley, S. L. (2000). Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infection and Immunity*, 68(1), 400–402.
- Shakibaei, M., Csaki, C., Nebrich, S., & Mobasheri, A. (2008). Resveratrol suppresses interleukin-1beta-induced inflammatory signaling and apoptosis in human articular chondrocytes: potential for use as a novel nutraceutical for the treatment of osteoarthritis. *Biochemical Pharmacology*, 76(11), 1426–1439.
- Shakibaei, M., Harikumar, K. B., & Aggarwal, B. B. (2009). Resveratrol addiction: To die or not to die. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(1), 115–128.
- Sharma, S., Anjaneyulu, M., Kulkarni, S. K., & Chopra, K. (2006). Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin, attenuates diabetic nephropathy in rats. *Pharmacology*, 76(2), 69–75.
- Sharma, S., Chopra, K., Kulkarni, S. K., & Agrewala, J. N. (2007). Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. *Clinical and Experimental Immunology*, 147(1), 155–163.
- Shi, Y., Yang, S., Troup, S., Lu, X., Callaghan, S., Park, D. S., Yang, X. (2011). Resveratrol induces apoptosis in breast cancer cells by E2F1-mediated up-regulation of ASPP1. *Oncology Reports*, 25(6), 1713–1719.

- Shih, A., Zhang, S., Cao, H. J., Boswell, S., Wu, Y.-H., Tang, H.-Y., Lin, H.-Y. (2004). Inhibitory effect of epidermal growth factor on resveratrol-induced apoptosis in prostate cancer cells is mediated by protein kinase C- $\alpha$ . *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(11), 1355–1364.
- Simão, F., Matté, A., Matté, C., Soares, F. M. S., Wyse, A. T. S., Netto, C. A., & Salbego, C. G. (2011). Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by transient global cerebral ischemia in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(10), 921–928.
- Singh, J. P., & Kashyap, A. (1989). A comparative evaluation of percutaneous catheter drainage for resistant amebic liver abscesses. *American journal of surgery* (Vol. 158).
- Singh, N., Bhattacharya, S., & Paul, J. (2011). Entamoeba invadens: Dynamics of DNA synthesis during differentiation from trophozoite to cyst. *Experimental Parasitology*, 127(2), 329–333.
- Sisson, G., Jeong, J. Y., Goodwin, A., Bryden, L., Rossler, N., Lim-Morrison, S., Hoffman, P. S. (2000). Metronidazole activation is mutagenic and causes DNA fragmentation in Helicobacter pylori and in Escherichia coli containing a cloned H. pylori rdxA<sup>+</sup> (nitroreductase) gene. *Journal of Bacteriology*, 182(18), 5091–5096.
- Sloan, D. A., Fleiszer, D. M., Richards, G. K., Murray, D., & Brown, R. A. (1983). Increased incidence of experimental colon cancer associated with long-term metronidazole therapy. *The American Journal of Surgery*, 145(1), 66–70.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (2001). The world of resveratrol. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 492, 159–182.
- Squier, M. K., & Cohen, J. J. (1996). Calpain and cell death. *Cell Death and Differentiation*, 3(3), 275–283.
- Stanley, S. L. (2003). Amoebiasis. In *Lancet* (Vol. 361, pp. 1025–1034).
- Stanley, S. L., & Reed, S. L. (2001). Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. VI. Entamoeba histolytica: parasite-host interactions. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(6), G1049–G1054.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., & Witztum, J. L. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *The New England Journal of Medicine*, 320(14), 915–924.
- Strober, W. (2001). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. In *Current Protocols in Immunology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

- Su, H.-C., Hung, L.-M., & Chen, J.-K. (2006). Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 290(6), E1339–E1346.
- Subbaramaiah, K., Chung, W. J., Michaluart, P., Telang, N., Tanabe, T., Inoue, H., Dannenberg, A. J. (1998). Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(34), 21875–21882.
- Sun, A. Y., Wang, Q., Simonyi, A., & Sun, G. Y. (2010). Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 41, pp. 375–383).
- Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2007). Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes to Cells*, 12(2), 209–218.
- Talamas-Rohana, P., Schlie-Guzman, M. A., Hernandez-Ramirez, V. I., & Rosales- Encina, J. L. (1995). T-cell suppression and selective in vivo activation of TH2 subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220-kilodalton lectin. *Infection and Immunity*, 63(10), 3953–3958.
- Tantral, L., Malathi, K., Kohyama, S., Silane, M., Berenstein, A., & Jayaraman, T. (2004). Intracellular calcium release is required for caspase-3 and -9 activation. *Cell Biochemistry and Function*, 22(1), 35–40.
- Tay, J., Gutiérrez, M., Lara, R., & Velasco, O. (2003). *Entamoebosis o Amibiiasis en Parasitología Médica (63-79)*. México. D.F.: Méndez Editores.
- Tolomeo, M., Roberti, M., Scapozza, L., Tarantelli, C., Giacomini, E., Titone, L., Colomba, C. (2013). TTAS a new stilbene derivative that induces apoptosis in *Leishmania infantum*. *Experimental Parasitology*, 133(1), 37–43.
- Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Cimanga, K., & Vlietinck, a J. (1998). Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(1), 57–65.
- Tovar, J., Fischer, A., & Clark, C. G. (1999). The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology*, 32(5), 1013–1021.
- Tran, V. Q., Herdman, D. S., Torian, B. E., & Reed, S. L. (1998). The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. *The Journal of Infectious Diseases*, 177(2), 508–511.
- Tsukamoto, S., Kuma, A., & Mizushima, N. (2008). The role of autophagy during the oocyte-to-embryo transition. *Autophagy*, 4(8), 1076–1078.

- Tsutsumi, V., & Martinez-Palomo, A. (1988). Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *The American Journal of Pathology*, *130*(1), 112–119.
- Tsutsumi, V., Mena-Lopez, R., Anaya-Velazquez, F., & Martinez-Palomo, A. (1984). Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *The American Journal of Pathology*, *117*(1), 81–91.
- Tsutsumi, V., & Shibayama, M. (2006). Experimental amebiasis: A selected review of some in vivo models. *Archives of Medical Research*.
- Turner, N. A., & Eichinger, D. (2007). Entamoeba invadens: The requirement for galactose ligands during encystment. *Experimental Parasitology*, *116*(4), 467–474.
- Utrera-Barillas, D., Velazquez, J. R., Enciso, A., Cruz, S. M., Rico, G., Curiel-Quesada, E., Kretschmer, R. R. (2003). An anti-inflammatory oligopeptide produced by Entamoeba histolytica down-regulates the expression of pro-inflammatory chemokines. *Parasite Immunology*, *25*(10), 475–482.
- Vanamala, J., Radhakrishnan, S., Reddivari, L., Bhat, V. B., & Ptitsyn, A. (2011). Resveratrol suppresses human colon cancer cell proliferation and induces apoptosis via targeting the pentose phosphate and the talin-FAK signaling pathways-A proteomic approach. *Proteome Science*, *9*(1), 49.
- Velázquez-Domínguez, J., A. Marchat, L., López-Camarillo, C., Mendoza-Hernández, G., Sánchez-Espíndola, E., Calzada, F., Ramírez-Moreno, E. (2013). Effect of the sesquiterpene lactone incompitine A in the energy metabolism of Entamoeba histolytica. *Experimental Parasitology*, *135*(3), 503–510.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, *184*(1), 39–51.
- Villalba, J. D. A., Gómez, C., Medel, O., Sánchez, V., Carrero, J. C., Shibayama, M., & Pérez Ishiwara, D. G. (2007). Programmed cell death in Entamoeba histolytica induced by the aminoglycoside G418. *Microbiology*, *153*(Pt 11), 3852–3863.
- Villalba-M, J. D., Rojas, R., Gomez, C., Shibayama, M., Carrero, J. C., & G., D. (2007). Emetine produce Entamoeba histolytica death by inducing a programmed cell death. *American Journal of Infectious Diseases*, *3*(2), 110–114.
- Vivanco-Cid, H., Alpuche-Aranda, C., Wong-Baeza, I., Rocha-Ramírez, L. M., Rios-Sarabia, N., Estrada-Garcia, I., Isibasi, A. (2007). Lipopeptidephosphoglycan from Entamoeba histolytica activates human macrophages and dendritic cells and reaches their late endosomes. *Parasite Immunology*, *29*(9), 467–74.

- Vohra, H., Kaur, U., Sharma, A. K., Bhalla, V., & Bhasin, D. (2003). Effective human defense against *E. histolytica*: High amoebicidal activity of lymphocytes and monocytes in amoebic liver abscess patients until 3 months follow-up. *Parasitology International*, 52(3), 193–202.
- Voigt, H., Olivo, J. C., Sansonetti, P., & Guillén, N. (1999). Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. *Journal of Cell Science*, 112 (8), 1191–1201.
- Wallerath, T., Deckert, G., Ternes, T., Anderson, H., Li, H., Witte, K., & Förstermann, U. (2002). Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 106(13), 1652–1658.
- Walsh, J. A. (1986). Amebiasis in the world. *Archivos de Investigacion Medica*, 17 Suppl 1, 385–389.
- Wang, W., Keller, K., & Chadee, K. (1994). *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. *Immunology*, 83(4), 601–610.
- Wassmann, C., Hellberg, A., Tannich, E., & Bruchhaus, I. (1999). Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(37), 26051–26056.
- Watters, D. (1999). Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis. *Immunology and Cell Biology*, 77(3), 263–271.
- Whitehead, T. P., Robinson, D., Allaway, S., Syms, J., & Hale, A. (1995). Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clinical Chemistry*, 41(1), 32–35.
- Wiegrebe, W., Kramer, W. J., & Shamma, M. (1984). The Emetine Alkaloids. *Journal of Natural Products*, 47(3), 397–408.
- Wilson, C., Aboyade-Cole, A., Newell, O., Darling-Reed, S., Oriaku, E., & Thomas, R. (2007). Diallyl sulfide inhibits PhIP-induced DNA strand breaks in normal human breast epithelial cells. *Oncology Reports*, 17(4), 807–11.
- Wu, J. M., Hsieh, T.-C., & Wang, Z. (2011). Cardioprotection by resveratrol: a review of effects/targets in cultured cells and animal tissues. *American Journal of Cardiovascular Disease*, 1(1), 38–47.

- Wu, Y., Li, X., Zhu, J. X., Xie, W., Le, W., Fan, Z., Pan, T. (2011). Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease. *NeuroSignals*, 19(3), 163–174.
- Ximénez, C., Morán, P., Rojas, L., Valadez, A., & Gómez, A. (2009). Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1023–1032.
- Yan, L., & Stanley, S. L. (2001). Blockade of caspases inhibits amebic liver abscess formation in a mouse model of disease. *Infection and Immunity*, 69(12), 7911–7914.
- Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *New England Journal of Medicine*, 357(11), 1121–1135.
- Zhang, C. Y., Baffy, G., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., Lowell, B. B. (2001). Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity,  $\beta$  cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell*, 105(6), 745–755.
- Zhang, T., & Stanley, S. L. (1994). Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant protein derived from the 170-kilodalton surface adhesin of *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*.
- Zheng, Y., Liu, Y., Ge, J., Wang, X., Liu, L., Bu, Z., & Liu, P. (2010). Resveratrol protects human lens epithelial cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression. *Molecular Vision*, 16, 1467–1474.
- Zhou, J.-H., Cheng, H.-Y., Yu, Z.-Q., He, D.-W., Pan, Z., & Yang, D.-T. (2011). Resveratrol induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Chinese Medical Journal*, 124(11), 1695–1699.
- Zhou, R., Fukui, M., Choi, H. J., & Zhu, B. T. (2009). Induction of a reversible, non-cytotoxic S-phase delay by resveratrol: Implications for a mechanism of lifespan prolongation and cancer protection. *British Journal of Pharmacology*, 158(2), 462–474.
- Ziegler, U. (2004). Morphological Features of Cell Death. *News in Physiological Sciences*, 19(3), 124–128.
- Zolfaghari Enameh, R., Barker, H., Tolvanen, M. E. E., Ortutay, C., & Parkkila, S. (2014). Bioinformatic analysis of beta carbonic anhydrase sequences from protozoans and metazoans. *Parasites & Vectors*, 7(1), 38.
- Zykova, T. A., Zhu, F., Zhai, X., Ma, W. Y., Ermakova, S. P., Ki, W. L., Dong, Z. (2008). Resveratrol directly targets COX-2 to inhibit carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis*, 47(10), 797–805.



RESEARCH ARTICLE

# Resveratrol Induces Apoptosis-Like Death and Prevents *In Vitro* and *In Vivo* Virulence of *Entamoeba histolytica*

Jonnatan Pais-Morales, Abigail Betanzos, Guillermina García-Rivera, Bibiana Chávez-Munguía, Mineko Shibayama, Esther Orozco\*

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México DF, México

\* [esther@cinvestav.mx](mailto:esther@cinvestav.mx)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Pais-Morales J, Betanzos A, García-Rivera G, Chávez-Munguía B, Shibayama M, Orozco E (2016) Resveratrol Induces Apoptosis-Like Death and Prevents *In Vitro* and *In Vivo* Virulence of *Entamoeba histolytica*. PLoS ONE 11(1): e0146287. doi:10.1371/journal.pone.0146287

**Editor:** Matthew Bogyo, Stanford University, UNITED STATES

**Received:** September 28, 2015

**Accepted:** December 15, 2015

**Published:** January 5, 2016

**Copyright:** © 2016 Pais-Morales et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología ([www.conacyt.mx](http://www.conacyt.mx)), No. 220049 (EO), No. 4462 (AB), No. 226952 (JPM). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

*Entamoeba histolytica* causes amoebiasis, an infection that kills 100,000 individuals each year. Metronidazole and its derivatives are currently used against this protozoan, but these drugs present adverse effects on human health. Here, we investigated the effect of resveratrol (a natural compound) on *E. histolytica* trophozoites viability, as well as its influence on the parasite virulence. Trophozoites growth was arrested by 72  $\mu\text{M}$  resveratrol and the  $\text{IC}_{50}$  was determined as 220  $\mu\text{M}$  at 48 h. Cells appeared smaller, rounded and in clusters, with debris-containing vacuoles and with abnormally condensed chromatin. Resveratrol triggered reactive oxygen species production. It caused lipid peroxidation and produced phosphatidylserine externalization and DNA fragmentation this latter evidenced by TUNEL assays. It also provoked an increase of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, activated calpain and decreased superoxide dismutase activity, indicating that an apoptosis-like event occurred; however, autophagy was not detected. Cytopathic activity, phagocytosis, encystment and *in vivo* virulence were diminished dramatically by pre-incubation of trophozoites with resveratrol, evidencing that resveratrol attenuated the trophozoite virulence *in vitro*. Interestingly, after the inoculation of virulent trophozoites, animals treated with the drug did not develop or developed very small abscesses. Our findings propose that resveratrol could be an alternative to contend amoebiasis.

## Introduction

*Entamoeba histolytica* infects 50 million people and kills 100,000 individuals around the world every year [1]. This protozoan causes diarrhea and hepatic abscesses mainly in poor areas of tropical countries, but *E. histolytica* has a worldwide distribution [2,3]. Trophozoites are the invasive form of the parasite and they provoke the symptoms of the disease that could be lethal when it is not properly treated. Cysts are excreted with feces, contaminating water and food that could infect other people [4]. Trophozoites can be *in vitro* cultured, but cysts are not generated consistently in the laboratory, hampering the study of the molecular mechanisms that

underly the parasite life cycle, postponing the development of novel strategies to eradicate amoebiasis.

Amoebiasis is mainly treated by metronidazole (1-( $\beta$  hydroxyethyl-2-methyl-5-nitroimidazole) and its derivatives. These drugs are toxic to humans, causing nausea, dry mouth, headache and neurotoxicity [5]. In addition, metronidazole-resistant *E. histolytica* strains have been generated in the laboratory [6], pointing out the risk of metronidazole-resistant parasites emergence in endemic areas. Besides, metronidazole could be carcinogenic in mice and rats [7]. For these and other reasons, recently, aurano-fin and extracts from *Codiaeum variegatum* among other compounds have been proposed as alternative drugs against amoebiasis [8,9,10], evidencing that the development of new pharmacological strategies for amoebiasis defeat are still being a priority.

During infection, *E. histolytica* trophozoites can migrate from the gut to the liver, lungs, brain, genitals and other tissues in a metastasis model [11]. They present an active membrane exchange during tissues invasion and phagocytosis of target cells. Consequently, trophozoites exhibit high metabolic activity that could make them vulnerable to damage mediated by reactive oxygen species (ROS), as occurs in cancer cells [12].

Resveratrol (trans-3,4',5- trihydroxystilbene) is a phytoalexin, which has been described as harmless to mammals in concentration up of 2 g/Kg [13]. It is widely distributed in foods, such as grapes and nuts [14]. In normal cells, this compound has antioxidant properties and decreases the intracellular ROS production, either by direct scavenging or by activating enzymes that function as antioxidant defenses [15,16]. In contrast, in cancer cells and in some parasites, resveratrol triggers an excess of ROS that may kill them [12,17].

Resveratrol could be an attractive therapeutic option for amoebiasis, conducting trophozoites to ROS production and eventually provoking autophagy or apoptosis [18,19]. Autophagy has not been described in *E. histolytica*, but some proteins of the Atg8 conjugation system were already reported in this parasite [20]. On the other hand, apoptosis is characterized by DNA rupture and biochemical imbalance of some metabolic pathways, in which caspase and calpain enzymes play important roles [21]. In contrast to autophagy, apoptosis-like death has been studied in *E. histolytica* under stress conditions [22,23]. The parasite has non-canonical caspases [24]; and *E. histolytica* genes that could correspond to mammalian and yeast caspase orthologous, are highly divergent [21]. For these reasons apoptosis in *E. histolytica* is still recognized as an apoptosis-like phenomenon. However, this parasite possesses calpain-like enzymes [23,24] that could play similar roles to caspases.

We show here that resveratrol triggered apoptosis-like death in *E. histolytica* trophozoites, it decreased the *in vitro* virulence of trophozoites and when administered orally, decreased the formation of amoebic liver abscesses in hamsters inoculated with virulent trophozoites.

## Materials and Methods

### *E. histolytica* and *E. invadens* cultures

Trophozoites of *E. histolytica* (HM1:IMSS strain) and *E. invadens* were axenically cultured in TYI-S-33 medium at 37°C and 25°C, respectively [25]. Encystment of *E. invadens* was performed by incubation of trophozoites in LG47-TYI-S-3 medium [26] and cysts were stained by 0.01% calcofluor [27] and counted under epifluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i).

### Evaluation of the resveratrol effect on *E. histolytica* trophozoites

Trophozoites were incubated at 37°C with 72, 110, 220, 440 and 880  $\mu$ M of resveratrol in 0.4% ethanol in TYI-S-33 medium and cell number was determined each 12 or 24 h by hemocytometer counting. Diameter of trophozoites was measured directly in pictures. Viability was

evaluated by cell motility and shape, as well as by Trypan blue exclusion and by the WST-1 reagent (Roche) to measure cell proliferation [28]. Resveratrol half maximal lethal concentration (IC<sub>50</sub>) was calculated by Reed's equation [29]. As a positive control, we added 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the cultures [23] and 0.4% ethanol (the resveratrol vehicle) as internal control. Experiments presented here were performed at least three times in duplicate.

### Flow cytometry experiments

Size and cell granularity of resveratrol-treated trophozoites were determined by flow cytometry (Becton Dickinson FACSCalibur equipment), using a 488 nm Argon laser. Light scattered in the forward direction was roughly proportional to cell size, whereas light scattered at 90° angle was proportional to cell granularity. Data analysis was performed using the FlowJo software.

### Transmission electron microscopy (TEM)

Trophozoites were washed twice with PBS, pH 7.4, fixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, for 1 h and post-fixed for 60 min with 1% (w/v) osmium tetroxide. After dehydration with increasing concentrations of ethanol (70, 80, 90 and 100%) and propylene oxide, samples were embedded in Poly/bed<sup>®</sup> epoxy resin and polymerized at 60°C for 24 h. Thin sections (60–90 nm) were contrasted with uranyl acetate and lead citrate before being examined in a Philips Morgagni 268 D electron microscope (FEI Company).

### Measurement of ROS activity

ROS activity was calculated using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) reagent (Sigma-Aldrich). Trophozoites (1 x 10<sup>6</sup>) were incubated with 0.4 mM DCFDA for 15 min in the dark, washed with PBS pH 7.4 and analyzed by flow cytometry. Data analysis was performed using the FlowJo software.

### Lipid peroxidation assay

Total lipids were extracted from trophozoites by 1:2 chloroform:methanol (v/v), as described [30]. Lipid peroxidation was determined in lipids using the Peroxidect<sup>™</sup> kit (Sigma-Aldrich). Briefly, 100 µL of lipid extracts were incubated with 1 mL of Working Color Reagent at room temperature (RT) for 30 min and color intensity was measured by spectrophotometry at 560 nm. Standard curves were generated for each experiment using 0 to 16 nmol of *ter*-BuOOH (Sigma-Aldrich). Absolute methanol was used as a blank.

### Annexin V binding experiments

Trophozoites (1 x 10<sup>6</sup>) were washed with PBS, pH 7.4, and re-suspended in 500 µL of binding buffer containing Annexin V-FITC (eBioscience), mixed gently, incubated for 15 min at RT in the dark and washed twice with the binding buffer. Samples were counterstained by propidium iodide (PI) (10 µL/100µL) to analyze membrane permeability and calculate the number of cells with membrane rupture and those with membrane loss of asymmetry, then, they were mounted with Vecta-Shield medium (Vector Laboratories) and observed under a Carl Zeiss LSM 700 laser confocal microscope. In parallel, samples were subjected to flow cytometry. Data analysis was performed by Summit V4.3 software.

## Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assays

Trophozoites were fixed with 2% (v/v) formaldehyde for 60 min at RT, washed with PBS, pH 7.4, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 and 0.1% sodium citrate, for 2 min on ice, rinsed with PBS, and incubated in 50  $\mu$ L of TUNEL reaction mixture (In Situ Cell Death Detection kit, fluorescein) (Roche) for 60 min at 37°C in the dark. Trophozoites were washed twice and prepared for examination under laser confocal microscope, as described above. Additionally, samples were subjected to flow cytometry and data analysis was performed by FlowJo software.

## Quantification of cytosolic $\text{Ca}^{2+}$

Trophozoites ( $1 \times 10^6$ /mL) were washed twice with buffer I (116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5.5 mM D-glucose and 50 mM HEPES, pH 7.0), re-suspended in loading buffer (116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5.5 mM D-glucose, 1.5% sucrose, 50 mM HEPES, pH 7.4), and 6  $\mu$ M Fluo-4 AM (Molecular Probes), incubated for 1 h at 37°C with occasional agitation and washed with ice-cold buffer I. Then, 250  $\mu$ L of the trophozoite suspension were diluted into 2.4 mL of buffer I. Fluo-4 AM was measured using 494 and 506 nm emission and excitation filters, respectively, in a Perkin Elmer fluorimeter.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was determined using the formula:  $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \left( \frac{F_2 - F_3}{F_4 - F_1} \right)$ , where F1 is the fluorescence signal obtained from the entire cell, F2 represents the fluorescence signal after addition of 1 mM EGTA, F3 is the fluorescence after cell lysis with 0.04% Triton X-100 in 30 mM Trizma base and F4 is the fluorescence after adding 4 mM  $\text{CaCl}_2$ . The dissociation constant ( $K_d$ ) of fluo-4 AM was taken at 345 nM, according to the manufacturer instructions.

## Calpain activity

The polypeptide Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Sigma-Aldrich) was used to assess calpain activity [31]. Briefly, 40  $\mu$ L of trophozoites protein extracts (1 mg protein/mL) were added to 160  $\mu$ L of 50  $\mu$ M Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC in 100 mM Tris/HCl, 145 mM NaCl, pH 7.3. Then, calpain activity was assayed with 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  7-amino-4-methylcoumarin (AMC) (Sigma-Aldrich). Released AMC was measured by fluorescence spectroscopy using 360 nm excitation and 430 nm emission filters. Standard curves were generated for each experiment using AMC of known concentrations (0–25  $\mu$ M). Calpain activity was expressed as pmol of AMC released per mg of total protein at 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ .

## Superoxide dismutase activity (SOD)

SOD activity was determined using SOD Assay Kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Briefly, trophozoites protein extracts (1 mg/mL) in 200  $\mu$ L of working solution and 20  $\mu$ L of working solution enzyme were incubated 20 min at 37°C. Color intensity was measured by spectrophotometry at 450 nm. Standard curves were generated for each experiment using SOD (Sigma-Aldrich) of known concentrations (0–10 U/mg). Dilution buffer was used as a blank.

## Erythrophagocytosis assays

Freshly obtained human erythrocytes were washed and incubated for 5, 10 and 15 min at 37°C with trophozoites pre-incubated for 12 h in 110  $\mu$ M resveratrol or with 0.4% ethanol in TY1-S-33 medium (30:1 ratio). Afterwards, trophozoites were incubated with distilled water for 10 min to lyse the adhered, but not ingested erythrocytes. Samples were fixed with 2.5%

glutaraldehyde for 30 min at RT. Erythrocytes were stained with diaminobenzidine (8.4 mM) to facilitate counting [32] of ingested erythrocytes. One hundred resveratrol-treated or untreated trophozoites were selected at random to be counted in duplicate experiments that were performed at least three independent times. Means of erythrocytes in 100 trophozoites was obtained for each point and data were analyzed by ANOVA. Before these experiments, trophozoites were examined under the light microscope to verify their shape and movement. Viability was also quantified by Trypan blue exclusion and WST-1 assays. Only cultures with viability greater than 95% were used.

### Cytopathic effect of trophozoites on cell culture monolayers

Confluent MDCK cell monolayers were incubated with *E. histolytica* trophozoites (20:1 ratio) at 37°C in an environment of 5% CO<sub>2</sub>, during 1 h. Then, epithelial cells were exhaustively washed with cold PBS and the remaining cells in the plates were fixed with 2.5% glutaraldehyde and stained with 1% methylene blue for 10 min. Destruction of MDCK monolayers was measured by color intensity of the remaining cell monolayer, in comparison with control MDCK, that were cells not incubated with trophozoites. Measurements were performed using the ImageJ software.

### Effect of resveratrol on the *in vivo* virulence of *E. histolytica* trophozoites

To evaluate the effect of resveratrol on the production of amoebic liver abscesses in animals, we performed three types of experiments, using seven or eight animals per group and a similar number for controls. Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*, 4 weeks old, 100 ± 5 g each animal) were anesthetized with 45 mg/Kg of sodium pentobarbital (Anestesal, Pfizer) and intraperitoneally inoculated with 3 × 10<sup>6</sup> trophozoites with more than 95% viability. For the first assay, trophozoites were pre-treated with 110 μM resveratrol, for 12 h. Untreated or ethanol-treated trophozoites were used as controls. For the second type of experiments, animals were treated with 30 mg of resveratrol (100 mg/Kg), orally administrated each 8 h, 2 days before and 10 days after inoculation of virulent trophozoites. For the third type of experiments animals were inoculated with virulent trophozoites and after 96 h livers were examined to corroborate the presence of amoebic hepatic abscesses in one of the control groups. Other group was treated with 100 mg/Kg resveratrol as described started the treatment protocol after 96 h inoculation of trophozoites. As controls, other animals were treated with water, 50 μl of ethanol or 20 mg/Kg metronidazole each eight hours, following a similar protocol. Ten days after challenge, hamsters were sacrificed by an overdose of sodium pentobarbital according to the guidelines of the 2000 AVMA Panel of Euthanasia. Livers and abscesses were dissected and weighted. Liver damage was calculated as the weight of abscesses formed, divided by the weight of whole liver before the injured areas were removed.

### Tissue collection and processing

Liver samples were fixed in 10% phosphate-buffered formalin and processed for conventional embedding paraffin, then, 4–6 μm thick sections were stained with hematoxylin and eosin [33]. For immunohistochemistry assays, livers were excised, fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and embedded in paraffin. Thin sections (4–6 μm) were obtained deparaffinized and treated with 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at RT for 60 min to remove endogenous peroxidase. Sections were incubated first with normal goat serum at RT for 60 min and ON at 4°C with a rabbit antibody (1:100) produced by Invitrogen, against a 16 residues polypeptide (431-KYHSNSTYVQFYNHHTI-446) obtained from the EhCP112 protease [34]. Then, preparations were incubated with goat anti-rabbit IgG biotinylated-labeled antibody (1:300; Molecular Probes), followed by incubation

with streptavidin–biotin–peroxidase complex (Zymed) and diaminobenzidine (DAB) containing 0.04% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Antibody binding was revealed by hematoxylin. Rabbit pre-immune serum was used as a negative control. Samples were analyzed using a light microscope (Nikon Eclipse 80i).

## Ethic Statements

The Center for Research and Advanced Studies (CINVESTAV) fulfill the standard of the Mexican Official Norm (NOM-062-ZOO-1999) “Technical Specifications for the Care and Use of Laboratory Animals” based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals “The Guide”, 2011, NRC, USA with the Federal Register Number BOO.02.03.02.01.908, awarded by the National Health Service, Food Safety and Quality (SENASICA) belong to the Animal Health Office of the Secretary of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food (SAGARPA), an organization that verifies the state compliance of such NOM in Mexico. The Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC/ethics committee) from CINVESTAV as the regulatory office for the approval of research protocols involving the use of laboratory animals and in fulfillment of the Mexican Official Norm have reviewed and approved the animal care and handle of hamsters used in the virulence assays (Protocol Number 0313–06, CICUAL 001).

## Statistical analysis

The values of all experiments were expressed as mean ± standard error of three independent experiments, each in duplicate. Trophozoites treated with resveratrol or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were compared with ethanol-treated or untreated trophozoites using the paired Student’s-test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001). In experiments comparing more than two groups we used one-way ANOVA test. Statistical analysis was carried out using the Graphpad Prism V 5.01 software.

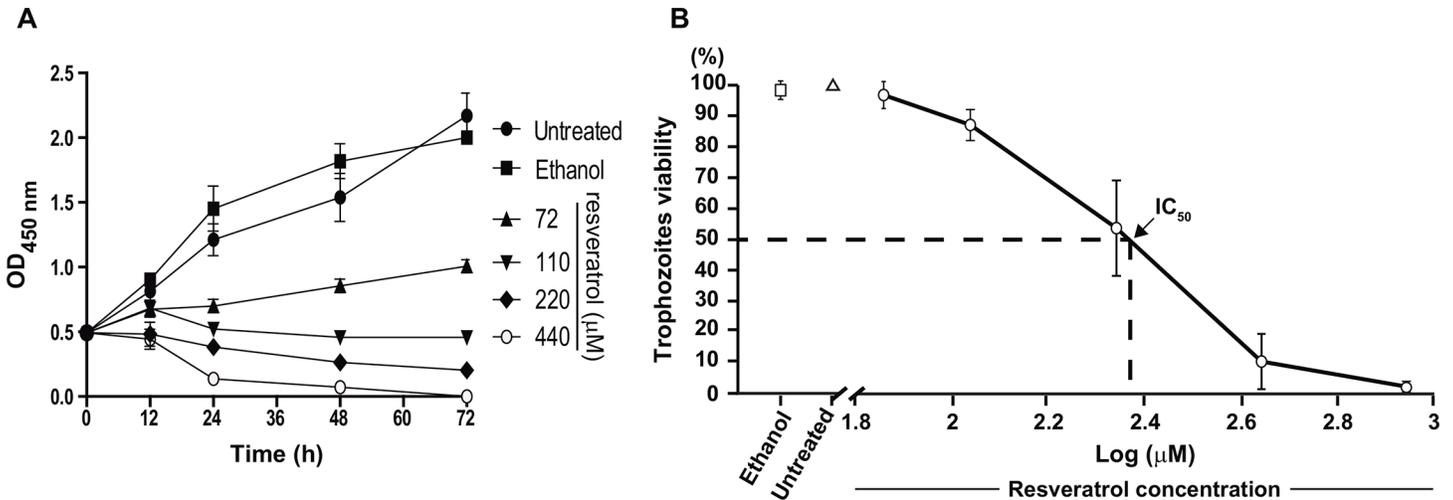
## Results

### *E. histolytica* trophozoites are sensitive to resveratrol

Damage produced by resveratrol on *E. histolytica* trophozoites was time- and dose- dependent (Fig 1). Cell growth was arrested by 72 μM resveratrol after 12 h incubation, but this dose had little effect on cell viability, cellular shape and motility. After 48 h incubation with 220 μM resveratrol, 50% of trophozoites appeared death, whereas more than 90% were killed by 440 and 880 μM, respectively (Fig 1). Thus, the IC<sub>50</sub> was determined as 220 μM and it was used for the majority of the experiments presented here. Trophozoites incubated for the same periods with 0.4% ethanol, the vehicle used for the drug, exhibited 100% viability (Fig 1).

Under light microscopy, untreated and ethanol-treated trophozoites appeared pleomorphic and with diameters between 16 and 26 μm (mean: 21 μm). After 12 h incubation with IC<sub>50</sub> resveratrol, 50% of the cells presented diameters between 14 and 16 μm (Fig 2A and 2B). However, more than 98% of trophozoites remained alive and they excluded Trypan blue. At 24 and 48 h, resveratrol-treated trophozoites exhibited 75 and 50% viability, respectively, they were observed rounded, smaller (8 to 12 μm in diameter, respectively), detached from substrate, clustered and with poor motility (Figs 1A, 2A and 2B), whereas untreated and ethanol-treated cells reached confluence (Fig 2A).

The trophozoite shrinkage produced by 48 h incubation with resveratrol was confirmed by flow cytometry, measuring cell size by the decrease in forward scatter, and cell granularity by light scattered at 90° angle in side scatter. Resveratrol-treated trophozoites showed a reduction in cell size (Fig 2C), confirming the data obtained above (Fig 2B). Eighty percent of resveratrol-treated cells were located in quadrants (Q) 1 and 4, where the smaller cells were sorted (Fig



**Fig 1. Effect of resveratrol in *E. histolytica* trophozoites.** **A)** Trophozoites growth was measured at different times by spectrophotometry using the WST-1 reagent. **B)** Viability of trophozoites after 48 h incubation with different concentrations of resveratrol was evaluated under light microscope by Trypan blue exclusion. IC<sub>50</sub> was calculated as described in Materials and Methods. Values represent the mean ± standard error of three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0146287.g001

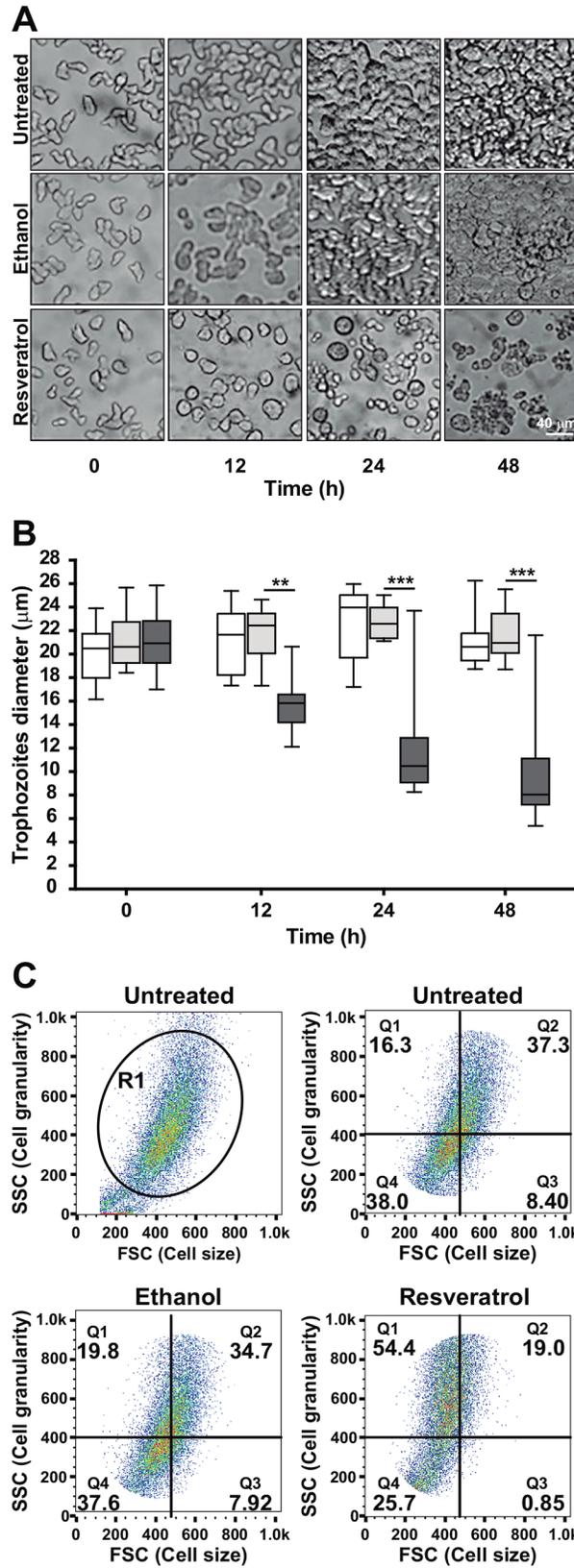
2C); whereas, 57.4% of ethanol-treated trophozoites were dispersed there (Fig 2C). In addition, 73.4% of resveratrol-treated trophozoites were found in Q1 and Q2; corresponding to cells with a higher granularity, whereas 54.5% of the ethanol-treated cells were located also in these Qs (Fig 2C). These results confirmed that resveratrol shrank trophozoites and produced granularity in their cytoplasm.

### Resveratrol-treated trophozoites present ultrastructural alterations

The ultrastructural alterations provoked by resveratrol in trophozoites were studied by TEM. Resveratrol-treated trophozoites appeared rounded and with less cytoplasmic vacuoles, but with a large number of debris-containing vacuoles. They presented granularity and a higher electrodensity in the cytoplasm, their chromatin appeared diffuse and distributed in the whole nucleus. In comparison, untreated and ethanol-treated trophozoites exhibited normal ultrastructure with the chromatin condensed close to the inner nuclear membrane (Fig 3). Trophozoites incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, used as positive control, also exhibited ultrastructural alterations (Fig 3). The ultrastructural damage of trophozoites confirmed the results obtained by flow cytometry (Fig 2) and suggested that resveratrol-treated trophozoites were under stress. Besides, the presence of debris-containing vacuoles suggested autophagy, whereas the abnormally condensed chromatin could imply that resveratrol provokes apoptosis-like death.

### Resveratrol triggers oxidative stress in trophozoites

Balance between ROS production and anti-oxidant enzymes mediates the fate of a cell. Depending on the extent of oxidative damage, cells will survive or will die by necrosis, autophagy or apoptosis. The high ROS production, such as superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydroxyl radicals (HO<sup>•</sup>) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), causes injury to lipids, DNA and proteins [35]. To evaluate ROS production in resveratrol-treated trophozoites, we used the DCFDA reagent that after diffusion into the cell is deacetylated by esterases, generating DCF, which is oxidized by ROS [36]. These experiments showed that 28% of resveratrol-treated trophozoites were DCF-positive, whereas only 5% of ethanol-treated and untreated cells were DCF-positive; and 93% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated trophozoites were positive (Fig 4A). Results suggested that resveratrol generated

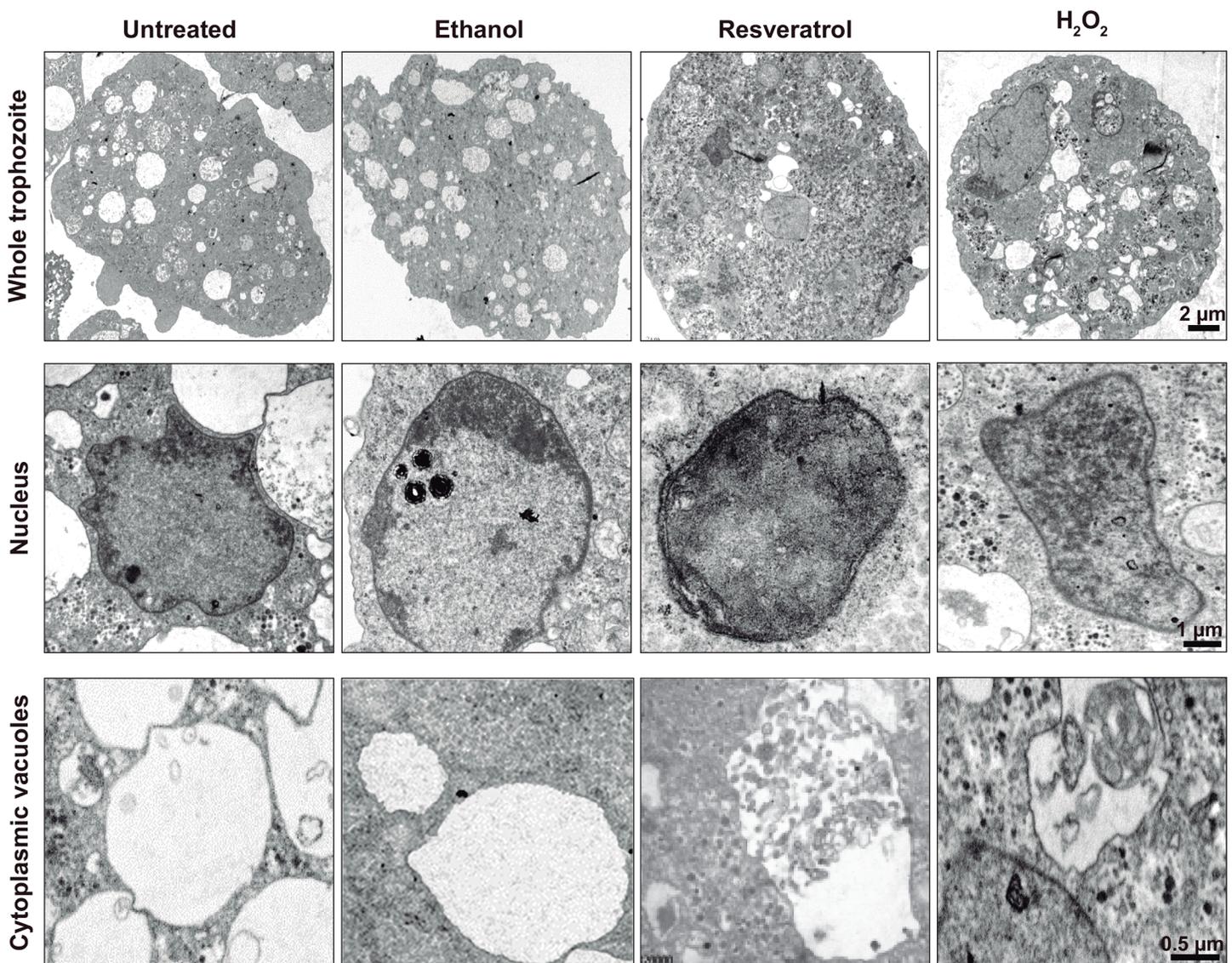


**Fig 2. Effect of resveratrol in trophozoites morphology.** **A)** Light microscopy images of untreated and IC<sub>50</sub> resveratrol-treated trophozoites. **B)** Size of trophozoites during different incubation times measured in images obtained by light microscopy. Boxes represent 50% of population containing the median of three independent experiments. Bars indicate the maximum and minimum sizes of the other 50%. □ Untreated trophozoites. ■ 0.4% ethanol-treated trophozoites. ■ IC<sub>50</sub> resveratrol-treated trophozoites. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. **C)** Flow cytometry of size (forward scatter) and granularity (side scatter) of trophozoites incubated 48 h with IC<sub>50</sub> resveratrol. R1 represents the gate of trophozoites population selected for these experiments. Untreated and 0.4% ethanol-treated trophozoites were used as controls.

doi:10.1371/journal.pone.0146287.g002

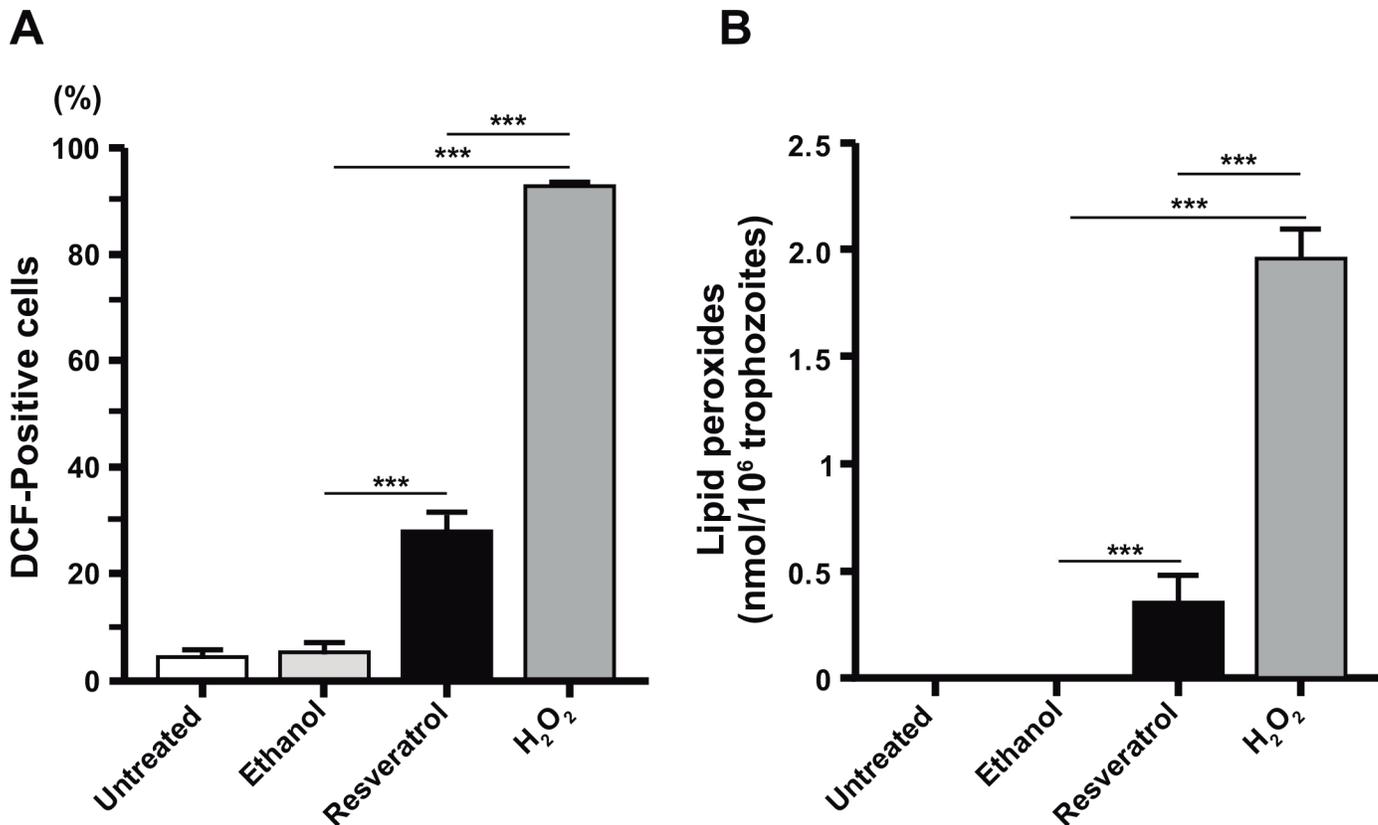
ROS production in trophozoites. However, we are aware that the only way to conclusively say that ROS kill amoebae is to use a ROS antagonist to show that it protects amoebae from resveratrol-induced damage.

ROS production affects, among other molecules, polyunsaturated fatty acids in cell membranes, inducing lipid peroxidation [37]. We investigated whether resveratrol affected



**Fig 3. Ultrastructure of resveratrol-treated trophozoites.** TEM of untreated, 0.4% ethanol-, IC<sub>50</sub> resveratrol- and 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated trophozoites.

doi:10.1371/journal.pone.0146287.g003



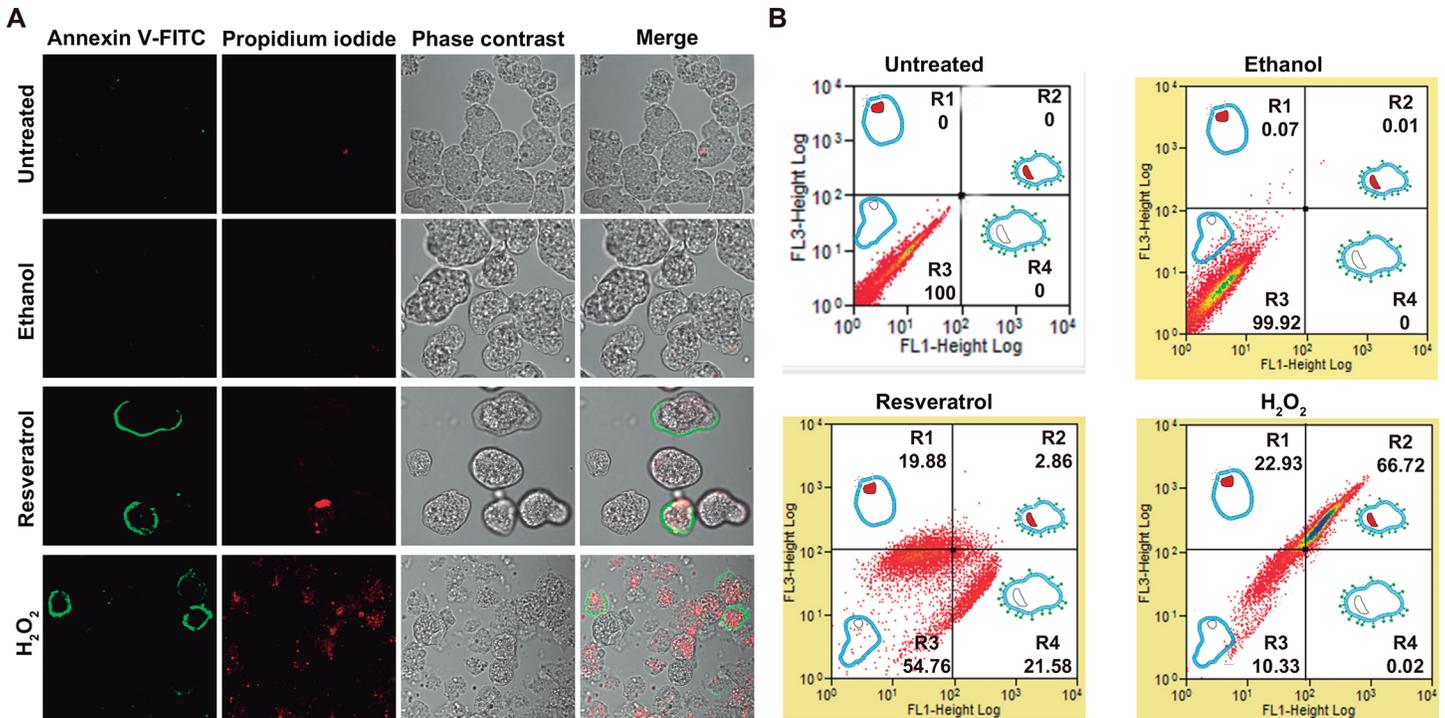
**Fig 4. Oxidative stress produced by resveratrol in trophozoites. A)** ROS production in trophozoites untreated or treated with IC<sub>50</sub> resveratrol. Quantification was performed by flow cytometry using the DCFDA reagent. **B)** Lipid peroxides in total lipids of trophozoites. 0.4% ethanol- and 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated trophozoites were used as controls. Values represent the mean ± standard error of three independent experiments. \*\*\*p<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0146287.g004

trophozoites lipids. The spectrophotometry analysis of total lipids (corresponding to 1 x 10<sup>6</sup> trophozoites), showed that drug-treatment produced 0.375 nmol of lipid peroxides; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treatment generated 1.8 nmol; and lipid peroxides were not detect in untreated and ethanol-treated trophozoites (Fig 4B). These experiments, together with the ROS production assays, strengthen the hypothesis that resveratrol provoked oxidative stress in trophozoites and damaged cell membranes lipids.

### Phosphatidylserine (PS) is externalized in *E. histolytica* trophozoites treated with resveratrol

In eukaryotes, ROS production can conduct cells to apoptosis, characterized by cellular shrinkage, PS externalization, chromatin condensation, DNA fragmentation and caspases and calpain activation, among other events [37]. As PS externalization is used as a marker for apoptosis, we investigated whether PS was externalized in resveratrol-treated trophozoites, using Annexin V which has a high affinity for PS. Laser confocal images and flow cytometry experiments of non-permeabilized trophozoites revealed that Annexin V-FITC did not detect PS in untreated and ethanol-treated trophozoites. However, 21.58% of resveratrol-treated trophozoites exhibited PS exposed at the external plasma membrane, without showing plasma membrane rupture, as it was suggested by the trophozoites that were not stained by PI. However, 2.86% were stained by PI, suggesting loss of plasma membrane asymmetry (Fig 5A and 5B). These results could suggest that trophozoites that were not stained by PI, but exposed PS, are in an early apoptosis like event,



**Fig 5. PS externalization produced by resveratrol in trophozoites.** **A)** Confocal microscopy of untreated or IC<sub>50</sub> resveratrol-treated trophozoites incubated with Annexin V-FITC and PI. Merge: fluorescence channels and phase contrast. **B)** Flow cytometry analysis of trophozoites incubated with Annexin V-FITC and PI. 0.4% ethanol- and 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated trophozoites were used as controls. Q1: Trophozoite scheme with nucleus stained (red) representing entrance of PI. Q2: Trophozoite scheme representing PI stained (nucleus) and Annexin V plasma membrane stained. Q3: Trophozoite scheme representing plasma membrane integrity. Q4: Trophozoite scheme representing Annexin V (loss of plasma membrane asymmetry) stained without nucleus stained.

doi:10.1371/journal.pone.0146287.g005

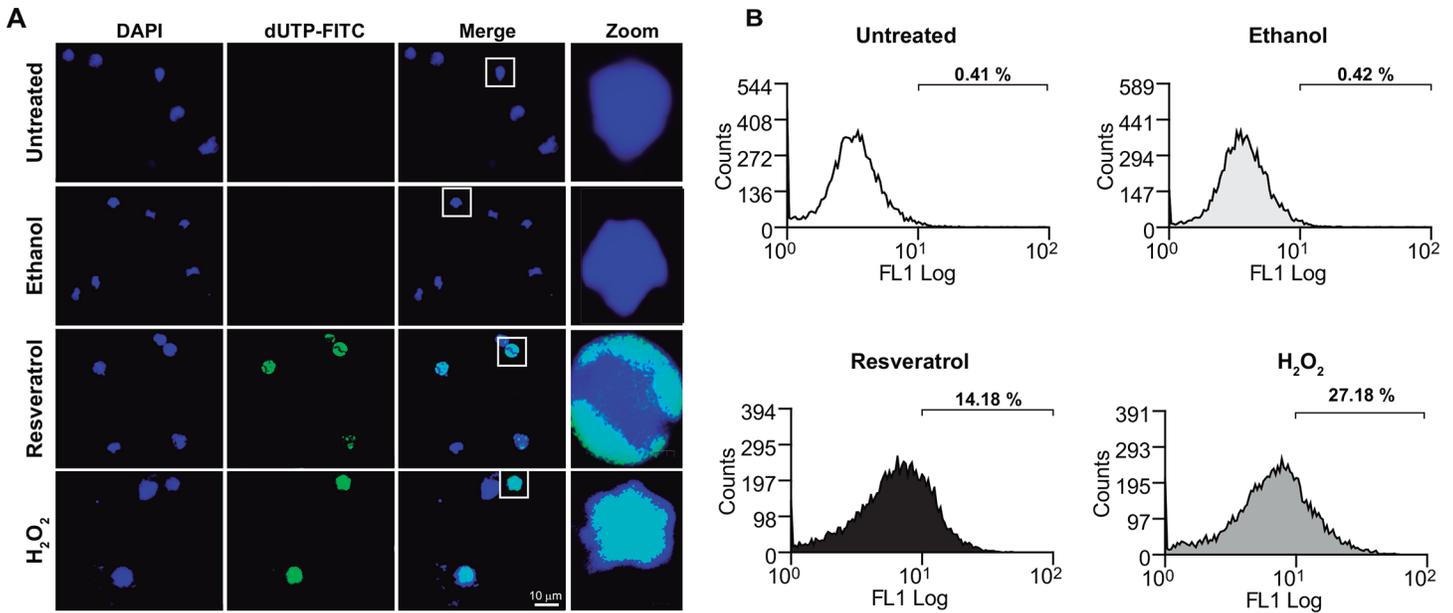
whereas those that exhibited the nuclei stained by PI and exposed PS in the plasma membrane are in late apoptosis. By flow cytometry experiments, 66.72% of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated trophozoites exposed PS (Fig 5B), but Annexin V was not detected in untreated and ethanol-treated trophozoites. These results suggested that resveratrol induced apoptosis-like death in *E. histolytica*.

### Resveratrol-treated trophozoites present DNA fragmentation

To gain more evidence on resveratrol effect in trophozoites, we evaluated DNA integrity in cells treated with the drug. Confocal images showed that resveratrol- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated trophozoites exhibited a positive TUNEL signal (Fig 6A). In contrast, untreated and ethanol-treated cells showed a nuclear homogeneous DAPI staining, and no evidence for TUNEL was detected (Fig 6A). Flow cytometry assays showed that 14.18% of resveratrol-treated cells were positive for DNA fragmentation. Only 0.4% of untreated and ethanol-treated trophozoites presented DNA damage, while H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoked DNA rupture in 27.18% of trophozoites (Fig 6B). These results, together with the PS externalization assays, strongly suggested that resveratrol induces apoptosis-like death in *E. histolytica* trophozoites.

### Resveratrol increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and calpain activity, but diminishes SOD activity

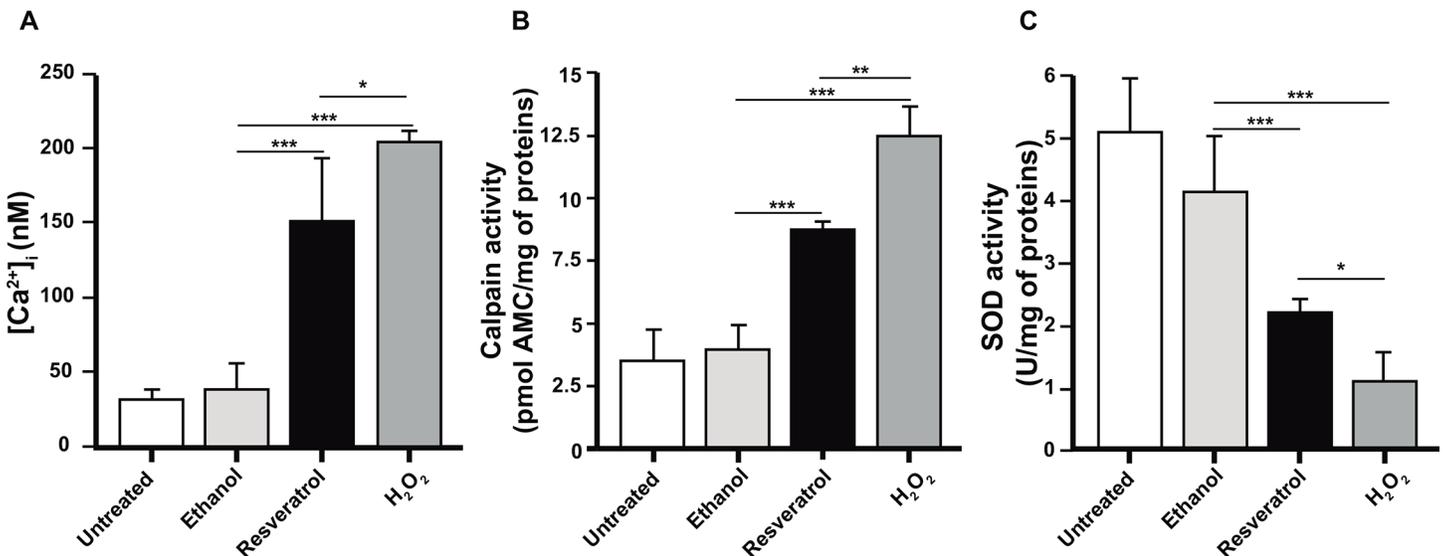
Oxidative stress and apoptosis produce biochemical changes that irreversibly damage proteins involved in calcium homeostasis. Thus, we used Fluo-4AM, a compound that binds Ca<sup>2+</sup>, to



**Fig 6. TUNEL assays in resveratrol-treated trophozoites.** **A)** TUNEL assays of untreated or IC<sub>50</sub> resveratrol-treated trophozoites using dUTP-FITC and visualized under the laser confocal microscope. Nuclei were stained with DAPI. Squares in merge images were magnified in the zoom panels. **B)** Flow cytometry analysis of dUTP-FITC-treated trophozoites. 0.4% ethanol- and 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated trophozoites were used as controls.

doi:10.1371/journal.pone.0146287.g006

explore whether Ca<sup>2+</sup> levels augmented in resveratrol-treated trophozoites. Fluorescence spectroscopy assays evidenced that cytosolic Ca<sup>2+</sup> increased to 149 nM in resveratrol-treated trophozoites, in comparison with 31 and 39 nM showed by untreated and ethanol-treated cells, respectively. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated trophozoites increased Ca<sup>2+</sup> to 204 nM (Fig 7A).



**Fig 7. Biochemical changes in resveratrol-treated trophozoites.** **A)** Cytosolic Ca<sup>2+</sup> was measured in extracts of untreated or IC<sub>50</sub> resveratrol-treated trophozoites, using Fluo-4 AM. **B)** Calpain activity of trophozoites extracts incubated with Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC was measured by fluorescence spectroscopy. **C)** SOD activity of trophozoite extracts was monitored by spectrophotometry using the SOD kit. 0.4% ethanol- and 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated trophozoites were used as controls. Values represent the mean ± standard error of three independent experiments. \*\*\*p<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0146287.g007

In eukaryotes, caspases and calpain activation occurs when cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration increases [37]. As *E. histolytica* has no canonical caspases, but has calpain-like enzymes [23,24], we investigated whether calpains were activated in resveratrol-treated trophozoites. Total extracts from trophozoites were incubated with Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC compound, which releases AMC as a result of calpain activity. These experiments evidenced that calpain released 8 pmol AMC/mg of total proteins in resveratrol-treated cells, whereas 3.7 pmol/mg were released in untreated trophozoites (Fig 7B).

SOD constitutes the first line of defense against ROS and converts  $\text{O}_2^-$  in peroxide and molecular oxygen. We measured SOD activity in trophozoites extracts utilizing the WTS-1 reagent of the SOD assay. Resveratrol-treated trophozoites presented 2 U/mg of SOD, whereas untreated and ethanol-treated trophozoites presented 5 and 4 U/mg, respectively (Fig 7C). All our biochemical experiments confirmed that resveratrol induced apoptosis-like death in *E. histolytica* trophozoites.

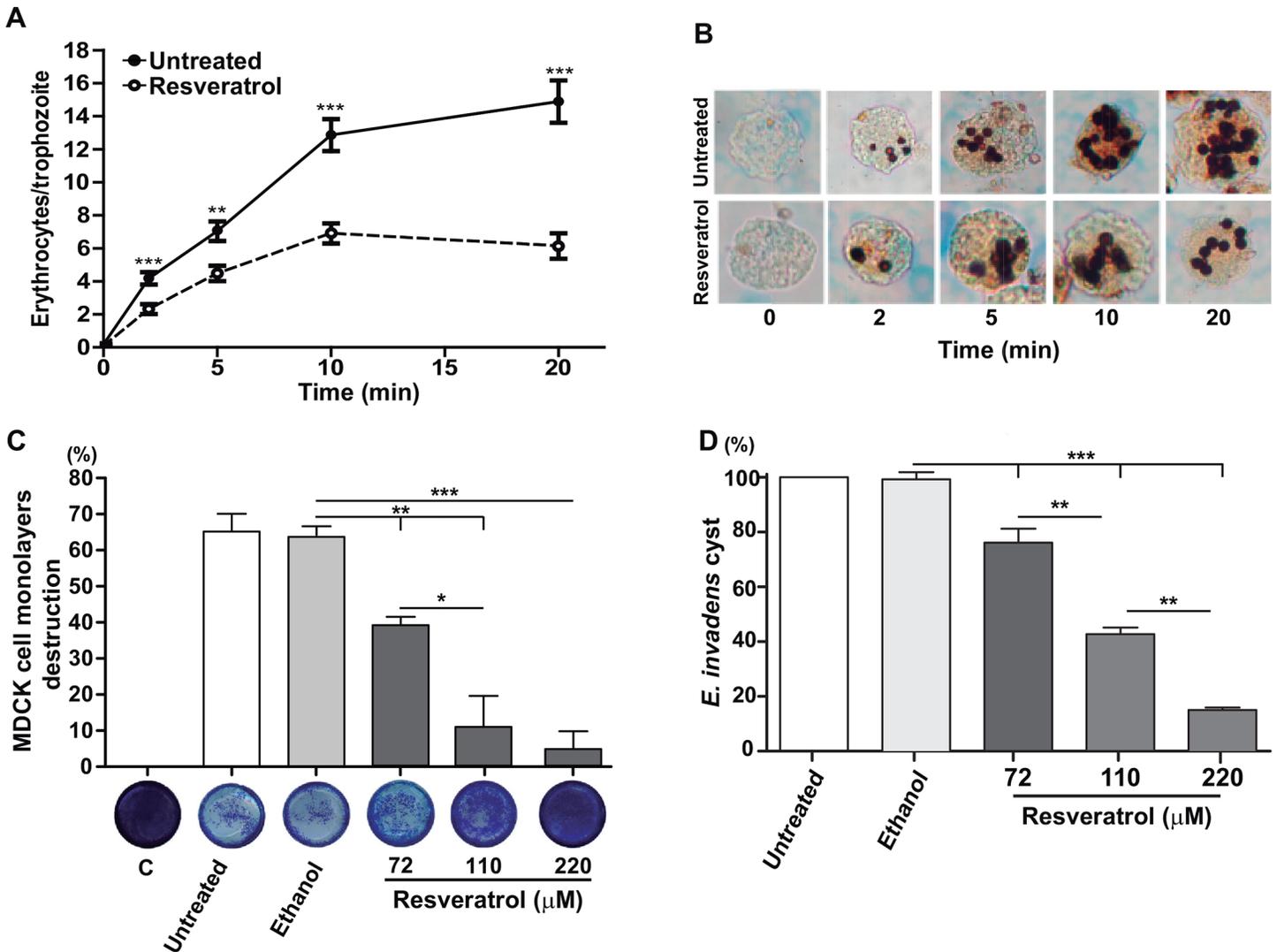
### Resveratrol affects the *in vitro* virulence of *E. histolytica* and prevents encystment of *E. invadens*

Trophozoites are professional phagocytes that ingest erythrocytes, epithelial cells and bacteria as nutrition sources. Additionally, phagocytosis is considered as a virulence factor in *E. histolytica* [38]. Thus, we evaluated the erythrophagocytosis rate of trophozoites that were incubated with 110  $\mu\text{M}$  resveratrol for 12 h and whose viability was more than 95%. The number of ingested erythrocytes was counted in 100 trophozoites that were incubated with erythrocytes for different times. Results showed that the rate of phagocytosis diminished 50% in trophozoites pre-treated with 110  $\mu\text{M}$  resveratrol for 12 h (Fig 8A), reaching a plateau 10 min after incubation with erythrocytes. Interestingly, the majority of trophozoites ingested erythrocytes, as another evidence of their viability (Fig 8B).

We also measured the ability of resveratrol-treated trophozoites to destroy MDCK cell monolayers. After incubation with MDCK cells for one hour, resveratrol-treated trophozoites (72, 110 and 220  $\mu\text{M}$  for 12 h) destroyed 40, 12 and 5% of cell monolayers, respectively, whereas untreated and ethanol-treated trophozoites destroyed 65% (Fig 8C).

Cysts are the infective phase of *E. histolytica*, and if cysts are not produced, the disease can be controlled because transmission from individual to individual does not occur. However, it is not possible to consistently obtain *E. histolytica* cysts in the laboratory. Thus, to study the effect of resveratrol on encystment, we induced *E. invadens* trophozoites to encystment [39]. Number of cysts formed in encystment medium was counted after calcofluor staining. Percentage of cysts produced was calculated taken as 100% the cyst number produced in untreated and ethanol-treated cultures. Results showed that resveratrol inhibited cyst formation in a dose-response model (Fig 8D).

Hamsters are one of the most used animal models to produce amoebic liver abscess and study the events related to this infection [33]. We investigated the effect of resveratrol on the *in vivo* virulence of *E. histolytica* trophozoites inoculated in hamsters. The viability of resveratrol-treated trophozoites (incubated for 12 h with 110  $\mu\text{M}$  resveratrol, washed and then incubated with fresh medium) was analyzed by measuring cell proliferation using the WST-1 reagent, before the experiments were performed. Proliferation indexes of resveratrol-treated trophozoites and untreated trophozoites were similar, indicating that 12h of resveratrol-treatment did not affect cell viability. However, a cytostatic effect was observed in trophozoites that remained in the presence of 110  $\mu\text{M}$  resveratrol during 72 h (Fig 9A). Interestingly, incubation for 12 h with resveratrol, followed by washing out of the drug, completely abolished the ability of trophozoites to produce hepatic abscesses in hamsters. Hamsters' livers exhibited normal size and



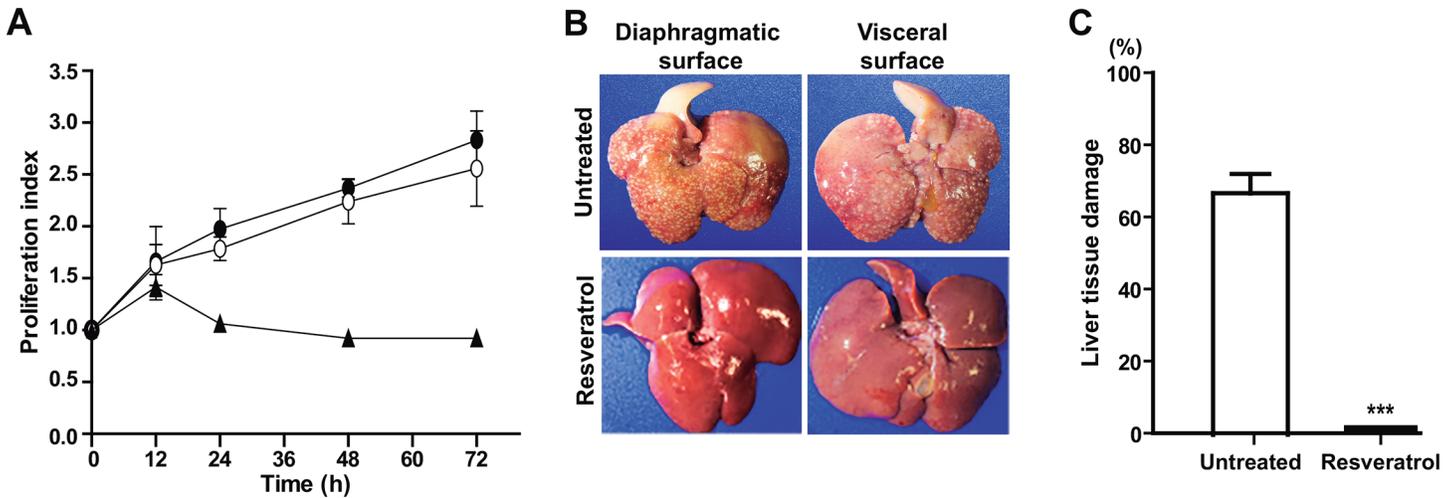
**Fig 8. Effect of resveratrol in *in vitro* virulence of *E. histolytica* trophozoites and in *E. invadens* encystment.** **A)** Ingested erythrocytes after different incubation times with untreated or resveratrol-treated (110 μM, 12 h and washing out) trophozoites. Values represent the mean ± standard error of three independent experiments. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. **B)** Representative images of trophozoites with ingested erythrocytes at different incubation times. **C)** Destruction of MDCK cell monolayers incubated with untreated or resveratrol-treated (110 μM, 12 h and washing out) trophozoites. Bottom: representative images of MDCK monolayers incubated with trophozoites and stained with methylene blue. C: MDCK cells that were not in contact with trophozoites. 0.4% ethanol-treated trophozoites were used as positive controls. Values represent the mean ± standard error of three independent experiments. \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001. **D)** Cysts formed were counted under the epifluorescence microscope and number of cysts in untreated cells was taken as 100%. Values represent the mean ± standard error of three independent experiments., \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0146287.g008

color (Fig 9B) and all internal organs presented normal appearance without any evident damage. In contrast, seven days after challenge, 100% of the animals inoculated with untreated trophozoites developed large abscesses (Fig 9B and 9C).

### Resveratrol presents amoebicidal activity in hamsters inoculated with virulent trophozoites

Next, we evaluated the amoebicidal activity of resveratrol on animals (100 mg/Kg) inoculated with virulent trophozoites. Resveratrol (30 mg/Kg each 8 h, 2 days before and 10 days after inoculation) was orally administrated to hamsters intraportally inoculated with  $3 \times 10^6$

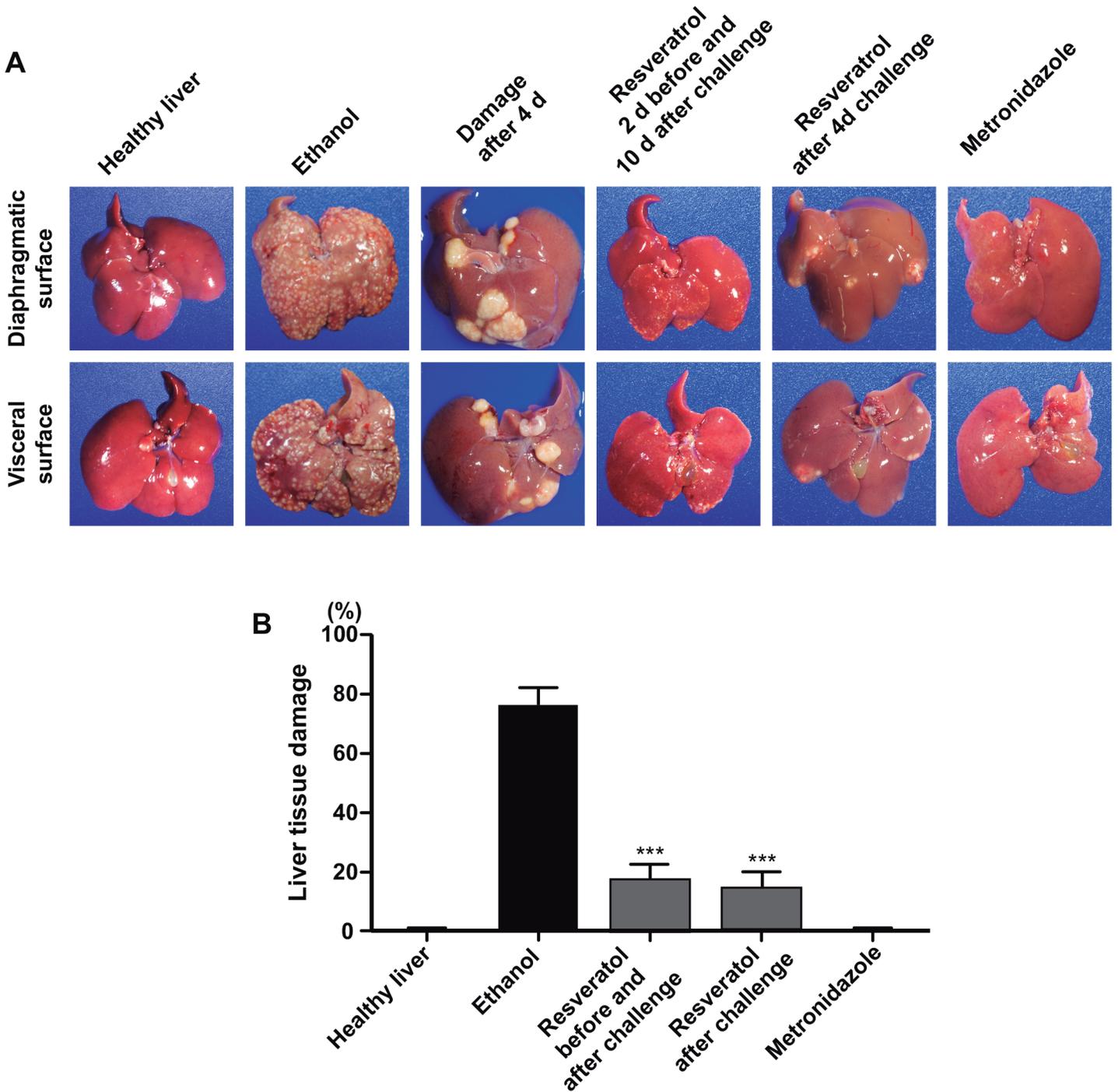


**Fig 9. Hepatic abscess formation by resveratrol-treated and untreated trophozoites.** **A)** Trophozoites were incubated with 110  $\mu$ M resveratrol for 12 h, then they were changed to fresh TYI-S-33 medium without resveratrol and cell proliferation was measured at different times by spectrophotometry using the WST-1 reagent. -●- Untreated trophozoites. -○- Trophozoites pretreated with 110  $\mu$ M resveratrol for 12 h and then incubated in fresh TYI-S-33 medium. -▲- Trophozoites cultured in the presence of 110  $\mu$ M resveratrol during 72 h. **B)** Hamsters were intraportally inoculated with  $3 \times 10^6$  untreated or resveratrol-treated (110  $\mu$ M, 12 h, drug removal) trophozoites. After seven days, livers were examined. **C)** Damage was evaluated as the weight of the abscesses formed divided by the weight of the whole liver, before the injured areas were removed. Values represent the mean  $\pm$  standard error of liver damage in inoculated animals. n = 8. \*\*\*p<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0146287.g009

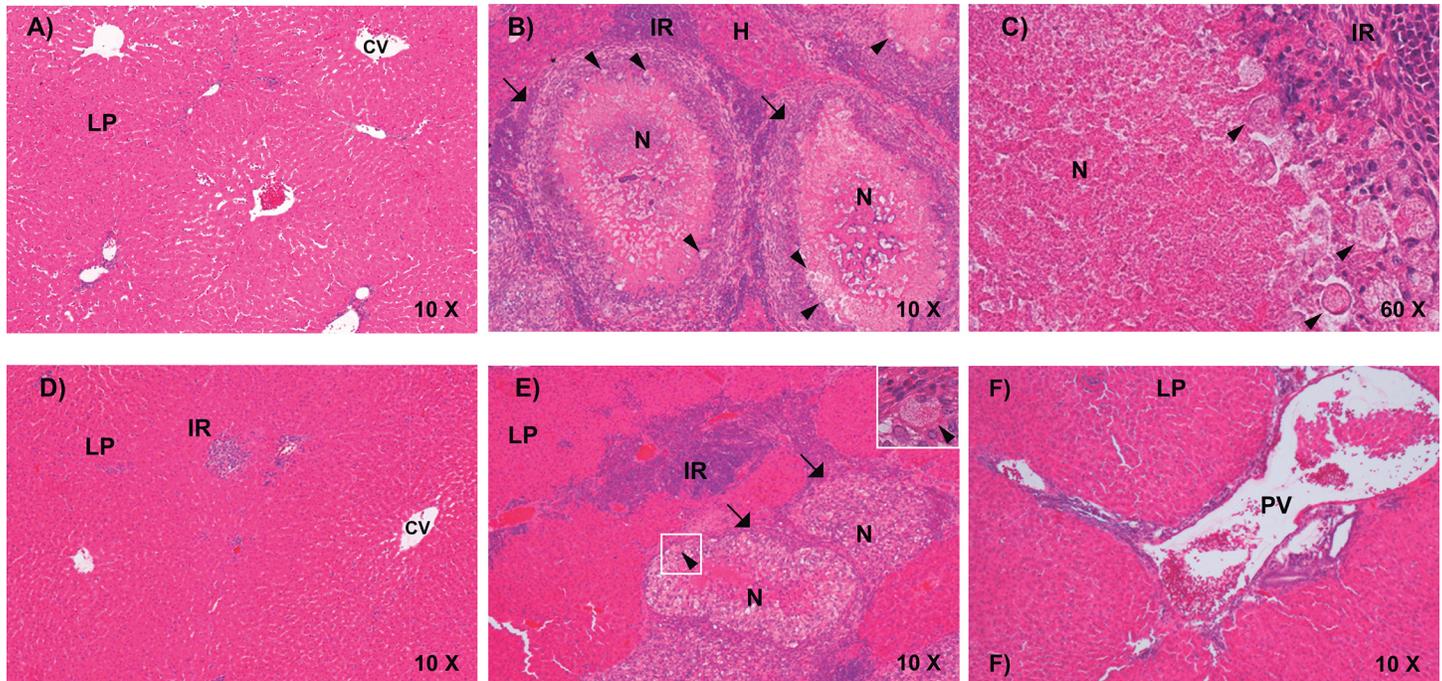
trophozoites. Ten days after challenge, animals that were not inoculated with trophozoites, but orally treated with pathogens-free water and ethanol presented healthy livers (Fig 10A). Ten days after challenge, animals inoculated with trophozoites and treated with pathogen-free water and ethanol developed huge abscesses that covered around 80% of the liver. In contrast, resveratrol-treated hamsters, two days before and ten days after challenge presented a mean of 17.28% liver damage (Fig 10A and 10B). Similar results were obtained in animals treated with resveratrol during ten days, but starting the treatment four days after challenging (after verifying the presence of liver abscesses in the positive control group). Abscesses were visible four days after challenge with virulent trophozoites in untreated animals. They appeared as huge isolated spots in 100% of animals used as positive controls for these experiments. Interestingly, a mean of 55% animals treated with resveratrol in both type of experiments did not present amoebic liver abscesses, 33% showed small abscesses located only in one lobule and covering 8% of the liver volume and 11% of the animals presented abscesses occupying 30% of the liver. All resveratrol-treated animals presented normal appearance and healthy spleen, gut, kidneys, lungs and other organs. As a pharmacological control we used for all experiments a group of animals that were treated with metronidazole to avoid the amoebic abscesses formation (Fig 10).

To deeper analyze the liver damage, liver tissue sections were stained by hematoxylin-eosin and observed under the microscope. Animals without treatment that were not inoculated with trophozoites, but treated with pathogen-free water and ethanol, showed a normal liver parenchyma (Fig 11A). Ethanol-treated hamsters inoculated with virulent trophozoites presented important tissue damage with an intense granulomatous reaction. Liver necrosis increased by granulomas fusion and amoebae were observed in the border of them (Fig 11B and 11C). Interestingly, resveratrol-treated hamsters, using both protocols described here, that did not present hepatic abscesses, presented a healthy liver parenchyma (Fig 11D); whereas those animals that exhibited small liver abscesses showed an important decrease of granulomatous reaction, compared with the positive controls (Fig 11E). Inflammation area also diminished and few



**Fig 10. Effect of resveratrol administration in hamsters intraportally inoculated with virulent trophozoites. A)** Healthy livers: Liver of animals not inoculated with trophozoites B) Ethanol: Livers of intraportally inoculated hamsters ( $3 \times 10^6$  virulent trophozoites), treated with 50  $\mu$ l of ethanol. Damage after 4 days: Livers of animals inoculated with virulent trophozoites and examined four days after challenge. Resveratrol 2d before and 10 d after challenge: Livers of animals treated with resveratrol (100 mg/Kg diluted in 50  $\mu$ l of ethanol) each 8 h (2 days before and 10 days after inoculation) and examined ten days after challenge. Resveratrol after 4 d challenge: Liver of animals treated with resveratrol, as above, for ten days, starting four days after challenge when abscesses were already formed **B)** Damage was evaluated as the weight of the abscesses formed divided by the weight of the whole liver, before the injured areas were removed. As a negative control, animals were not inoculated with trophozoites (healthy liver). As a pharmacological control hamsters were treated with 20 mg/Kg of metronidazole. Values represent the mean  $\pm$  standard error of liver damage in inoculated animals.  $n = 7$ . \*\*\* $p < 0.001$ .

doi:10.1371/journal.pone.0146287.g010



**Fig 11. Histopathology of amoebic liver abscesses.** 0.4  $\mu$ m sections of hamster's livers treated as described in Fig 10, were processed for hematoxylin-eosin staining and observed under light microscope. **A)** Animals not inoculated with trophozoites and orally treated with pathogens-free water. **B, C)** Hamsters intraportally inoculated with  $3 \times 10^6$  trophozoites and treated with 50  $\mu$ l of ethanol each 8 h (2 days before and 10 days after inoculation). **B)** Granulomatous reaction representative of damage produced. **C)** Magnification of a granuloma. **D, E)** Hamsters intraportally inoculated with  $3 \times 10^6$  trophozoites and treated with 100 mg/Kg of resveratrol (diluted in 50  $\mu$ L of ethanol) each 8 h (2 days before and 10 days after inoculation). **D)** Liver without damage after resveratrol-treatment of animals. **E)** Liver with small abscesses. Square: magnified area showing a trophozoite. Arrows: granulomas. **F)** Animals intraportally inoculated with  $3 \times 10^6$  trophozoites and treated with 20 mg/Kg of metronidazole each 8 h (2 days before and 10 days after inoculation). LP: liver parenchyma. CV: centrilobular vein. H: hepatocytes. N: necrosis area. IR: inflammatory reaction. PV: a branch of the portal vein. Arrowheads: trophozoites. Arrows: epithelioid cells.

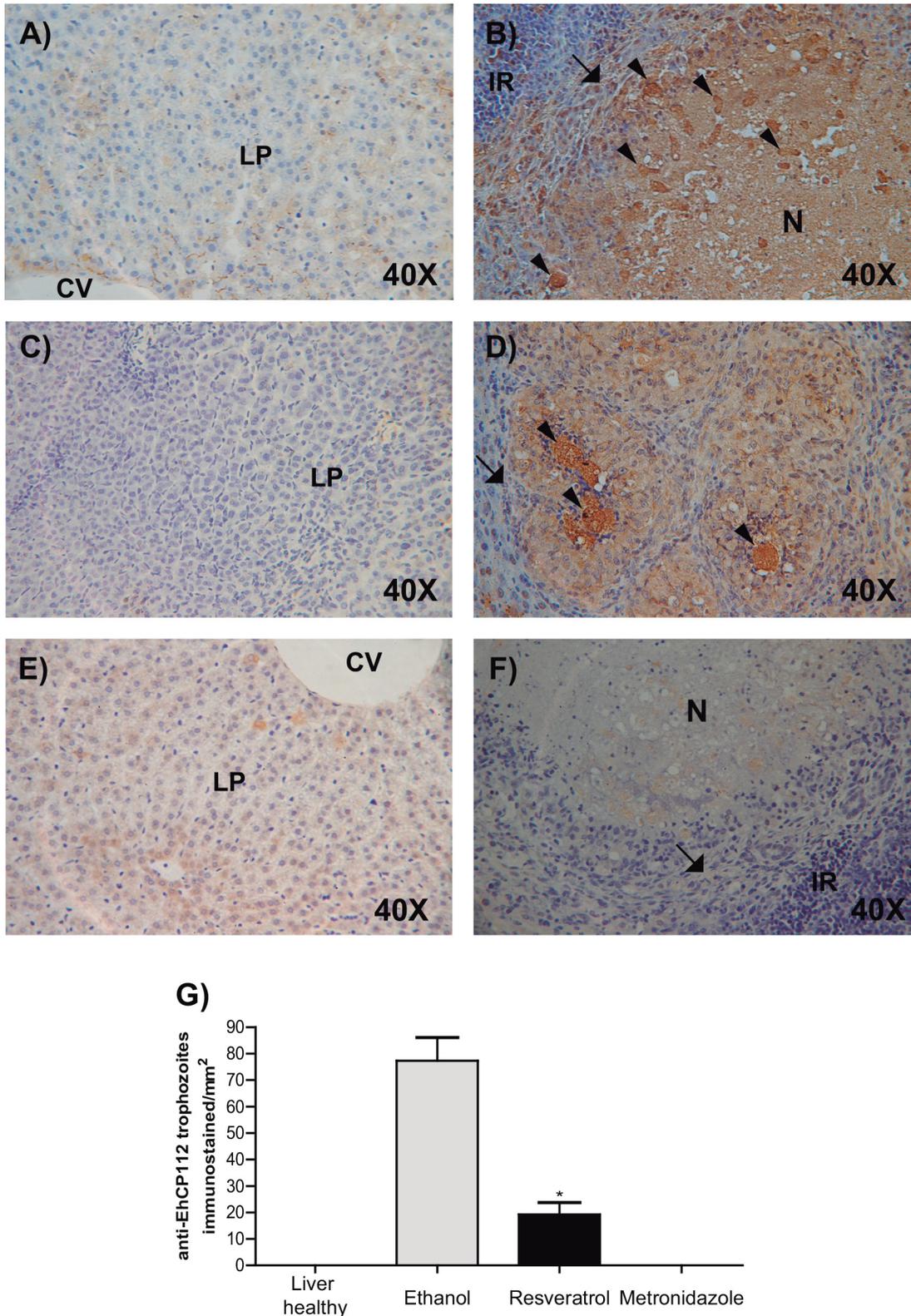
doi:10.1371/journal.pone.0146287.g011

trophozoites were observed (Fig 11E). Metronidazole group showed healthy liver tissue after treatment (Fig 11F).

To evaluate the parasitic burden in the liver of untreated and resveratrol-treated animals (using both protocols described here), we carried out immunostaining assays, using an antibody against an EhCP112 polypeptide. EhCP112 is a cysteine protease forming part of the EhCPADH complex, involved in *E. histolytica* virulence [34]. To evaluate the parasitic burden, intact antibody-positive trophozoites were counted in 15 liver sections. The healthy livers from non-inoculated animals exhibited negative reaction (Fig 12A and 12G), similar to the negative control using only rabbit pre-immune serum (Fig 12F). Livers of animals treated with ethanol, presented a mean of 77.5 parasites/mm<sup>2</sup> (Fig 12B and 12G). Hamsters treated with resveratrol with none or only small hepatic abscesses, exhibited a mean of 19.2 parasites/mm<sup>2</sup> (Fig 12C, 12D and 12G), and metronidazole-treated animals gave negative reaction to the antibody (Fig 12G). In addition, in the granuloma area, a diffuse antibody-staining was observed, suggesting trophozoite rupture or EhCP112 secretion, as it has been reported [40].

## Discussion

Neglected parasitic diseases are extended around the world, mainly in Africa, Asia and Latin America poor countries [41]. Endoparasites, including protozoa and helminthes, affect more than 30% of the human population [41], and their eradication it is not in sight. Amoebiasis,



**Fig 12. Immunocytochemistry of livers from hamsters inoculated with virulent trophozoites.** Paraffin sections of livers from hamsters treated as in Fig 10. **A)** Non-challenged hamsters (healthy liver). **B)** Challenged hamsters treated with ethanol. **C)** Challenged hamsters treated with resveratrol that did not develop hepatic abscesses. **D)** Challenged hamsters treated with resveratrol that develop small abscesses. **E)** Challenged hamsters treated with

metronidazole. **F)** Challenged hamsters treated with ethanol and developed only with the pre-immune serum. **G)** Parasitic burden quantified in 15 sections of livers from hamsters treated as above.

doi:10.1371/journal.pone.0146287.g012

caused by *E. histolytica*, is the third major human neglected parasitic diseases [42]. It is controlled mainly by metronidazole and its derivatives that are toxic for humans [43]. Natural products that have been used in poor countries for centuries to treat several diseases could be an alternative to treat amoebiasis and other parasitic infections. Between 1981 and 2006, 1,184 new drugs were registered, of which, 28% were natural products or their derivatives [44]. These data suggest that it is the time to look at biodiversity and ancestral knowledge for other strategies to control infectious diseases, including amoebiasis [9]. Here, we found that resveratrol, a nontoxic to humans natural compound, present in red wine, grapes, nuts and many medicinal plants [45], is cytotoxic for *E. histolytica* trophozoites in a dose- and time- dependent manner. As the innocuousness of resveratrol in mammals has been demonstrated using up to 2 g/Kg of the drug [13], resveratrol could be a good candidate against amoebiasis.

Besides, a number of favorable pharmacological activities in mammals, including anti-cancer properties, resveratrol kills several protozoa and helminthes, such as *Leishmania* (153.2  $\mu$ M dose) [46], *Trichomonas vaginalis* (25 to 100  $\mu$ M dose) [47], *Trichinella spiralis* (12.5 to 200 mg/ml dose) [48], *Acanthamoeba castellanii* (876  $\mu$ M dose) [49] and *Balamuthia mandrillaris* (250  $\mu$ M dose) [50], just to mention some. These data indicate that resveratrol dose vary depending on the organism [51]. Interestingly, several human eukaryotic parasites share some features, such as a high metabolic activity, uncontrolled cell division and development of resistance to the host defenses [52]. This can explain why, resveratrol can also be used against several parasites, bacteria and fungi [46,51,53]. In addition, *E. histolytica* trophozoites resemble to cancer cells in two facts: that they do not present contact growth inhibition and they can migrate in the body to colonize different tissues.

In some parasites, the effect of resveratrol is due to the interference with the respiratory chain in mitochondria or in mitochondria-like organelles. In *Philasterides dicentrarchi*, a scuticociliate pathogen of turbot, resveratrol causes oxidative stress, inhibition of antioxidant enzymes and morphological alterations in the mitochondria [17,54]. In *T. vaginalis* the action mechanism involves induction of hydrogenosome dysfunction [47]. In *Trypanosomatides*, the kinetoplast is a main target of the drug [55]. *E. histolytica* trophozoites do not possess canonical mitochondria, although cytoplasmic organelles with mitochondrial-like enzymes (Cpn60, Cpn10, Hsp70, MCF and PFO enzymes [56,57,58]) and others with DNA [59,60] have been reported. However, more studies are necessary to determine first the function of these structures and then, define whether resveratrol affects them.

Resveratrol provoked accumulation of ROS in *E. histolytica* trophozoites and possibly from this event, the apoptosis-like death observed in resveratrol-treated trophozoites was induced. ROS act as signaling molecules that trigger proliferation, autophagy and apoptosis [19]. However, the ROS production and its effects caused by resveratrol in trophozoites might be deeper investigated.

Autophagy is involved in intracellular degradation, energy recycling and stress events, such as periods of nutrient deprivation, when cell needs to obtain amino acids and other nutrients [61].

In autophagy, the concerted participation of Atg proteins is necessary for the autophagosomes membrane formation [61] and in some parasites, Atg8 and Atg12 conjugation systems are enough for autophagy [62]. Even when *E. histolytica* has the Atg system, we could not detect EhAtg8-PE conjugation or autophagosomes in resveratrol-treated trophozoites. Apoptosis has been studied in protozoa, including *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Trichomonas* [63] and

*E. histolytica* [64]. Even when *E. histolytica* trophozoites do not have canonical caspases [24], here we demonstrated that apoptosis-like death occurs in resveratrol-treated trophozoites. Different experimental approaches, including PS externalization, DNA fragmentation, increase of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ , calpain activation and decrease of SOD activity, support this assumption.

Of the major interest was the effect of resveratrol on trophozoite virulence. The ability of trophozoites to destroy cultured cells and their rate of phagocytosis are two parameters to evaluate the *in vitro* virulence of *E. histolytica* strains. Here we showed that pre-incubation of trophozoites with 110  $\mu\text{M}$  resveratrol produced a decrease in the rate of erythrophagocytosis and in cytopathic effect. Similar findings in relation to the effect of resveratrol on cytopathic effect of trophozoites on cell cultures were obtained for *A. castellanii* and *B. mandrillaris* [49,50]. Interestingly, pre-incubation with resveratrol of *E. invadens* trophozoites, inhibited encystment. Even when we could not prove this in *E. histolytica* trophozoites, resveratrol would be a good candidate to prevent cyst transmission.

*E. histolytica* trophozoites pre-treated with resveratrol were not able to produce liver abscesses in hamsters. Proliferation index experiments demonstrated that resveratrol-treated trophozoites (110  $\mu\text{M}$ , 12 h) remained viable after drug removal, and therefore, when they were inoculated into the animals. Similarly, they were able to ingest red blood cells. These results also suggested that apoptosis-like death of trophozoites was triggered after 12 h incubation with resveratrol and before that, trophozoites remain viable, but unable to express virulence *in vitro*.

The amoebicidal effect of resveratrol was further demonstrated in hamsters inoculated with virulent trophozoites. Abscesses formation was dramatically diminished by oral administration of resveratrol in two distinct protocols: for two days before and ten days after and for ten days starting four days after intraperitoneally inoculation of a high number of virulent trophozoites. The parasitic burden in the livers significantly decreased in resveratrol-treated animals, as it was shown by immunostaining using the anti-EhCP112 antibody. These results suggested that resveratrol could be proposed, after clinically testing, as an alternative to avoid amoebic hepatic abscesses. In addition, resveratrol derivatives must be tested as other options, as other authors have been done for cancer treatment and against other parasites [65]. Resveratrol and its derivatives could be a better choice than metronidazole to defeat amoebiasis, because resveratrol's harmlessness in mammals has been demonstrated [13].

In conclusion, here, we introduced an old compound, the resveratrol, as a promising novel drug to defeat amoebiasis, because it affected the *in vitro* and *in vivo* virulence of the trophozoites and their capacity of encystment. The mechanisms through which resveratrol exerts its effect on *E. histolytica* involve the arrest of cell growth and the generation of oxidative stress which eventually triggered the apoptosis-like in trophozoites.

## Acknowledgments

The authors are grateful to M. Sc. Daniel Leon for helping in  $\text{Ca}^{2+}$  measurement assays, to Mario Nequiz to provide the *E. histolytica* virulent HM1-IMSS strain, to M. Sc. Mayra Herrera for *E. invadens* culture and support for encystment experiments and to Tomas Sánchez and Alejandrina Reyes for technical support and to Dr. Silvia Fernández Castello and M.Sc. Patricia Cuellar for English revision of the manuscript.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JPM EO JPM AB. Performed the experiments: JPM GGR BCHM MSh. Analyzed the data: JPM EO AB. Contributed reagents/materials/analysis tools: EO JPM BChM MSh. Wrote the paper: JPM AB EO.

## References

1. Mortimer L, Chadee K (2010) The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* 126: 366–380. doi: [10.1016/j.exppara.2010.03.005](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.03.005) PMID: [20303955](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20303955/)
2. Huston CD, Petri WA Jr. (2001) Emerging and reemerging intestinal protozoa. *Curr Opin Gastroenterol* 17: 17–23. PMID: [17031144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17031144/)
3. Cordel H, Prendki V, Madec Y, Houze S, Paris L, Bouree P, et al. (2013) Imported amoebic liver abscess in France. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2333. doi: [10.1371/journal.pntd.0002333](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002333) PMID: [23951372](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23951372/)
4. Faust DM, Markiewicz JM, Santi-Rocca J, Guillen N (2011) New insights into host-pathogen interactions during *Entamoeba histolytica* liver infection. *European Journal of Microbiology and Immunology* 1: 10–18. doi: [10.1556/EuJMI.1.2011.1.4](https://doi.org/10.1556/EuJMI.1.2011.1.4) PMID: [24466432](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24466432/)
5. Bendesky A MD (2001) Metronidazol: una visión integral. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 44: 255–259.
6. Wassmann C, Hellberg A, Tannich E, Bruchhaus I (1999) Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *J Biol Chem* 274: 26051–26056. PMID: [10473552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10473552/)
7. Roe FJ (1983) Toxicologic evaluation of metronidazole with particular reference to carcinogenic, mutagenic, and teratogenic potential. *Surgery* 93: 158–164. PMID: [6336861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6336861/)
8. Debnath A, Parsonage D, Andrade RM, He C, Cobo ER, Hirata K, et al. (2012) A high-throughput drug screen for *Entamoeba histolytica* identifies a new lead and target. *Nat Med* 18: 956–960. doi: [10.1038/nm.2758](https://doi.org/10.1038/nm.2758) PMID: [22610278](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22610278/)
9. Mfotie Njoya E, Weber C, Hernandez-Cuevas NA, Hon CC, Janin Y, Kamini MF, et al. (2014) Bioassay-guided fractionation of extracts from *Codiaeum variegatum* against *Entamoeba histolytica* discovers compounds that modify expression of ceramide biosynthesis related genes. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2607. doi: [10.1371/journal.pntd.0002607](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002607) PMID: [24416462](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24416462/)
10. Preet S, Bharati S, Shukla G, Koul A, Rishi P (2011) Evaluation of amoebicidal potential of Paneth cell cryptdin-2 against *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1386. doi: [10.1371/journal.pntd.0001386](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001386) PMID: [22206022](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22206022/)
11. Orozco E, Benitez-Bibriesca L, Hernandez R (1994) Invasion and metastasis mechanisms in *Entamoeba histolytica* and cancer cells. Some common cellular and molecular features. *Mutat Res* 305: 229–239. PMID: [7510034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7510034/)
12. Miki H, Uehara N, Kimura A, Sasaki T, Yuri T, Yoshizawa K, et al. (2012) Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells. *Int J Oncol* 40: 1020–1028. doi: [10.3892/ijo.2012.1325](https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1325) PMID: [22218562](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22218562/)
13. Hebbar V, Shen G, Hu R, Kim BR, Chen C, Korytko PJ, et al. (2005) Toxicogenomics of resveratrol in rat liver. *Life Sci* 76: 2299–2314. PMID: [15748624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15748624/)
14. Pirola L, Frojdo S (2008) Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life* 60: 323–332. doi: [10.1002/iub.47](https://doi.org/10.1002/iub.47) PMID: [18421779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18421779/)
15. Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, et al. (2003) Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun* 309: 1017–1026. PMID: [13679076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13679076/)
16. Robb EL, Page MM, Wiens BE, Stuart JA (2008) Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. *Biochem Biophys Res Commun* 367: 406–412. doi: [10.1016/j.bbrc.2007.12.138](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.138) PMID: [18167310](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18167310/)
17. Lamas J, Morais P, Arranz JA, Sanmartin ML, Orallo F, Leiro J (2009) Resveratrol promotes an inhibitory effect on the turbot scuticociliate parasite *Philasterides dicentrarchi* by mechanisms related to cellular detoxification. *Vet Parasitol* 161: 307–315. doi: [10.1016/j.vetpar.2008.12.025](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.12.025) PMID: [19246159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19246159/)
18. Kumar B, Iqbal MA, Singh RK, Bamezai RN (2015) Resveratrol inhibits TIGAR to promote ROS induced apoptosis and autophagy. *Biochimie*.
19. Kaminsky VO, Zhivotovsky B (2014) Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 21: 86–102. doi: [10.1089/ars.2013.5746](https://doi.org/10.1089/ars.2013.5746) PMID: [24359220](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24359220/)
20. Picazarri K, Nakada-Tsukui K, Nozaki T (2008) Autophagy during proliferation and encystation in the protozoan parasite *Entamoeba invadens*. *Infect Immun* 76: 278–288. PMID: [17923513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17923513/)
21. Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Das DN, Bhutia SK (2014) Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis* 19: 555–566. doi: [10.1007/s10495-014-0967-2](https://doi.org/10.1007/s10495-014-0967-2) PMID: [24415198](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24415198/)
22. Villalba JD, Gomez C, Medel O, Sanchez V, Carrero JC, Shibayama M, et al. (2007) Programmed cell death in *Entamoeba histolytica* induced by the aminoglycoside G418. *Microbiology* 153: 3852–3863. PMID: [17975094](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17975094/)

23. Nandi N, Sen A, Banerjee R, Kumar S, Kumar V, Ghosh AN, et al. (2010) Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Microbiology* 156: 1926–1941. doi: [10.1099/mic.0.034066-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.034066-0) PMID: [20299403](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20299403/)
24. Ghosh AS, Dutta S, Raha S (2010) Hydrogen peroxide-induced apoptosis-like cell death in *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Int* 59: 166–172. doi: [10.1016/j.parint.2010.01.001](https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.01.001) PMID: [20079879](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20079879/)
25. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC (1978) A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72: 431–432. PMID: [212851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/212851/)
26. Sanchez L, Enea V, Eichinger D (1994) Identification of a developmentally regulated transcript expressed during encystation of *Entamoeba invadens*. *Mol Biochem Parasitol* 67: 125–135. PMID: [7838173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7838173/)
27. Chavez-Munguia B, Cristobal-Ramos AR, Gonzalez-Robles A, Tsutsumi V, Martinez-Palomo A (2003) Ultrastructural study of *Entamoeba invadens* encystation and excystation. *J Submicrosc Cytol Pathol* 35: 235–243. PMID: [14690171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14690171/)
28. Berridge MV, Herst PM, Tan AS (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11: 127–152. PMID: [16216776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16216776/)
29. Reed LJ, Muench H (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 27.
30. Cerbón J, Flores J (1981) Phospholipid composition and turnover of pathogenic amebas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 69: 487–492.
31. Kohli V, Gao W, Camargo CA Jr., Clavien PA (1997) Calpain is a mediator of preservation-reperfusion injury in rat liver transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9354–9359. PMID: [9256486](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9256486/)
32. Garcia-Rivera G, Sanchez T, Orozco E, Guarneros G (1982) [Isolation of clones of *E. histolytica* deficient in adhesion to human erythrocytes]. *Arch Invest Med (Mex)* 13 Suppl 3: 129–136.
33. Shibayama M, Campos-Rodriguez R, Ramirez-Rosales A, Flores-Romo L, Espinosa-Cantellano M, Martinez-Palomo A, et al. (1998) *Entamoeba histolytica*: liver invasion and abscess production by intraperitoneal inoculation of trophozoites in hamsters, *Mesocricetus auratus*. *Exp Parasitol* 88: 20–27. PMID: [9501845](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9501845/)
34. Garcia-Rivera G, Rodriguez MA, Ocadiz R, Martinez-Lopez MC, Arroyo R, Gonzalez-Robles A, et al. (1999) *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol Microbiol* 33: 556–568. PMID: [10417646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10417646/)
35. Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78: 547–581. PMID: [9562038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9562038/)
36. Eruslanov E, Kusmartsev S (2010) Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol* 594: 57–72. doi: [10.1007/978-1-60761-411-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4) PMID: [20072909](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20072909/)
37. Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495–516. PMID: [17562483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17562483/)
38. Orozco E, Guarneros G, Martinez-Palomo A, Sanchez T (1983) *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med* 158: 1511–1521. PMID: [6313842](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6313842/)
39. Eichinger D (2001) A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*. *J Eukaryot Microbiol* 48: 17–21. PMID: [11249188](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11249188/)
40. Ocadiz R, Orozco E, Carrillo E, Quintas LI, Ortega-Lopez J, Garcia-Perez RM, et al. (2005) EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cell Microbiol* 7: 221–232. PMID: [15659066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15659066/)
41. Mableson HE, Okello A, Picozzi K, Welburn SC (2014) Neglected zoonotic diseases—the long and winding road to advocacy. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2800. doi: [10.1371/journal.pntd.0002800](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002800) PMID: [24901769](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24901769/)
42. Stanley SL Jr. (2003) Amoebiasis. *Lancet* 361: 1025–1034. PMID: [12660071](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12660071/)
43. Stauffer W, Ravdin JI (2003) *Entamoeba histolytica*: an update. *Curr Opin Infect Dis* 16: 479–485. PMID: [14502002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14502002/)
44. Wink M (2012) Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. *Molecules* 17: 12771–12791. doi: [10.3390/molecules171112771](https://doi.org/10.3390/molecules171112771) PMID: [23114614](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23114614/)
45. Park EJ, Pezzuto JM (2015) The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochim Biophys Acta*.
46. Lucas IK, Kolodziej H (2013) In vitro antileishmanial activity of resveratrol originates from its cytotoxic potential against host cells. *Planta Med* 79: 20–26. doi: [10.1055/s-0032-1328020](https://doi.org/10.1055/s-0032-1328020) PMID: [23225365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23225365/)
47. Mallo N, Lamas J, Leiro JM (2013) Hydrogenosome metabolism is the key target for antiparasitic activity of resveratrol against *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 2476–2484. doi: [10.1128/AAC.00009-13](https://doi.org/10.1128/AAC.00009-13) PMID: [23478970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23478970/)

48. Ozkoc S, Tuncay S, Delibas SB, Akisu C (2009) In vitro effects of resveratrol on *Trichinella spiralis*. *Parasitol Res* 105: 1139–1143. doi: [10.1007/s00436-009-1533-7](https://doi.org/10.1007/s00436-009-1533-7) PMID: [19562377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19562377/)
49. Aqeel Y, Iqbal J, Siddiqui R, Gilani AH, Khan NA (2012) Anti-Acanthamoebic properties of resveratrol and demethoxycurcumin. *Exp Parasitol* 132: 519–523. doi: [10.1016/j.exppara.2012.09.007](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.09.007) PMID: [23010569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23010569/)
50. Kalsoom H, Baig AM, Khan NA, Siddiqui R (2014) Laboratory testing of clinically approved drugs against *Balamuthia mandrillaris*. *World J Microbiol Biotechnol* 30: 2337–2342. doi: [10.1007/s11274-014-1658-4](https://doi.org/10.1007/s11274-014-1658-4) PMID: [24875138](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24875138/)
51. Budino B, Pata MP, Leiro J, Lamas J (2012) Differences in the in vitro susceptibility to resveratrol and other chemical compounds among several *Philasterides dicentrarchi* isolates from turbot. *Parasitol Res* 110: 1573–1578. doi: [10.1007/s00436-011-2664-1](https://doi.org/10.1007/s00436-011-2664-1) PMID: [21987103](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21987103/)
52. Yaeger RG (1996) Protozoa: Structure, Classification, Growth, and Development. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston, TX: The University of Texas Medical Branch.
53. Dobrzynska MM (2013) Resveratrol as promising natural radioprotector. A review. *Rocz Panstw Zakl Hig* 64: 255–262. PMID: [24693709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24693709/)
54. Morais P, Piazzon C, Lamas J, Mallo N, Leiro JM (2013) Effect of resveratrol on oxygen consumption by *Philasterides dicentrarchi*, a scuticociliate parasite of turbot. *Protist* 164: 206–217. doi: [10.1016/j.protis.2012.07.002](https://doi.org/10.1016/j.protis.2012.07.002) PMID: [22951214](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22951214/)
55. Nyunt KS, Elkhateeb A, Tosa Y, Nabata K, Katakura K, Matsuura H (2012) Isolation of antitrypanosomal compounds from *Vitis repens*, a medicinal plant of Myanmar. *Nat Prod Commun* 7: 609–610. PMID: [22799088](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22799088/)
56. Mi-ichi F, Makiuchi T, Furukawa A, Sato D, Nozaki T (2011) Sulfate activation in mitochondria plays an important role in the proliferation of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1263. doi: [10.1371/journal.pntd.0001263](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001263) PMID: [21829746](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21829746/)
57. Mi-ichi F, Abu Yousuf M, Nakada-Tsukui K, Nozaki T (2009) Mitochondria in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21731–21736. doi: [10.1073/pnas.0907106106](https://doi.org/10.1073/pnas.0907106106) PMID: [19995967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19995967/)
58. Rodriguez MA, Garcia-Perez RM, Mendoza L, Sanchez T, Guillen N, Orozco E (1998) The pyruvate: ferredoxin oxidoreductase enzyme is located in the plasma membrane and in a cytoplasmic structure in *Entamoeba*. *Microb Pathog* 25: 1–10. PMID: [9705244](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9705244/)
59. Solis F, Orozco E, Cordova L, Rivera B, Luna-Arias JP, Gomez-Conde E, et al. (2002) *Entamoeba histolytica*: DNA carrier vesicles in nuclei and kinetoplast-like organelles (EhKOs). *Mol Genet Genomics* 267: 622–628. PMID: [12172801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12172801/)
60. Leon-Avila G, Tovar J (2004) Mitochondria of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. *Microbiology* 150: 1245–1250. PMID: [15133087](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15133087/)
61. Joachim J, Jiang M, McKnight NC, Howell M, Toose SA (2015) High-throughput screening approaches to identify regulators of mammalian autophagy. *Methods* 75C: 96–104.
62. Williams RA, Woods KL, Juliano L, Mottram JC, Coombs GH (2009) Characterization of unusual families of ATG8-like proteins and ATG12 in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Autophagy* 5: 159–172. PMID: [19066473](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19066473/)
63. Proto WR, Coombs GH, Mottram JC (2013) Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? *Nat Rev Microbiol* 11: 58–66. doi: [10.1038/nrmicro2929](https://doi.org/10.1038/nrmicro2929) PMID: [23202528](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23202528/)
64. Villalba-Magdaleno JD, Perez-Ishiwara G, Serrano-Luna J, Tsutsumi V, Shibayama M (2011) In vivo programmed cell death of *Entamoeba histolytica* trophozoites in a hamster model of amoebic liver abscess. *Microbiology* 157: 1489–1499. doi: [10.1099/mic.0.047183-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.047183-0) PMID: [21349978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21349978/)
65. Ogas T, Kondratyuk TP, Pezzuto JM (2013) Resveratrol analogs: promising chemopreventive agents. *Ann N Y Acad Sci* 1290: 21–29. doi: [10.1111/nyas.12196](https://doi.org/10.1111/nyas.12196) PMID: [23855462](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23855462/)