



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

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS  
MOLECULAR**

**“Efecto de diferentes cepas de *Escherichia coli* sobre la virulencia de *Entamoeba histolytica* durante el desarrollo de la amibiasis experimental”**

**Tesis que presenta**

**M. en C. Luz Aracely Fernández López**

Para Obtener el Grado de

Doctor en Ciencias en

**INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

Director de tesis:

**Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi**

**Ciudad de México**

**Julio, 2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco enormemente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca No. 321615, sin este financiamiento no me hubiera sido posible completar el presente trabajo y desarrollarme profesionalmente. Es un apoyo valioso para todos los individuos que nos queremos dedicar a hacer ciencia y buscar el desarrollo del conocimiento y la tecnología para el engrandecimiento de nuestro país.

Al Dr. Victor Tustsumi le agradezco por su asesoría en el desarrollo de este proyecto y por su apoyo durante la realización del mismo.

Agradezco a mis asesores y doctores que me han brindado consejos y orientación: la Dra. Cecilia Ximénez por todos sus consejos, motivación, por su calidez, por su apoyo para realizar experimentos en su laboratorio, al Dr. Enrique González por su orientación, su paciencia, y todo el tiempo que dedicó a enseñarme y supervisarme en la realización de experimentos de qPCR. A la Dra. Patricia Talamás por mantener siempre las puertas abiertas de su laboratorio, para la utilización de sus equipos y para cualquier orientación, y toda su amabilidad, a la Dra. Teresa Estrada por donar las cepas de bacterias utilizadas en este proyecto, por sus consejos, por su orientación y permitirme hacer uso de los equipos de su laboratorio. Infinitas gracias, al Dr. Mario Rodríguez, por su amabilidad, sonrisas, su orientación y la dedicación de revisar mis experimentos, al Dr. José Luis Rosales por haber aceptado a última hora formar parte de mi comité revisor y tomarse el tiempo para hacer correcciones a este manuscrito, así como, por siempre mantener las puertas de su laboratorio abiertas y la disposición de sus equipos.

Un especial agradecimiento a la Universidad de Calgary y al Dr. Kris Chadee por haberme permitido la aventura de hacer una estancia de investigación en otro país, que enriqueció enormemente este trabajo y a mí como persona, en mi manejo de otro idioma, me favoreció a hacer amistades internacionales y enriquecerme con la cultura de otro país, fue una experiencia maravillosa por la que siempre estaré agradecida.

No menos importante agradezco inmensamente el apoyo a las Auxiliares de investigación QFB Silvia Galindo Gómez en las técnicas de histología, manejo de animales de experimentación y cultivo de amibas y a la M. en C Karla Gil Becerril por el apoyo en las técnicas de cultivo celular y de biología molecular. Así como a mis compañeros de laboratorio, por su amistad, su compañía y por hacer un

ambiente de trabajo tan agradable, siempre los llevaré en mi corazón: Suilma Ivette Pérez, Daniel Peralta y Karlita Ortega.

Agradezco también a los técnicos y auxiliares de otros laboratorios como Carlitos, Ivonne, Gillermina, Paty, Lidia, Angie por su apoyo y sus valiosos consejos para la realización de experimentos.

Un cálido agradecimiento al personal administrativo del Cinvestav, que siempre han sido muy atentos, y hacen de los trámites un procedimiento sencillo y ameno, así como el ambiente del departamento en general.

No puede faltar agradecer a mis padres y mi hermano, por todo su amor, por todo el apoyo que me han brindado para realizarme profesionalmente y como persona, los amo, soy afortunada de tenerlos como familia.

**“LA CIENCIA ES UN ESFUERZO DE COLABORACIÓN. LOS RESULTADOS  
COMBINADOS DE VARIAS PERSONAS QUE TRABAJAN JUNTAS ES A  
MENUDO MUCHO MÁS EFICÁZ DE LO QUE PODRÍA SER EL DE UN  
CIENTÍFICO QUE TRABAJA SOLO”**

**-John Bardeen-**

## Lista de abreviaturas

*Eh*: *Entamoeba histolytica*

*Ec*: *E. coli*

EPEC: *E. coli* enteropatógena

*EhVir*: Aislado de *Entamoeba histolytica* virulento

*EhNvir*: Aislado de *Entamoeba histolytica* no virulento

*Eh/EcDH5α*: Interacción de *E. histolytica* con *E. coli* DH5α

*Eh/EPEC*: Interacción de *E. histolytica* con EPEC

MDCK: Células epiteliales de riñón de perro Madin Darby

CaCo2: Células de Adenocarcinoma de Colon humano

AHA: Absceso hepático amebiano

EC: Efecto citopático

DNA: Ácido desoxirribonucleico

rDNA: Ácido desoxirribonucleico ribosomal

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

RNA: Ácido ribonucleico

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfato

GAPDH: Enzima Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

COX: Enzima ciclooxigenasa

CRD: Dominio de reconocimiento de carbohidratos

Hgl: Subunidad pesada de 170kDa de la lectina Gal/GalNac

Lgl: Subunidad pequeña de 35kDa de la lectina Gal/GalNac

CP: Cisteína proteasas

*EhCP*: Cisteína proteasas de *E. histolytica*

IgG: Inmunoglobulina G

PNM: Leucocito polimorfonuclear

INF-  $\gamma$ : Interferón- $\gamma$

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral- $\alpha$

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento tumoral- $\beta$

IL: Interleucina

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos

iNOS: Inducible óxido nítrico sintasa

PEG<sub>2</sub>: Prostaglandina E2

LPS: Lipopolisacaridos

TYI-S-33: Medio de cultivo para amibas que contiene tripticasa, levadura, hierro y suero

MEM: Medio mínimo esencial desarrollado por Harry Eagle (Minimum Essential Medium)

DMEM: Medio mínimo esencial Eagle modificado de Dulbecco

HCl: Ácido clorhídrico

Man: Manosa

Gal: Galactosa

SBA: Suero bovino adulto

SFB: Suero fetal bovino

PBS: Amortiguador de fosfatos

GFP: Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)

Z-A-A-pNA: Benciloxycarbonilo -L-arginil-L-arginina-p-nitroanilida

Z-V-V-A-AMC: Benciloxycarbonilo - L-valil- L-valil- L-arginina- 4-metilcoumarol-7-amida

E-64: Trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido (4-guanidino) butano, L-trans-3-Carboxyoxiran-2-carbonyl-L-leucylagmatine, N- (trans-Epoxy succinyl) -L-leucine 4-guanidinobutylamide

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

H&E: Tinción de hematoxilina y eosina

UF: Unidades de fluorescencia

AU: Unidades arbitrarias

DS: Desviación estándar

kDa: Kilo Dalton

nm: Nanómetros

dpi: Días post inoculación

hpi: Horas post inoculación

MOP: Actividad de mieloperoxidasa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: PCR cuantitativa

RT-qPCR: PCR cuantitativa de transcripción reversa

# Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.2 Amebiasis .....	19
1.3 Factores de virulencia .....	20
1.3.1 Adherencia.....	20
1.4 Citotoxicidad.....	21
1.5 Patogénesis de la amibiasis intestinal.....	24
1.6 Patogénesis de la amibiasis hepática .....	27
2. ANTECEDENTES.....	31
2.1 Interacción con bacterias .....	31
3. Justificación .....	38
4. Hipótesis .....	39
5. Objetivo general.....	40
6. Objetivos específicos.....	41
7. Estrategia general.....	42
8. Materiales y métodos.....	42
8.1 Cultivo de amibas.....	43
8.2 Cultivo y Transformación de bacterias con el vector pEGFP .....	43
8.3 Interacción amiba-bacteria y cinética de fagocitosis .....	44
8.4 Cinética de degradación de las bacterias por la amiba.....	45
8.5 Zimograma de proteasas de Entamoeba histolytica y degradación de sustratos peptídicos sintéticos .....	46
8.6 Cultivo de células MDCK, CaCo2 y evaluación del efecto citopático .....	47
8.7 Establecimiento de la amibiasis hepática.....	48
8.8 Establecimiento de la amibiasis intestinal .....	49
8.9 Tinción de hematoxilina y eosina (H&E) .....	50

8.10 Tinción de Azul de Alciano (AA).....	51
8.11 Extracción de RNA total .....	51
8.12 Obtención de cDNA .....	52
8.13 PCR y RT-qPCR para factores de virulencia de la amiba y citocinas del huésped. ....	52
9. Resultados.....	55
9.1 Evaluación de la virulencia in vitro e in vivo de diferentes aislados de <i>E. histolytica</i> HMI:IMSS .....	55
9.2 El uso del inhibidor de cisteína proteasas E-64 y galactosa afecta de manera diferente la capacidad del efecto citopático de <i>E. histolytica</i> X1, Pt1, Pt2 aislados.....	58
9.3 Actividad proteolítica de los aislados de <i>E. histolytica</i> HMI:IMSS .....	60
9.4 Análisis de habilidad para fagocitar eritrocitos, bacterias, actividad hemolítica y tasa de crecimiento de aislados de <i>E. histolytica</i> HMI:IMSS con diferente virulencia.....	62
9.5 Fagocitosis de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ y EPEC por <i>E. histolytica</i> y degradación intracelular de las bacterias por la amiba.....	65
A través de una cinética de 1h a 6h, observamos una mayor unidad de fluorescencia intracelular en la amiba, dada por las bacterias EPEC y <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ expresando GFP, entre 2 y 3 h de interacción (figura 8A). La fagocitosis se evaluó mediante microscopía confocal y citometría de flujo como se muestra en la figura 8A y 8B, respectivamente. De acuerdo con los valores obtenidos al evaluar la fagocitosis de las bacterias, se decidió utilizar 2.5h para interactuar los trofozoítos con la bacteria para posteriores experimentos, ya que la mayor cantidad de bacterias fagocitadas se observó entre las 2 y 3 horas. ....	65
9.6 Efecto de la interacción de <i>E. histolytica</i> con <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ y EPEC sobre la virulencia in vitro del parasito .....	68
9.7 Cambios en la expresión de genes relacionados a la virulencia de <i>E. histolytica</i> durante la interacción con <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ y EPEC .....	71

9.8 Comparación de la producción de AHA en hámsteres al inocular trofozoítos de <i>E. histolytica</i> axénica con trofozoítos interactuados con <i>EcDH5α</i> o EPEC...	73
9.9 Análisis histológico de hígado de hámsteres inoculados con <i>E. histolytica</i> Vir axénica y en interacción <i>EcDH5α</i> o EPEC.....	75
9.10 Expresión de citocinas en hámsteres inoculados con <i>E. histolytica</i> Vir en interacción con <i>EcDH5α</i> y EPEC comparada con la expresión en hámsteres inoculados con <i>EhVir</i> axénico. ....	77
9.11 Ratones <i>Math1</i> <sup>GFP</sup> inoculados con <i>EhVir</i> /EPEC revelaron una disminución de la inducción de la proliferación de celular secretora y una mayor producción de <i>Muc2</i> en comparación con los ratones inoculados con <i>EhVir</i> y <i>Eh/ EcDH5α</i> .....	79
9.12 Cambios de la respuesta inmune en intestinal en ratones C57BL/6 inoculados con <i>EhVir</i> axénica, <i>EhVir/DH5α</i> y <i>EhVir</i> /EPEC .....	83
10. Discusión .....	87
11. Conclusiones.....	98
12. Bibliografía.....	100
13. Bibliografía Electronica.....	111

## Índice de tablas

Tabla 1. Revisión histórica de la interacción de <i>E. histolytica</i> con bacterias .....	34
Tabla 2. . Secuencia y temperatura de alineamientos (Tm) para amplificar genes de citocinas y de <i>gapdh</i> como control endógeno de expresión .....	53
Tabla 3. Análisis del Efecto citopático sobre monocapas de células MDCK y formación de AHA en hámster producido por diferentes aislados de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS conservados bajo diversas condiciones de cultivo.....	57

## Índice de figuras

Figura 1. Ulceración en colitis amibiana.....	27
Figura 2. Análisis histológico del desarrollo de las lesiones hepáticas producidas por <i>E. histolytica</i> en hámster .....	29
Figura 3. Asas colónicas en intestino de ratón.....	49
Figura 4. Protocolo de tinción Hematoxilina & Eosina.....	50
Figura 5. Impacto sobre la capacidad de efecto cotopatico de la inhibición de cisteína proteasas por E-64 y de la adherencia a células en monocapa por competición con galactosa, de trofozoítos de los aislados Xi, Pt1 y Pt2 de <i>E. histolytica</i> .....	59
Figura 6. Actividad de cisteína proteasas en lisados de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS.	61
Figura 7. Caracterización fenotípica de los aislados de <i>E. histolytica</i> X1, Pt1 y Pt2. ....	63
Figura 8. Fagocitosis de EPEC y <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ , transformadas para expresar GFP, por trofozoítos de <i>E. histolytica</i> . ....	66
Figura 9. Foto de microscopía electrónica ilustrando la fagocitosis de EPEC por trofozoítos de <i>E. histolytica</i> a 12 horas de interacción amiba/bacteria. ....	67
Figura 10. Cambios en factores de virulencia de <i>E. histolytica</i> al estar en interacción con EPEC o <i>EcDH5<math>\alpha</math></i> durante 2.5 h. ....	70
Figura 11. . Cambio relativo en la expresión de genes del aislado <i>E. histolytica</i> Vir en durante la interacción con <i>EcDH5<math>\alpha</math></i> o EPEC. ....	72
Figura 12. Diferencias patológicas en hámsteres inoculados con los aislados axénicos de <i>E. histolytica</i> Nvir y Vir e interactuaron con <i>EcDH5<math>\alpha</math></i> o EPEC durante 2.5 h. ....	74
Figura 13. Análisis histológico de AHA a las 3 horas y 3 días después de la inoculación intrahepática con trofozoítos <i>EhVir</i> axénicos y en interaccionó durante 2.5 horas con <i>EcDH5<math>\alpha</math></i> o EPEC.....	76
Figura 14. PCR cuantitativo por transcripción reversa (qRT-PCR) de la expresión de citocinas en hígado de hámsteres inoculado con <i>EhVir</i> , <i>EhVir/EcDH5<math>\alpha</math></i> y <i>EhVir/EPEC</i> durante el desarrollo de AHA y al inocular solo <i>EcDH5<math>\alpha</math></i> y EPEC. ...	78

Figura 15. Producción de Math 1 y Muc2 y su expresión génica en intestino de ratones inoculados con *EhVir* axénico, *EhVir/EcDH5 $\alpha$* , *EhVir/EPEC* y EPEC. .... 81

Figura 16. Modulación de la respuesta inmune durante el establecimiento de la amebiasis intestinal en ratones C57BL/6 inoculados en asas colonicas con trofozoítos *EhVir* axenico, *EhVir/EcDH5 $\alpha$*  y *EhVir/EPEC* y al inocular solo EPEC.85

## Resumen

Varios estudios epidemiológicos indican una asociación frecuente de bacterias enteropatógenas en infecciones sintomáticas por el protozooario parasito *Entamoeba histolytica*. Aunque se desconoce cómo esta interacción afecta la virulencia del parasito y el desarrollo de la enfermedad en un hospedero, se ha demostrado que el co-cultivo de *E. histolytica* con cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* potencia la actividad de la lectina Gal/GalNac y cisteína proteasas de la amiba, aumentando su capacidad para destruir monocapas epiteliales *in vitro*. En este estudio, determinamos si la interacción de *E. coli* enteropatógena (EPEC) o de un serotipo no patógeno de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) con un asilado de *E. histolytica* no virulento (EhNvir) y un aislado virulento (EhVir), incrementa la virulencia de la amiba y produce cambios en la respuesta inmune del hospedero que lleven a producir absceso hepático amebiano (AHA) más severo en hámsteres y a propiciar condiciones para el establecimiento de la amebiasis intestinal en ratón. Inicialmente, evaluamos la virulencia *in vitro* e *in vivo* de 6 aislados de *E. histolytica* HMI:IMSS donados por diversos laboratorios, mantenidos bajo diferentes condiciones de conservación. Observamos que el efecto citopático (EC) no necesariamente se correlacionó con la capacidad de inducir AHA en el modelo de hámster, así como tampoco la actividad de cisteína proteasa, ni la fagocitosis de bacterias o de eritrocitos. Para evaluar el efecto de la interacción con *E. coli*, seleccionamos los aislados Xi considerado como de moderada virulencia (EhVir) por producir 30% de AHA y el aislado Pt2 considerado como no virulento ya que no produjo AHA (EhNvir) en hígado de hámster. Se observó un aumento de 2 veces del EC sobre monocapas de CaCo2 para los dos aislados de *E. histolytica* cuando se interactuaron durante 2.5 h con EPEC pero no con EcDH5 $\alpha$ . Este aumento del EC se asoció con una actividad proteolítica potenciada y una mayor capacidad de adherencia de los trofozoítos a la monocapa después de la interacción con EPEC. Además, la interacción con EPEC aumento la expresión de *Ehcp1*, *cp2*, *cp4*, *cp5*, *lectina Gal / GalNac*, *amebaporo A* y la *enzyma ciclooxygenasa* al cuantificarla por qPCR. Aun así, el aislado EhNvir al interactuar con EPEC (EhNvir/EPEC) continuo sin producir AHA y no se

observaron diferencias en el porcentaje de AHA entre los hámsteres inoculado con *EhVir* axenico, *EhVir* interactuado con *E. coli* DHA5 $\alpha$  (*EhVir/EcDH5 $\alpha$* ) y *EhVir/EPEC*. Sin embargo, el análisis histológico mostro áreas de necrosis más extensas en el hígado inoculados con *EhVir/EPEC*, acompañado por un incremento en la expresiones de las citocinas proinflamatoria *il-1 $\beta$* , *ifn- $\gamma$*  y *tnf- $\alpha$*  en comparación con los hámsteres inoculados con *EhVir* axenica y *EhVir/EcDH5 $\alpha$* . Por otra parte, se observó una respuesta inflamatoria intestinal más robusta en ratones C57BL/6 cuando EPEC también estaba presente en el inculo durante el establecimiento de la amebiasis intestinal, marcada por la represión de la proteína Math1, un aumento significativo de la secreción y la expresión génica de *muc2*, *il-6*, *il-12*, *il-1 $\beta$*  y una reducción de *ifn- $\gamma$* . Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que la interacción de *E. histolytica* con EPEC incrementa la expresión y la producción moléculas importantes en la virulencia de *E.histolytica*, que son críticas para la patogénesis de la ameba, y que la presencia de EPEC en el inculo inducen una respuesta inmunitaria más robusta, lo cual en conjunto puede conducir a la manifestación de los síntomas y la progresión de la enfermedad.

## Abstract

Several epidemiological studies indicate a frequent association of enteropathogenic bacteria in symptomatic infections by the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. Although it is unknown how this interaction affects the virulence of the parasite and the development of the disease in a host, it has been shown that the co-culture of *E. histolytica* with enteropathogenic strains of *Escherichia coli* potentiates the activity of the lectin Gal/GalNac and cysteine proteases of the amoeba, increasing its capacity to destroy epithelial monolayers *in vitro*. In this study, we determined whether the interaction with enteropathogenic *E. coli* (EPEC) or a non-pathogenic *E. coli* serotype (*EcDH5 $\alpha$* ) with a non-virulent *E. histolytica* isolate (*EhNvir*) and a virulent isolate (*EhVir*) increases the virulence of the amoeba and induced changes in the immune response of the host that lead to more severe amebic liver abscess (ALA) in hamsters and to propitiate conditions for the establishment of intestinal amebiasis in mice. Initially, we evaluated the *in vitro* and *in vivo* virulence of 6 *E. histolytica* HMI: IMSS isolates, donated by various laboratories, maintained under different storage conditions. We observed that the cytopathic effect (CE) did not necessarily correlate with the ability to induce ALA in the hamster model, as either the activity of cysteine protease, or the bacteria phagocytosis or erythrophagocytosis. To evaluate the effect of the interaction with *E. coli*, we selected the Xi isolate considered to be of moderate virulence (*EhVir*) for producing 30% of ALA and the Pt2 isolate considered as non-virulent (*EhNvir*) since it did not produce AHA in hamster liver. A 2-fold increase in EC was observed on CaCo2 monolayers for the two *E. histolytica* isolates when interacted for 2.5 h with EPEC but not with *EcDH5 $\alpha$* . This increase in EC was associated with enhanced proteolytic activity and increased adherence of trophozoites to the cells monolayer after interaction with EPEC. In addition, the interaction with EPEC increased the expression of *Ehcp1*, *cp2*, *cp4*, *cp5*, lectin Gal / GalNac, *amoebapor A* and the *cyclooxygenase enzyme*, quantified by qPCR. Even so, the *EhNvir* isolate when interacting with EPEC (*EhNvir*/EPEC) continued without producing ALA and there were no differences in the percentage of ALA between the hamsters inoculated with axenic *EhVir*, *EhVir* interacted with *E. coli* DHA5 $\alpha$  (*EhVir*/*EcDH5 $\alpha$* )

and *EhVir*/EPEC. However, the histological analysis showed more extensive areas of necrosis in the liver inoculated with *EhVir*/EPEC, accompanied by an increase in the expressions of the proinflammatory cytokines *il-1 $\beta$* , *ifn- $\gamma$*  and *tnf- $\alpha$*  in comparison with hamsters inoculated with *EhVir axenica* and *EhVir/EcDH5 $\alpha$* . Otherwise, a more robust intestinal inflammatory response was observed in C57BL/6 mice when EPEC was also present in the inoculum during the establishment of intestinal amoebiasis, marked by the repression of the *Math1* protein, a significant increase in mucin secretion and gene expression of *muc2*, *il-6*, *il-12*, *il-1 $\beta$*  and downregulation of *ifn- $\gamma$* . The results obtained in our study demonstrate that the interaction of *E. histolytica* with EPEC increases the expression and production of important molecules for the virulence of *E. histolytica*, which are critical for the pathogenesis of the amoeba, and that the presence of EPEC in the inoculum induce a more robust immune response, which together can lead to the manifestation of symptoms and the progression of the disease.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas constituyen uno de los principales problemas de salud; en todo el mundo se reportan alrededor de 1700 millones de casos anualmente, siendo la segunda mayor causa de muertes en niños menores de 5 años a nivel mundial. Se define como diarrea, a la deposición de heces, tres o más veces al día (o con frecuencia mayor que la normal para la persona) de heces sueltas o líquidas. En general, la diarrea suele ser un síntoma de una infección del tracto gastrointestinal y puede tener diferentes etiologías, entre las cuales destacan las de origen bacteriano, viral y parasitario; sin embargo, es frecuente encontrar infecciones de origen mixto tanto bacteriano como parasitario (OMS, 2013).

Entre las enfermedades parasitarias la amibiasis intestinal causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*, es considerada la tercera causa de muerte por parásitos, a nivel mundial, con un estimado de 100,000 muertes anualmente (OMS, 1997). *E. histolytica* tiene una distribución mundial, aunque como ocurre en muchas enfermedades infecciosas, afecta principalmente a países pobres o en vías de desarrollo. La presentación clínica de la amibiasis varía de la colonización asintomática en la mucosa del colon a la amebiasis intestinal invasiva caracterizada por la producción de úlceras en la pared intestinal con evacuaciones sanguinolentas. Por otro lado, la amibiasis extraintestinal más común es la hepática caracterizada por la formación de abscesos (Stanley, 2003). Actualmente se considera que el 90% de las infecciones amibianas son asintomáticas, lo que se ha atribuido a que en la mayoría de estos casos la colonización es ocasionada por *Entamoeba dispar*, una especie que es morfológicamente indistinguible de *E. histolytica*, pero aparentemente sin capacidad patogénica (Zaki, et al., 2002). Por otro lado, *E. histolytica* también puede permanecer como comensal en el lumen intestinal sin causar ninguna manifestación o enfermedad (Espinosa-Cantellano, et al., 2000). Se ha especulado que varios factores son responsables del cambio de protozooario comensal a patógeno (Mendoza-Macias, et al., 2009). Estos incluyen, entre otros, factores nutricionales (Diamond, 1982), del sistema inmune

del hospedero (Denis, *et al.*, 1988) y cambios en la flora bacteriana (Mirelman, *et al.*, 1986) .

En un estudio epidemiológico realizado en México (Paniagua, *et al.*, 2007), se analizaron con diferentes métodos de diagnóstico, muestras fecales de 300 niños (de 2 a 12 años de edad) que presentaban diarrea, y 80 niños asintomáticos que no habían tenido diarrea 45 días previos a la toma de muestra. Se encontró que el patógeno predominante fue *E. histolytica*/*E. dispar* en ambos grupos, con una prevalencia de 70.3% en pacientes sintomáticos, y del 43.7% en pacientes asintomáticos, observándose un 52% de infecciones mixtas, con otros organismos enteropatógenos, en los pacientes que presentaban síntomas.

Lo que nos lleva a suponer que la interacción con bacterias entero patógenas es un factor importante que afecta tanto la virulencia de *E. histolytica* como las condiciones intestinales y respuesta inmune en el hospedero, pudiendo propiciar la aparición de los síntomas y la progresión de la enfermedad.

### **1.1 *Entamoeba histolytica*: Biología del parásito**

El protozooario parásito *Entamoeba histolytica* corresponde a la clase *Rhizopoda* la cual se caracteriza por la emisión de pseudópodos que son extensiones deslizantes del citoplasma, pertenece al género *Entamoeba* que comprende a las amibas endoparásitas, y es un parásito exclusivo del hombre y de ciertos primates en cautiverio (R, 2006).

*E. histolytica* presenta principalmente dos estadios morfológicos: el quiste y el trofozoíto. El quiste es la forma de resistencia e infectiva, mientras que el trofozoíto es la forma invasiva y móvil del parásito (Espinosa-Cantellano, *et al.*, 2000). Los quistes de *E. histolytica* son esféricos u ovoides de 10-15µM de diámetro, tienen una pared gruesa compuesta de quitina, que le permite resistir el ácido del estómago; contienen 4 núcleos, que dan origen a 8 trofozoítos (Stanley, 2003).

El trofozoíto, o forma móvil, es muy pleomórfico, mide entre 10 y 60 µM pero más frecuentemente sus dimensiones varían entre 15 y 30 µM, su forma y movilidad son muy variables, y dependen de muchos factores como pH, potencial redox, osmolaridad, etc. (Espinosa-Cantellano, *et al.*, 2000).

## 1.2 Amebiasis

La amebiasis se adquiere, comúnmente, por la ingestión de quistes de *E. histolytica* a partir de alimentos y principalmente de agua contaminada. Durante el desenquistamiento se liberan los trofozoítos en la parte terminal del intestino delgado, de donde migran hacia el intestino grueso al que colonizan, ocasionando inicialmente una infección gastrointestinal que suele ser asintomática y sólo en pocos casos, el hospedero presenta síntomas que pueden variar desde una disentería amibiana, colitis ulcerativa amibiana, y raramente un granuloma amibiano o ameboma y apendicitis amibiana (Martinez-Palomo, *et al.*, 1989). Una vez que el trofozoíto invade el epitelio del colon, puede atravesar la mucosa intestinal y llegar a la submucosa, donde es posible que se disemine por vía sanguínea, e invada en forma extraintestinal, órganos como el hígado principalmente, y en casos más raros los pulmones y el cerebro (Goldston, *et al.*, 2012).

Las principales manifestaciones clínicas de la infección por *E. histolytica* son la colitis amibiana y el absceso hepático amebiano, sin embargo, la diferencia en la patología entre estas dos manifestaciones clínicas sugiere que *E. histolytica* utiliza un repertorio diferente de factores de virulencia en los dos órganos, o que la respuesta del hospedero en el intestino y en el hígado a la infección amibiana puede ser distinta (Stanley, 2001).

Hasta hace varias décadas se consideraban dos teorías para explicar por qué solo un 10% de los individuos infectados con este parásito desarrollan enfermedades invasoras: a) la teoría uncista, sugería que *E. histolytica* podía transformarse en patógena en el hospedero, de acuerdo a las condiciones del microambiente y b) la teoría dualista que indicaba que había dos especies de *Entamoeba*, morfológicamente indistinguibles entre sí, una patógena e invasora (*E. histolytica*) y una no invasora (*E. dispar*). Actualmente, se sabe que hay diferencias entre estas dos especies utilizando técnicas de biología molecular, como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ELISA o inmunofluorescencia indirecta (Kumate-Gutiérrez, 2008).

Recientemente se considera también que los cambios en la virulencia de los trofozoítos de *E. histolytica* están influenciados por factores del hospedero como la respuesta inmune y la interacción con bacterias de la flora microbiana o en coinfección con enterobacterias patógenas (Galvan-Moroyoqui, *et al.*, 2008).

### **1.3 Factores de virulencia**

La capacidad patogénica de *E. histolytica* se asocia directamente con la propiedad que tiene para destruir y fagocitar células del hospedero. Lo anterior involucra una serie de eventos en forma secuencial: 1) adhesión a la superficie de las células del hospedero, 2) lisis o destrucción de las células dependiente de contacto, 3) fagocitosis y 4) digestión de restos celulares ingeridos (Sateriale, *et al.*, 2011).

#### **1.3.1 Adherencia**

La lectina D-galactosa/N-acetyl-D-galactosamina (Gal/GalNac) es una adhesina de superficie importante de la amiba, y constituye el primer paso de la patogenia de *E. histolytica* dependiente del contacto. Esta adherencia a las células del hospedero, puede ser bloqueada mediante la adición de galactosa o galactosamina, lo que sugiere que los ligandos de la lectina en las células del hospedero contienen residuos de galactosa, glicoconjugados con N o O-ligandos (Chadee, *et al.*, 1987; Boettner, *et al.*, 2005). La lectina Gal/GalNac está compuesta por una subunidad pesada de 170kDa (Hgl), una subunidad pequeña de 35kDa (Lgl), que se unen mediante enlaces disulfuro y se encuentra principalmente en la superficie de la amiba como un heterodimero de 260 kDa, y una subunidad intermedia que se une de forma no covalente (Petri, *et al.*, 1989). Solo la subunidad pesada y la subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNac se unen a los residuos de galactosa, galactosamina o proteínas con glicoconjugados en la superficie de las células del hospedero (Boettner, *et al.*, 2005). Se ha observado que el uso de anticuerpos monoclonales contra la unidad pesada bloquea la adherencia, mientras que los anticuerpos contra la subunidad ligera no lo hacen (McCoy, *et al.*, 1994)).

La Hgl de la lectina Gal/GalNac es la más conservada de las subunidades, y está compuesta por una región citoplasmática, un fragmento intramembranal y una región extracelular en la que se localiza el dominio de reconocimiento de

carbohidratos (CRD) mediante el cual se une a sus ligandos. El CRD está localizado en una región rica en leucina entre los aminoácidos 895 y 998 (Dodson, *et al.*, 1999; Goldston, *et al.*, 2012); sin embargo, otros estudios utilizando fragmentos peptídicos y la línea celular CHO han sugerido que existe más de un CRD localizados en diferentes posiciones de la secuencia peptídica (Pillai, *et al.*, 1999). A su vez, por la similitud del CRD con el dominio de unión del receptor de reconocimiento del factor de crecimiento hepático (HGF), se le ha atribuido un papel en la evasión del sistema inmune mediante la competencia con el HGF para unirse al receptor c-Met HGF (Dodson, *et al.*, 1999). Tanto la Lgl como la Hgl en su dominio intracelular comparten homología de secuencias con la integrina  $\beta$ , además la Lgl tiene una región de anclaje glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), lo que sugiere que además del importante papel de la lectina Gal/GalNac en la adherencia, también juega un rol en la señalización del exterior al interior de la célula (Vines, *et al.*, 1998; Dodson, *et al.*, 1999). Además de la lectina Gal/GalNac se han identificado otras moléculas que participan en la adhesión de la ameba a las células del hospedero, dentro de estas está la adhesina de 112 kDa (EhDHA112) que forma parte del complejo de 124 kDa EhCPADH, también compuesto por una cisteína proteasa (EhCP112). Cuando se utilizaron anticuerpos contra este complejo, la capacidad de adhesión de la ameba se redujo en un 50%, así como también se redujo su citotoxicidad y capacidad fagocítica (García-Rivera, *et al.*, 1999). Los dominios intracelulares de la EhADH112 son muy divergentes a los de la lectina Gal/GalNac, por lo que también sus mecanismos de adhesión y señalización son diferentes (Banuelos, *et al.*, 2005).

#### **1.4 Citotoxicidad**

Unas de las principales proteínas implicadas en la lisis de células por *E. histolytica* son los amebaporos (Leippe, *et al.*, 1994), que son una familia de tres proteínas formadoras de poros (ameboporo A, B y C), tienen secuencias similares a las perforinas y granzimas, proteínas permeabilizadoras de membranas producidas por los linfocitos asesinos naturales (NK) en mamíferos (Andra, *et al.*, 2004). Los amebaporos pertenecen a la familia de las saponinas (SAPLIPs), las cuales se asocian con lípidos y forman poros en las membranas de células eucariotas y de

bacterias (Winkelmann, *et al.*, 2006). Estos son proteínas pequeñas, miden de 5 a 30 kDa, están contenidas en las vesículas citoplásmicas de la ameba en relación 35:10:1 de ameboporo A, B y C, respectivamente. Los ameboporos se insertan en las membranas lipídicas y forman dímeros a pH bajo. Cuando los ameboporos se dimerizan forman poros en las membranas por los cuales se ve alterado el intercambio de agua e iones, produciendo lisis celular por choque osmótico (Hecht, *et al.*, 2004). Estudios moleculares utilizando inhibición con RNA antisentido han demostrado que los trofozoítos de *E. histolytica* que expresan bajos niveles de ameboporo A presentan defectos en la citólisis y en su actividad bactericida (Bracha, *et al.*, 1999).

La mayor actividad proteolítica de *E. histolytica* se ha atribuido a proteasas de tipo cisteína (CPs), basándose en estudios en los cuales se observó la capacidad de estas proteasas purificadas para degradar los componentes de la matriz extracelular, inmunoglobulinas, proteínas del complemento y mucina (Serrano-Luna, *et al.*, 2013). La importancia de las CPs en la patogénesis de *E. histolytica* ha sido demostrada en diferentes trabajos mediante el uso de inhibidores de cisteín proteasas. Se ha demostrado que E-64, reduce el efecto citopático de la ameba en diferentes líneas celulares, así como la capacidad de formar abscesos hepáticos en los modelos in vivo (Stanley, *et al.*, 1995; Nowak, *et al.*, 2004; Galvan-Moroyoqui, *et al.*, 2008); otros estudios en los cuales se sobre-expresan diferentes CPs han mostrado que los trofozoítos con bajos niveles de expresión de algunas CPs tienen una menor capacidad de formar abscesos hepáticos (Hellberg, *et al.*, 2001; Matthiesen, *et al.*, 2013).

Por análisis de la biblioteca genómica de *E. histolytica* se han identificado siete genes que codifican para CPs (*ehcp1-6*, *ehcp112*). Tres de las CPs de *E. histolytica* denominadas CP1, CP2 y CP5 han sido purificadas y se ha encontrado que comprenden aproximadamente al 90% del total de la actividad de CPs en lisados de cultivos axénicos. Mediante análisis de Northern blot se observó que el 90% de los transcritos de CPs en trofozoítos bajo condiciones normales de cultivo pertenecen a CP1, CP2 y CP5 (Bruchhaus, *et al.*, 1996).

La CP1 de *E. histolytica* (EhCP1) se localiza en la superficie celular de la amiba. Se ha determinado por electroforesis (SDS-PAGE) que tienen un tamaño de 48kDa, con una mayor actividad proteolítica a pH 4.4 y es capaz de digerir colágeno tipo I (Scholze, *et al.*, 1988; Hellberg, *et al.*, 2001; Kisson-Singh, *et al.*, 2011).

La CP2 de *E. histolytica* (EhCP2) se encuentra localizada en la superficie celular y en las membranas internas de los trofozoítos. Se ha determinado mediante ensayos enzimáticos que tiene un tamaño de 26 kDa, mientras que por electroforesis SDS-PAGE su tamaño fue de 35 kDa. EhCP2 no es capaz de degradar colágeno tipo I o elastina pero presenta actividad contra proteoglicanos de cartílago y colágeno de membrana de glomérulos en riñón, con una óptima actividad proteolítica en un amplio intervalo de pH de 5.5 a 9.5 (Hellberg, *et al.*, 2001).

CP5 de *E. histolytica* (EhCP5) es la proteasa secretada y expresada mayormente en la superficie celular de la amiba, está involucrada directamente en la degradación de la mucina en el colon y en la invasión de los tejidos mediante la degradación de la matriz extracelular, además de participar en la evasión de la respuesta inmune al degradar inmunoglobulinas y tener la capacidad de unirse a proteínas efectoras del complemento (C3 y C5) (Jacobs, *et al.*, 1998; Moncada, *et al.*, 2006). Se ha confirmado que EhCP5 tiene la capacidad de degradar un amplio espectro de sustratos biológicos y sintéticos como mucina, fibrinógeno, colágeno, hemoglobulina, albumina de suero bovino, gelatina, IgG, Z-Arg-pNA, y Z-Ala-Arg-Arg-pNA pero no Z-Phe-Arg-pNA (Serrano-Luna, *et al.*, 2013). Presenta un tamaño de 26 y 29 kDa en electroforesis SDS-PAGE con actividad óptima en pH 5.5 a 8 (Hellberg, *et al.*, 2001). En el estudio realizado por Matthiesen *et al.*, (2013)(Matthiesen, *et al.*, 2013) la sobreexpresión de *Ehcp5* incrementó la expresión de *Ehcp1*, *Ehcp2* como la de *Ehcp5*, y los trasfectantes produjeron un absceso 3 veces mayor que el control en ratones C57BL/6. Mientras que los trofozoítos deficientes de *EhCP5* muestran una menor capacidad de producir inflamación y daño a la barrera intestinal, así como la incapacidad de inducir abscesos hepáticos amibianos (Ankri, *et al.*, 1998).

### 1.5 Patogénesis de la amibiasis intestinal

La invasión de la amiba a través de la mucosa y la submucosa es la lesión característica de la colitis amibiana (Stanley, 2003). Para que los trofozoítos invadan y se adhieran al epitelio del colon, primero debe superar la gruesa barrera protectora de moco. La capa de moco es especialmente gruesa en el colon (en ratas mide 800µm y en humanos mide de 110 a 160 mm), está compuesto principalmente por MUC2 que es secretado por las células caliciformes. El papel protector de la mucina MUC2 se debe a que está compuesta por dos grandes dominios altamente O-glicosilados resistentes a la actividad proteolítica, ya que el glicano previene el acceso de las proteasas al núcleo de la proteína (Lidell, *et al.*, 2006). MUC2 se une a la lectina Gal/GalNAc de 170 kDa con una alta afinidad, permitiendo a *E. histolytica* colonizar la superficie de la mucosa intestinal (Gottke, *et al.*, 1998). Si la lectina de la amiba se adhiere a las glicoproteínas de la mucina en el borde del lumen intestinal, se genera una infección no invasiva y asintomática, en la que el ciclo de vida del parásito continúa mediante la replicación del trofozoíto en la capa mucosa, en donde subsecuentemente, mediante la influencia de factores del hospedero y la presencia de bacterias de la flora, se inician las rutas metabólicas que llevan al enquistamiento. Estos quistes son depositados en las heces del paciente, continuando así el ciclo infeccioso (Eichinger, 2001). Sin embargo, en estos casos el potencial invasivo de la amiba aún existe y los trofozoítos pueden llegar a la disrupción de la capa de moco mediante la secreción de CPs y glicosidasas. Se ha observado que, específicamente la EhCP5 degrada a MUC2 y las proteínas de la matriz extracelular (Lidell, *et al.*, 2006; Moonah, *et al.*, 2013). A pesar de que se ha demostrado que los trofozoítos en los que se ha silenciado la expresión de *EhCP5* mediante regulación antisentido, son incapaces de degradar la barrera mucosa intacta e invadir una monocapa de células epiteliales, no se ha descartado el papel de otros EhCPs en la invasión del epitelio del colon (Moncada, *et al.*, 2006).

Si el trofozoíto penetra la capa de moco y la lectina se adhiere directamente a la N-acetil-D-galactosamina en la superficie de las células del hospedero, se activa

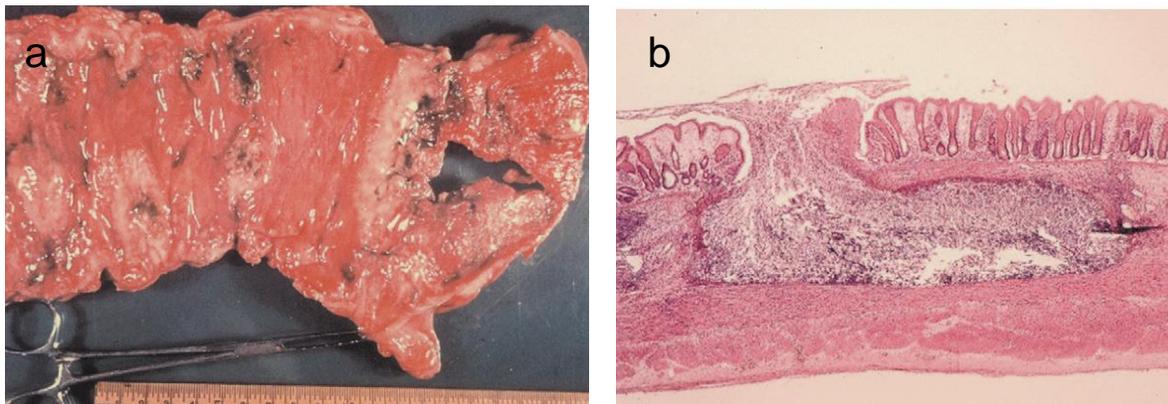
una cascada de eventos que conducen a la muerte de las células del hospedero y a la progresión de la enfermedad invasiva (Stauffer, *et al.*, 2003). Una vez que se realiza el contacto, la amiba pueda causar lisis de la célula, mediante los ameboporos y posiblemente fosfolipasas (Stanley, 2001). En las fases iniciales, los trofozoítos producen lesiones no específicas caracterizadas por engrosamiento de la mucosa, debido a hiperplasia glandular y edema estromal, con una superficie epitelial intacta pero ondulante, lo que es probablemente debido a una leve irritación del epitelio ocasionada por productos solubles de la amiba. La irritación parasitaria, estimula las células caliciformes a liberar moco, al mismo tiempo que se incrementa su producción, explicando la hiperplasia glandular. Conforme la lesión progresa se observa una depresión mucopenica debido a la pérdida de mucina en la superficie y de células glandulares epiteliales, las cuales decrecen en forma y tamaño, de columnares a cuboidales y células aplanadas (Martinez-Palomo, *et al.*, 1989; Espinosa-Cantellano, *et al.*, 2000). Al estar expuestas las células epiteliales intestinales a trofozoítos de *E. histolytica*, se secretan potentes citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y quimiocinas, como IL-8, resultando en el reclutamiento de células del sistema inmune, con infiltración de la lámina propia y del epitelio intestinal (Yu, *et al.*, 1997; Seydel, *et al.*, 1998). La primera célula inmune en aparecer en respuesta a la invasión amebiana, son los neutrofilos, que al ser activados por interferón- $\gamma$  (INF-  $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), o lipopolisacaridos (LPS) presentan actividad amebicida mediante la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Denis, *et al.*, 1989). La observación final de las lesiones ulcerosas superficiales, en la etapa temprana de la invasión, es una leve a moderada infiltración de neutrófilos en la lámina propia, en esta etapa, la infiltración celular rodea a la amiba invasora ocasionando una rápida lisis de células inflamatorias y necrosis del tejido (Espinosa-Cantellano, *et al.*, 2000).

Se han atribuido diferentes papeles a los neutrófilos durante la colitis amebiana, uno de ellos implica que su lisis por *E. histolytica* puede contribuir a causar daño del tejido mediante la liberación de sus gránulos citotóxicos (Martinez-Palomo, *et al.*, 1989; Seydel, *et al.*, 1998; Jarillo-Luna, *et al.*, 2002), otro es el papel protector

de los neutrófilos durante la colitis amibiana. La depleción de los neutrófilos mediante anticuerpos monoclonales anti-Gr-1, disminuyó la resistencia innata en ciertas cepas de ratones (CBA), pero no tuvo efecto en la cepa de ratones C57BL/6 altamente resistentes a la amibiasis intestinal (Asgharpour, *et al.*, 2005), mientras que en ratones BALB/c se demostró que los neutrófilos no son necesarios para la eliminación de la amiba en el intestino, así como tampoco para el desarrollo de las lesiones ulcerativas, pero parecen tener un papel en el desarrollo de granulomas, ya que en ausencia de neutrófilos, la formación de granulomas en el tejido infectado es favorecida, localizándose en la mucosa y conteniendo una extensa infiltración de macrófagos rodeando a los trofozoítos (Rivero-Nava, *et al.*, 2002).

Conforme la invasión progresa, las úlceras en la mucosa se extienden profundamente en amplias áreas de la submucosa, en donde el tejido subyacente ofrece poca resistencia, permitiendo la extensión de la úlcera en la forma típica de botón de camisa o matraz. Como resultado de la lisis y necrosis de células, se observa un exudado espeso compuesto de material protéico acelular, globulos rojos, y conforme más profunda es la zona eosinofílica de necrosis fibrinoide, se separa el exudado de la submucosa viable subyacente (Espinosa-Cantellano, *et al.*, 2000).

Las úlceras en forma de botón de camisa contienen trofozoítos, bacterias y células inflamatorias, y es a partir de estas úlceras que los trofozoítos pueden invadir la lámina propia, entrar al torrente sanguíneo, diseminándose con frecuencia al hígado causando los llamados abscesos hepáticos amibianos (AHA) (Tannich, *et al.*, 2003; Marie, *et al.*, 2014)



**Figura 1. Ulceración en colitis amibiana.**

a) Patología general de la colitis amibiana mostrando múltiples formaciones ulcerosas. b) Ulceración en la mucosa en la forma clásica de botón, con invasión a la submucosa.

### 1.6 Patogénesis de la amibiasis hepática

La manifestación extraintestinal más común de la amibiasis es el absceso hepático amibiano, que puede ser originado por difusión hematológica de los trofozoítos de *E. histolytica* que atravesaron la mucosa del colon (Stanley, 2003). Se ha demostrado, que la inoculación intraportal de una cepa axénica altamente virulenta de *E. histolytica* en hámsteres, ocasiona necrosis hepática extensa y eventualmente es fatal, similar a la de las etapas tardías del absceso hepático amibiano en humanos (Tsutsumi, *et al.*, 1984). En este trabajo, después de una hora de la inoculación intraportal, las amibas ya no se encontraban en las ramas de la vena porta o de las venas centrales, si no que se encontraban localizadas al azar en los sinusoides a través de los lóbulos hepáticos. Los trofozoítos presentaban una apariencia normal y se encontraban rodeados por una o varias capas de leucocitos polimorfonucleares (PMNs), los cuales en algunas ocasiones se propagaron a los sinusoides adyacentes. Tres horas posteriores a la inoculación, el hígado se encuentra tapizado con puntos blanquecinos de menos de 0.5 mm de diámetro, estos focos irregulares están formados por trofozoítos en la parte central rodeados por cientos de leucocitos PMNs y pocas células

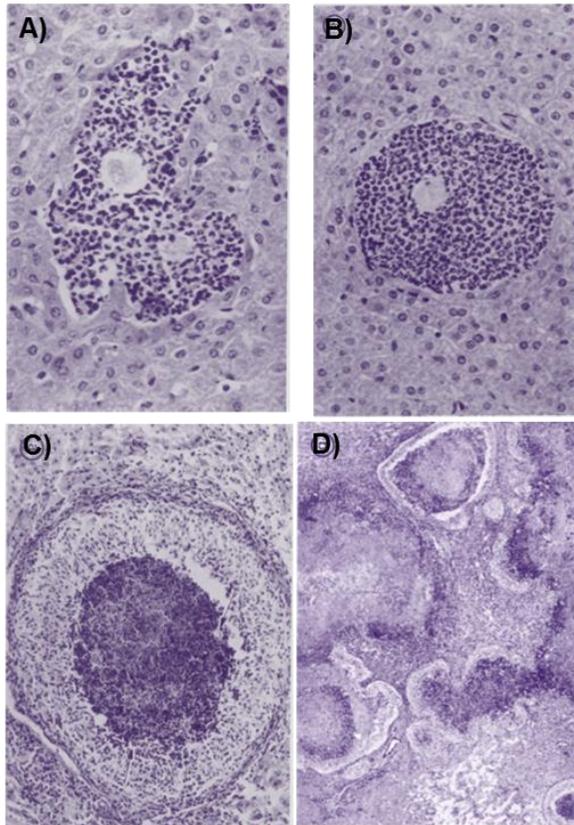
mononucleares (Figura 2A), una larga porción de la periferia de las lesiones estaba cubierta por leucocitos lisados, y al borde de la lesión se observó hepatocitos lisados, mientras que otros hepatocitos solo contenían citoplasmas vacuolados, a las 6 horas posteriores a la inoculación el número de leucocitos PMNs y células mononucleares rodeando a los trofozoítos incremento a varias capas y el foco inflamatorio comenzó a tomar una paraciencia redondeada (Figura 2B), el mayor grado de infiltración por leucocitos PMNs ocurrió entre las 9 y 12 horas después de la inoculación, mientras que el número de células mononucleares aumento proporcionalmente con el tiempo, y la cantidad de células hepáticas necróticas y PMNs lisados continúo aumentando (Tsutsumi, *et al.*, 1984). A los cuatro días posteriores a la inoculación se observaron las clásicas estructuras de granulomas amebianos, caracterizadas por estar delimitadas por una empalada de células endoteliales rodeando un centro necrótico constituido por células del sistema inmune y hepatocitos necróticos, los trofozoítos tienden a verse distribuidos entre el entro necrótico y la empleada de células que limita el granuloma (Figura 2C), para el día 5 a 7 días posteriores a la inoculación los granulomas tienden a unirse entre ellos y colapsar formando grandes áreas de necrosis esparcidas por el tejido hepático (Figura 2D), extendiéndose la infiltración de células inmunes al parénquima adyacente, con grandes cantidades de amebas rodeaban el margen exterior de la zona necrótica (Tsutsumi, *et al.*, 1984).

Macroscópicamente, las lesiones del hígado ocasionadas por trofozoítos de *E. histolytica*, están formadas por áreas del parénquima hepático substituido por material necrótico, el cual tiene apariencia amarillenta, de consistencia cremosa y se encuentra delimitado por tejido hepático congestivo (M. Shibayama, 2015)

La habilidad de algunas especies genéticamente resistentes para evitar la invasión de tejidos puede estar mediado por los siguientes factores: i) la capacidad innata de los neutrófilos y macrófagos para generar intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) e intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI); ii) la expresión de moléculas efectoras, tales como péptidos antimicrobianos, y componentes de la vía alternativa y de unión a manosa del sistema del complemento; iii) la producción de

citocinas proinflamatorias y anti-inflamatorias; iv) la actividad de células no hematopoyéticas; y v) la generación de una respuesta inflamatoria efectiva, que contribuya a la eliminación del parásito (Shibayama, *et al.*, 2008). Estudios realizados *in vitro*, demostraron que la actividad amebicida de neutrófilos humanos y macrófagos, estimulada por INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , es capaz de destruir los trofozoítos de *E. histolytica* (Denis, *et al.*, 1988; Ghadirian, *et al.*, 1988).

**Figura 2. Análisis histológico del desarrollo de las lesiones hepáticas producidas por *E. histolytica* en hámster**



A) Focos inflamatorios a las 3 horas posteriores a la inoculación, en los que se observan algunas células PMN rodeando a los trofozoítos. B) desarrollo de la lesión a las 6 horas posteriores a la inoculación de los trofozoítos, mostrando una mayor cantidad de PMN y una apariencia más redondeada del foco inflamatorio. C) Desarrollo de la clásica estructura de granulomas amebianos a los 3 días posteriores a la inoculación. D). Extensas áreas de necrosis producidas por el colapso de los granulomas observadas entre los 5 a 7 días posteriores a la inoculación. Imagen tomada de Tsutsumi, *et al.*, 1984.

Sin embargo, también se ha observado en trabajos *in vitro* que la ameba es capaz de destruir neutrófilos de humano en una proporción de 400:1 (neutrófilos: ameba), aun así, muchas de estas amebas sucumben en el proceso, mientras que las cepas altamente virulentas, emergen victoriosas después de la incubación con 3000 neutrófilos por ameba (Guerrant, *et al.*, 1981). Se ha hecho la hipótesis que

los neutrófilos no solo fallan al proteger contra la invasión de *E. histolytica*, sino que además la destrucción de estos por la amiba, libera gránulos citotóxicos y estos llevan a la muerte de hepatocitos, extendiendo el daño a células hepáticas distantes e incrementando el número de lesiones pequeñas que colapsan, desarrollando una lesión hepática más grande, que es llamada absceso hepático (Salles, *et al.*, 2003). Por otro lado, en trabajos realizados en ratones utilizando anticuerpos anti-neutrófilos, se le atribuyó a los neutrófilos un papel de protección contra la invasión de *E. histolytica* en el hígado, ya que los ratones neutropénicos desarrollaron abscesos más grandes que los ratones no depletados de neutrófilos (Seydel, *et al.*, 1998; Velazquez, *et al.*, 1998).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Interacción con bacterias

Generalmente se considera que la virulencia de *E. histolytica* está relacionada en parte a la asociación con algunas especies de bacterias (Mirelman, 1987). Principalmente, las infecciones mixtas con *Shigella dysenteriae* y *E. coli* enteropatógena pueden aumentar los signos clínicos de la enfermedad (Galvan-Moroyoqui, *et al.*, 2008).

Durante los primeros trabajos de cultivo *in vitro* con los trofozoítos de *E. histolytica*, Cleveland y Sanders (1930) encontraron que la propagación continua de la amiba era imposible en la ausencia de bacterias vivas y que los trofozoítos aislados a partir de abscesos hepáticos bacteriológicamente estériles en gatos, requería de ciertas especies de bacterias para su crecimiento exitoso (Mirelman, 1987). En 1961, se logró obtener un aislado axénico de *E. histolytica* cuando Diamond desarrolló un medio de cultivo que permitía el crecimiento de la amiba sin la necesidad de otros organismos vivos. Este avance fue conseguido después de una extenuante búsqueda de aditivos adecuados, tales como, vitaminas, extracto de hígado, suero, agentes reductivos, y otros agentes que gradualmente remplazaron y abolieron el uso de Tripanosomas o bacterias de cultivos monoxénicos (Diamond, 1968; Diamond, *et al.*, 1978). Esto permitió grandes avances en el estudio de la patogénesis de *E. histolytica* y su relación parásito-hospedero, sin embargo, los trofozoítos cultivados de forma axénica por largos periodos pierden su virulencia y capacidad patogénica, lo que se solucionó mediante la inoculación periódica de los trofozoítos en hígado de hámsteres. Así, los procedimientos de pases a través del hígado de hámster restauran y/o aumentan la virulencia de la amiba (Lushbaugh, *et al.*, 1978). Otra forma en la cual se puede recuperar la virulencia de los trofozoítos de *E. histolytica* es mediante la asociación con bacterias enteropatógenas. Los primeros estudios que confirmaron que las bacterias pueden aumentar la virulencias de trofozoítos cultivados de forma axénica, fueron realizados por Wittner y Rosenbaum (1970). En sus trabajos encontraron que la asociación de los trofozoítos con *Escherichia coli* durante al menos 6 h, antes de la inoculación en hígado de hámster,

incrementaba dramáticamente el porcentaje de animales que desarrollaban absceso hepáticos. Mientras que bacterias inactivadas por calor, homogenizado crudo de bacterias, o medio en el cual se crecieron las bacterias, probaron ser ineficientes para incrementar la virulencia de los trofozoítos crecidos en cultivo axénico. Por otro lado, también se ha observado que las bacterias pre-tratadas con inhibidores de la síntesis de proteínas, como amikacina o ácido nalidíxico, los cuales afectaron marcadamente el crecimiento bacteriano, pero no ocasionaron lisis, decrecieron la habilidad de las bacterias para estimular la virulencia de la amiba. Ninguno de estos antibióticos tuvieron efecto sobre la virulencia o el crecimiento de *E. histolytica* cuando se añadieron a cultivos axénicos (Bracha, *et al.*, 1984).

Se ha demostrado que los trofozoítos de *E. histolytica* son bastante selectivos con respecto a su interacción con diferentes especies de bacterias y sólo aquellas bacterias que poseen los mecanismos de reconocimiento apropiados se adherirán a la amiba y serán ingeridas. Numerosas cepas de bacterias producen lectinas de superficie, comúnmente en la forma de fimbrias que son ensambles filamentosos de subunidades proteicas. Entre las fimbrias mejor caracterizadas, están las lectinas fimbriales tipo 1 (específicas de manosa) de *E. coli* que consiste casi exclusivamente de una clase de subunidad con una masa molecular de 17 kDa. Estas poseen un amplio sitio de combinación correspondiente al trisacárido y preferentemente se adhieren a unidades de carbohidratos de oligomanosa o de tipo híbrido. Las fimbrias de tipo 1 también poseen una región hidrofóbica cerca del sitio de unión a carbohidratos, ya que los  $\alpha$ -manósidos aromáticos inhiben fuertemente la aglutinación de levaduras por las bacterias y la adhesión a células epiteliales ileales de cerdo (hasta 1000-veces más que  $\alpha$ -metil manósido). Los sitios de combinación de fimbrias tipo1 de la *Salmonella* y otras bacterias entéricas difieren de las de *E. coli*, en que son más pequeños y no poseen la región hidrofóbica. Aparentemente, las diversas lectinas superficiales bacterianas participan principalmente en la iniciación de la infección mediando la adherencia de la bacteria a las células epiteliales, en el tracto urinario y gastrointestinal. Las lectinas específicas de manosa también actúan tanto como moléculas de

reconocimiento en la lectinofagocitosis para macrófagos de ratón, rata y peritoneales de humano, como para leucocitos polimorfonucleares de humano (Ofek, *et al.*, 1988).

Se han detectado dos tipos de actividad de lectinas en trofozoítos de *E. histolytica*, una de ellas es la lectina sensibilidad a quitotriosa, mientras que la otra es la lectina Gal/GalNac. Dependiendo de las condiciones, ambas lectinas parecen estar involucradas en el reconocimiento y mecanismo de los trofozoítos a otras células, el mecanismo molecular de la adherencia de las bacterias a los trofozoítos de *E. histolytica* parece estar mediado tanto por la lectina de la bacteria como por la lectina Gal/GalNac de la amiba (Mirelman, 1987).

En los trabajos realizados por Verdon *et al.* (1992), demostraron que solo las bacterias que poseen fimbrias de tipo 1 pueden ser adheridas y fagocitadas por *E. histolytica*, así como también observaron mediante estudios morfológicos que las características específicas de la interacción depende en la dinámica de la distribución de los receptores de residuos de manosa. Recientemente se han estudiado moléculas que participan en procesos de internalización de la amiba, como la kinasa TMK39 la cual está involucrada en la eritrofagocitosis, es un receptor de colesterol (Christy, *et al.*, 2012) y pueda también mediar la internalización de bacterias (Boettner, *et al.*, 2008), y la proteína EhGPCR-1 la cual ha sido reconocida como un posible receptor acoplado a la proteína G (GPCR) durante la fagocitosis de la amiba, y la cual es activada por lipopolisacaridos (LPS) de bacterias de una manera dependiente de la concentración (Brewer, *et al.*, 2013).

El co-cultivo con bacterias puede restaurar la virulencia de la amiba en líneas de *E. histolytica* atenuadas a través de varias series de cultivos, y este efecto está relacionado a un aumento en la regulación de genes asociados con la fagocitosis. Específicamente, *E. histolytica* presenta un aumento en la adherencia y capacidad citotóxica, seguido de la fagocitosis de bacterias enteropatógenas (Wittner, *et al.*, 1970; Bos, *et al.*, 1977; Debnath, *et al.*, 2007; Galvan-Moroyoqui, *et al.*, 2008). En los estudios de la interacción de *E. histolytica* con enterobacterias, se ha observado un aumento en la expresión de la subunidad pesada de 170kDa de la lectina

Gal/GalNAc de la amiba incrementando su adherencia a células epiteliales, aumenta la actividad proteolítica asociada a cisteína proteasas, llevando a un aumento en el efecto citopático sobre líneas celulares como la MDCK, CHO y CaCo-2 (Debnath, *et al.*, 2007; Galvan-Moroyoqui, *et al.*, 2008). A pesar de esto, no existen trabajos recientes en los que se evalúe como la interacción de *E. histolytica* con bacterias enteropatógenas afecta al desarrollo de las lesiones amibianas in vivo, y los trabajos existentes sobre el tema son escasos y poco detallados.

**Tabla 1.** Revisión histórica de la interacción de *E. histolytica* con bacterias

<b>Referencia</b>	<b>Aportación</b>
Cleveland y Sanders, 1930	El cultivo de trofozoítos aislados de abscesos hepáticos en gatos requiere de bacterias vivas.
Ellenber, M. 1946 Bradin, J. L. y Hansen E. L. 1950	Sugirieron la necesidad de bacterias metabólicamente activas para el crecimiento de la amiba, ya que algunas veces desaparecían las amibas del intestino después del tratamiento con bactericidas, pero no con fármacos amebicidas.
Luttermoser G. W. y Phillips B. 1952	Al cultivar la cepa 200 de <i>E. histolytica</i> con bacterias de la flora intestinal de conejo, los trofozoítos producían una enfermedad aguda en la mayoría de los animales, sin embargo, observaron una menor virulencia si la amiba era cultivada con bacilos anaerobios o con tripanosomas.
Phillips B. P., <i>et al.</i> 1958	La adición de estreptococos al inóculo amibiano disminuye el tiempo de incubación de la enfermedad experimental en gatos y aumenta la mortalidad.
Phillips BP y Gorstein F. 1966	Jerbos libres de microorganismos mostraron resistentes a la infección por <i>E. histolytica</i> , pero al introducirles una sola especie de bacterias, se restablecía la patogénesis de la amiba.

Wittner M. y Rosenbaum R. M. 1970	Observaron que la asociación de trofozoítos no virulentos con <i>E. coli</i> , por al menos durante 6h antes de ser inoculados en hígado de hámsteres, incremento del 2% al 98% el número de hámsteres que presentaron abscesos hepáticos amebianos.										
Orskov I. F., et al. 1977	La pre-incubación por 1h de trofozoítos de la cepa HK-9 con una cepa de <i>E. coli</i> que se adhiere a <i>E. histolytica</i> mediante sus receptores de manosa, incrementa el efecto citopático sobre células MDCK.										
Bracha R y Mirelman D. 1984	Descartaron la posibilidad de que <i>E. coli</i> aumente la virulencia de <i>E. histolytica</i> mediante la transferencia de plásmidos, al utilizar una cepa de <i>E. coli</i> a la que se le removieron los plásmidos químicamente.										
D. G Owen, 1990	<p>Observo que el porcentaje de ratones gnobioticos-atimicos colonizados por las cepas de <i>E. histolytica</i> HK-9 y NIH:200 aumentaba y al igual que el tiempo en que permanecían colonizados al interactuar ambas cepas con <i>E. coli</i> o <i>C. perfringenes</i>:</p> <table data-bbox="537 1234 1068 1493"> <tbody> <tr> <td><i>HK9</i></td> <td>42%-14 dpi</td> </tr> <tr> <td><i>HK9/ E. coli</i></td> <td>100%-35 dpi</td> </tr> <tr> <td><i>HK9/ C. perfringenes</i></td> <td>69%-35 dpi</td> </tr> <tr> <td><i>NIH:200/E. coli</i></td> <td>100%-42 dpi</td> </tr> <tr> <td><i>NIH/C. perfringenes</i></td> <td>78%-120 dpi</td> </tr> </tbody> </table>	<i>HK9</i>	42%-14 dpi	<i>HK9/ E. coli</i>	100%-35 dpi	<i>HK9/ C. perfringenes</i>	69%-35 dpi	<i>NIH:200/E. coli</i>	100%-42 dpi	<i>NIH/C. perfringenes</i>	78%-120 dpi
<i>HK9</i>	42%-14 dpi										
<i>HK9/ E. coli</i>	100%-35 dpi										
<i>HK9/ C. perfringenes</i>	69%-35 dpi										
<i>NIH:200/E. coli</i>	100%-42 dpi										
<i>NIH/C. perfringenes</i>	78%-120 dpi										
Padilla-Vaca F., et al. 1999	Observaron una disminución en la virulencia de <i>E. histolytica</i> HM1:IMSS al mantener los trofozoítos en cultivo monoxenico por un mes, con la cepa de <i>E. coli</i> 055, que se adhiere a la amiba mediante la lectina Gal/GalNAc. Relacionaron la disminución de la virulencia con la disminución en la expresión de la sub unidad ligera de 35 kDa de la lectina Gal/GalNAc, que a su vez reducía la										

	capacidad de adherencia de la amiba a células epiteliales.
Costa et al., 2000	Estudiando la cepa <i>E. dispar</i> cercanamente relacionada y morfológicamente igual a <i>E. histolytica</i> , encontraron que al mantener las cepas de <i>E. dispar</i> ADO y MGL2 en cultivo con la floraba bacteriana del paciente del cual se aislaron, eran capaces de inducir AHA en hamasteres pero al moaxenixarlas y mantenerlas en cultivo con <i>Crithidia fasciculata</i> perdían su capacidad para inducir AHA.
Costa et al., 2000	Utilizando el modelo de ratón CH3/Hej susceptible a la amebiasis intestinal observaron que al inocular trofozoítos de HMI:IMSS axénicos se producían lesiones en el ciego del 17% de los ratones inoculados, mientras que al inocular trofozoítos previamente interactuados con <i>E. coli</i> el porcentaje incrementa a 30%, pero el aumento es mayor (60%) al inocular trofozoítos recién recuperados de AHA inducido en hámsteres.
Shing D., et al. 2004	La interacción de <i>E. histolytica</i> con <i>E. coli</i> K12 incremento la citotoxicidad de la amiba evaluada en células BHK, lo que relacionaron con un incremento de EhCP2 y EhCP5 observado mediante el uso de anticuerpos monoclonales y northerblot, además de producir apoptosis en las células BHK de forma más marcada, en comparación de cuando se expuso a las células a la amiba axénica.
Galván-Moroyoqui J. M. et al., 2008	Describen un aumento en el efecto citopático y adherencia a monocapas de células MDCK, relacionado con una mayor cantidad de la subunidad pesada de 170kDa de la lectina Gal/GalNAc sobre la superficie de la amiba, y con una mayor actividad de proteasa tipo cisteina, en trofozoítos de HM1:IMSS al interactuar por 2.5 h con <i>Shigella dysenteriae</i> y <i>E. coli</i> enteropatógena.

<p>Mendoza-Macías C. L., <i>et al.</i> 2009</p>	<p>Reafirmaron que el cultivo monoxenico de HMI:IMSS con <i>E. coli</i> 055 por periodos de 1 mes y hasta 3 meses, disminuye el efecto citopático ocasionado por la amiba, así como su adherencia a células MDCK y actividad proteolítica. Sin embargo observaron una recuperación de la actividad proteolítica y adherencia y de inducir efecto citopático a los 12 meses de co-cultivo. Encontraron que durante 1h, 3 y 12 meses de estar en cultivo monoxénico, se alteraba la expresión de genes que codifican para enzimas metabólicas, proteínas ribosomales, factores de virulencia y proteínas relacionadas con el citoesqueleto y tráfico de vesículas.</p>
<p>Reyna-Fabían et al., 2016</p>	<p>Analizaron el contenido de parásitos y bacterias en el aspirado de abscesos hepáticos en casos clínicos, encontrado que la mayoría de los AHA producidos por <i>E. histolytica</i> son mixtos con poblaciones de bacterias heterogéneas, sin un aparente grupo de bacterias específicas asociadas con <i>E. histolytica</i>.</p>
<p>Varet H. et al., 2018</p>	<p>Observaron que la interacción de <i>E. histolytica</i> HMI:IMSS con <i>E. coli</i> brinda protección a la amiba al estrés oxidativo, mediada por la inducción de una mayor expresión de genes que codifican para enzimas desubiquitinasa, oxidorreductasas (como, alcohol deshidrogenasa, malato dehidrogenasa, y piruvate:ferredoxin oxidoreductasa), así como para 17 alelos de la familia de las proteínas LRR, que por análisis estructurales muestran gran homología con el ectodominon de los receptores de tipo Toll.</p>

### **3. Justificación**

*Entamoeba histolytica* es un parásito gastrointestinal que frecuentemente se encuentra en co-infección con bacterias enteropatógenas, en estudios realizados *in vitro* se ha observado que esta interacción modifica los factores de virulencia de la amiba ocasionando un mayor efecto citopático. Sin embargo, existen escasas evidencias sobre si este fenómeno de aumento de la virulencia tiene un efecto en los modelos *in vivo* durante el desarrollo de la amibiasis.

#### **4. Hipótesis**

La interacción in vitro de *E. histolytica* con *E. coli* enteropatógena modifica la expresión de factores de virulencia de la amiba y la producción de citocinas en el hospedero durante el desarrollo de la amibiasis intestinal y hepática, lo que generará lesiones más severas in vivo.

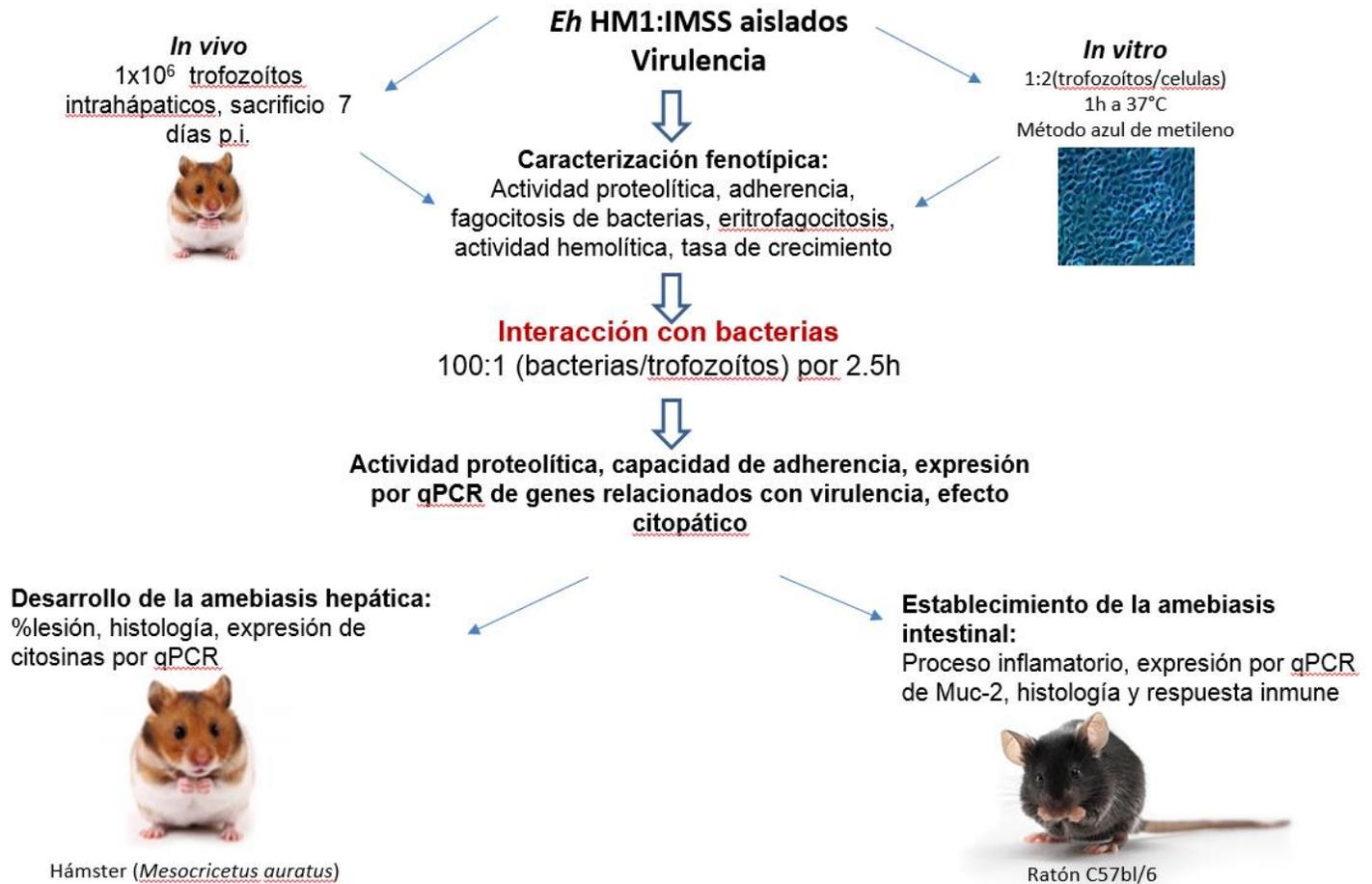
## **5. Objetivo general**

Evaluar el efecto que tiene la interacción de *E. histolytica* con las cepas de *E. coli* no patógena y enteropatógena (EPEC) sobre algunos factores de virulencia de la amiba y su efecto en el desarrollo de absceso hepático amebiano en hámsteres y en el desarrollo de la amibiasis intestinal en ratones.

## 6. Objetivos específicos

1. Seleccionar cepas de *E. histolytica* de acuerdo a su virulencia *in vivo* e *in vitro* para probar el efecto de la interacción con las cepas de *E. coli*.
2. Determinar el efecto de la interacción *in vitro* con *E. coli* no patógena y EPEC sobre factores de virulencia de *E. histolytica*.
3. Analizar el efecto de la interacción de *E. histolytica* con *E. coli* no patógena y EPEC sobre la formación de abscesos y la expresión de las citocinas durante la amibiasis hepática en hámsteres (*Mesocricetus auratus*).
4. Analizar el efecto de la interacción de *E. histolytica* con *E. coli* no patógena y EPEC en la producción de úlceras, la regulación de la respuesta inmune y la secreción de mucina, en el establecimiento de la amibiasis intestinal en ratones.

## 7. Estrategia general



## 8. Materiales y métodos

### **8.1 Cultivo de amibas**

Los trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS se cultivarán de forma axénica a 37°C en medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino adulto (SBA) al 20% (Diamond, 1961). La virulencia de la cepa se mantuvo y verifico realizando re-inoculaciones mensuales en hígado de hámster.

El inóculo se prepara a partir de cultivos de amibas en fase logarítmica de crecimiento y se ajusta utilizando un hematocitómetro.

Las condiciones a evaluar consistieron en:

- Trofozoítos de *E. histolytica* no virulenta (EhNvir) y virulenta (EhVir)
- *E. histolytica* en interacción con *E. coli* no patógena (DH5α)
- *E. histolytica* en interacción con EPEC
- Solo *E. coli* DH5α
- Solo EPEC

### **8.2 Cultivo y Transformación de bacterias con el vector pEGFP**

Se utilizaron las cepas de *Eschericia coli* DH5α (no patógena) y la cepa EPEC. Ambas se cultivaron en placas de agar LB a 37°C por 15-18 horas. Para interactuar las bacterias con la amiba, se tomó una colonia y se resembro en caldo LB a 37°C con agitación durante 15-18 horas, posteriormente se resembro 500μ del culto anterior en 10ml de medio TYI-S-33 en un matraz de 250 ml incubándose a 37°C con agitación durante 6 a 8 horas. De este cultivo se tomó 1 ml para medir la densidad óptica (DO) a 600 nm, una unidad de DO equivale a una concentración bacteriana de  $5 \times 10^8$  UFC/ml.

Para marcar las bacterias con la proteína verde fluorescente (GFP), se utilizó el vector pEGFP (ClontechLaboratories; 1020 East MeadowCircle Palo Alto, California, USA) que expresa la variante mut1 GFP, bajo el promotor del operón *lac* y que posee un gen de resistencia a ampicilina.

Las bacterias se hicieron competentes para la transformación médiante el método de CaCl<sub>2</sub>, el cual consiste en tomar una colonia bacteriana previamente incubada en agar LB por 15-18 horas a 37°C y sembrarla en 20ml de medio LB incubando con agitación por 15-18 h a 37°C. Se agregaran 500μl del cultivo anterior a 10ml

de medio TYM (0.8% triptona, 0.5% extracto de levadura, 22.5 mM NaCl; a pH 7) se incuba hasta DO= 0.2-0.8 a 600 nm, se agregan 50ml de medio TYM, se incuba hasta tener una DO= 0.5-0.9. Se transfiere a un matraz de 1 litro y se adicionará TYM hasta un volumen final de 250 ml, incubando hasta una DO=0.6. Se centrifuga a 2000 rpm durante 8 min a 4°C, se descarta el sobrenadante y se resuspende el paquete suavemente en 50 ml de TFB I (30mM KOAc pH 7, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 100mM KCl, 15% glicerol). Se centrifuga nuevamente a 2000 rpm durante 8 min a 4°C, se decanta el sobrenadante y se resuspende en 7.5 ml de TFB I(10mM MOPS, 75mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10 mM KCl, 15% glicerol). Se obtienen alícuotas de 300µl en microtubos y se congelan a -70°C. En un microtubo de 1.5 ml, previamente enfriado, se coloca 10 ng del DNA (plásmido) y se adicionan 50 µl de las células competentes congeladas a -70°C. Se mezcla por pipeteo suave y se transfiere a un tubo de vidrio, se incuba por 10 min en hielo, posteriormente se incuba durante 1.5 min en baño de agua a 42°C. Se agrega 1 ml de medio LB, y se agita durante 1 h a 250 rpm a 37°C y se siembra en agar LB con ampicilina (100 µg/ml) como marcador de selección.

### **8.3 Interacción amiba-bacteria y cinética de fagocitosis**

Un inóculo de  $1 \times 10^6$  trofozoítos de *E. histolytica* en fase logarítmica de crecimiento se transfiere a medio TYI-S-33 suplementado con 20% de SBA y se agregan  $1 \times 10^8$  bacterias de una de las cepas de *E. coli* para tener una relación amiba/bacteria de 1:100. Se incubo a 37°C durante 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas.

Después de los tiempos de incubación mencionados, se descartó el sobrenadante y se agrega medio nuevo, y se incubo en hielo durante 15 minutos, se recuperan los trofozoítos por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos, se descarta el sobrenadante y la pastilla se lava con PBS frio adicionado con 100 µg/ml de gentamicina y 5mM de azida de sodio, se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos, se descarta el sobrenadante, y se realizarán 5 lavados con antibiótico en PBS, para finalmente resuspender la pastilla en PBS frio. Se observó en el microscopio de epifluorescencia para comprobar la ausencia de bacterias no fagocitadas por las amibas. Para cuantificar las bacterias fagocitadas por las

amibas se recuperaron  $5 \times 10^5$  trofozoítos mediante centrifugación a 1500 rpm por 5 minutos, la pastilla de trofozoítos se fijó con formaldehído al 3.7% por 20 minutos, se lavó 3 veces con PBS, centrifugando a 1500 rpm cada vez, al final la pastilla se resuspendió en 500µl de PBS y se midió la fluorescencia intracelular por citometría de flujo.

#### **8.4 Cinética de degradación de las bacterias por la amiba**

Un inóculo de  $1 \times 10^6$  trofozoítos de *E. histolytica* en fase logarítmica de crecimiento se transfirió a medio TYI-S-33 suplementado con 20% de SBA y se agregaron  $1 \times 10^8$  bacterias de una de las cepas de *E. coli* para tener una relación amiba/bacteria de 1:100, se incubó a 37°C durante el tiempo máximo de fagocitosis. Después del periodo de incubación con las bacterias, se descartó suavemente el medio y se agregó medio nuevo, se colocó el tubo en el que se realizó el cultivo en hielo durante 15 minutos, se transfirió el medio a un tubo falcón de 15 ml y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se descarta el sobrenadante y la pastilla se lavó con PBS frío adicionado con 100µM de gentamicina y 5mM de azida de sodio. Posteriormente se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se repitieron los lavados 5 veces, finalmente se resuspendió la pastilla en PBS frío, se observó una muestra en el microscopio de epifluorescencia para comprobar que no queden bacterias no fagocitadas por las amibas.

Se ajustó un inóculo de  $2 \times 10^5$  trofozoítos de *E. histolytica* (previamente interaccionados con las cepas bacterianas) y se sembraron en medio TYI-S-33 suplementado con 20% de SBA a 37°C durante 2, 6, y 12 h. Posteriormente a los periodos de incubación, se colocaron los tubos de cultivo en hielo durante 15 minutos y se cosecharon los trofozoítos por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con PBS frío adicionado con 50µM de gentamicina y 5mM de azida de sodio. Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se repitieron los lavados 5 veces, posteriormente se lavó 2 veces con solo PBS para eliminar residuos de antibióticos, se observó en microscopio de epifluorescencia para comprobar que

no queden bacterias no fagocitadas. Se realizó la lisis de las amibas con triton-x-100 al 0.2% en medio LB, se tomaron 100 µl y se sembraron en diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$  en placas de LB, que se incubaron a 37°C por 24h, para posteriormente contar las UFC.

#### 8.5 Zimograma de proteasas de Entamoeba histolytica y degradación de **sustratos peptídicos sintéticos**

Para obtener los extractos de proteína total de trofozoítos, se utilizaron los trofozoítos de un cultivo en fase logarítmica, se descartó el sobrenadante y la pastilla se transfirió a un microtubo de 1.5 ml y se resuspendió en 1 ml de PBS estéril frío, se centrifugo a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en un volumen equivalente de PBS estéril frío. El paquete de trofozoítos se sometió a 3 ciclos de congelación-descongelación sumergiéndolo en nitrógeno líquido y transfiriéndolo inmediatamente a un baño de agua hirviendo por 30 segundos, y se observó al microscopio de luz para verificar la lisis de las amibas.

El extracto de proteínas se cuantifico utilizando el método de Bradford, agregando 1 µl de la muestra y 199 µl del reactivo de Bradford, se evaluó la absorbancia a 595 nm y se comparó como una curva de proteínas estándar para calcular la concentración de proteína total de cada muestra mediante regresión lineal.

La proteína del lisado se ajustó a una concentración de 2 µg de proteína en regulador de carga (Laemmli 5X). Las muestras se cargó en geles de poliacrilamida al 10% co-polimerizado con 0.1% gelatina de piel porcina y la corrida electroforetica se desarrolló a 70 V durante 15 min y 80 V por 2 h a 4°C.

El gel se lavó 2 veces por 15 min con agitación en solución de triton X-100 al 2.5%, se incubo durante la noche a 37°C en regulador de activación a pH 7 (solución de Tris-OH a 100 mM), posteriormente se lavó con agua destilada y se teñó con azul de Coomassie.

Las áreas claras que se muestran en los geles son producto de la actividad de cisteína proteinasa por degradación de la gelatina. Los geles de tres experimentos independientes se escanearon con el programa SigmaGel. El análisis de

densitometría de las bandas se realizó utilizando el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

La actividad proteolítica en general de los lisados de *E. histolytica*, se detectó mediante un método colorimétrico en el cual un sustrato peptídico benciloxycarbonil-L-arginil-L-arginina-p-nitroanilida (Z-Arg-Arg-pNA; Bachem) que puede ser degradado por toda la proteasa de tipo cisteína de la amiba, y el sustrato específico para EhCP4 Z-val-val-arg-7-amino-4- metilcoumarin (Z-VVR-AMC, Enzo Life Sciences), los sustratos al ser degradados liberan la molécula de pNA (medida por absorbancia) o AMC (medida en fluorómetro) . La mezcla de reacción consistió en 0.1 mM de sustrato en buffer de reacción (EDTA 5 mM, NaCl 50 mM, pH 7) seguido de las proteínas en lisado de la amiba (25 µg). La tasa de liberación de pNA se midió por absorbancia a 405 nm, mientras que la liberación de AMC se evaluó en un fluorómetro con excitación a 365 nm y emisión a 440 nm, cada 2 minutos, durante 20 minutos a temperatura ambiente para ambos sustratos. Una unidad de actividad enzimática se definió como el número de micromoles de sustrato digerido por minuto por mg de proteína (µM/min/mg).

### **8.6 Cultivo de células MDCK, CaCo2 y evaluación del efecto citopático**

La línea celular MDCK se cultivó en medio MEM y la CaCo2 en medio DMEM, ambos suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, hasta una confluencia del 80%.

Para evaluar el efecto citopático sobre la monocapa, se agregarán  $2.5 \times 10^5$  trofozoítos de *E. histolytica* de cada una de las condiciones a evaluar, se incubaron durante 30 min y 1 h a 37°C, después la caja se colocó sobre hielo por 15 minutos hasta que se desprendieron las amibas, se lavaron las células con PBS frío y se tiñeron con azul de metileno para observar el daño sobre la monocapa celular. Después, para degradar todas las células, se añadió 1 ml de HCl al 0.1 N a cada pocillo y se incubó la placa a 37°C durante 30 minutos. El colorante extraído de la célula se midió por espectrofotometría a 660 nm y la absorbancia cuantificada se comparó con la absorbancia de las monocapas celulares intactas no expuestas a los trofozoítos, considerado como control del 0%

de daño celular. Para evaluar la reducción en el efecto citopático producido por bloquear la adhesión de trofozoítos y por la inhibición de la actividad proteolítica, los trofozoítos se trataron con galactosa 100 mM o E-64 250 mM durante 30 min a 37 ° C, respectivamente, antes de interactuar con una monocapa de células MDCK y el porcentaje de destrucción celular se cuantificó mediante el método del azul de metileno.

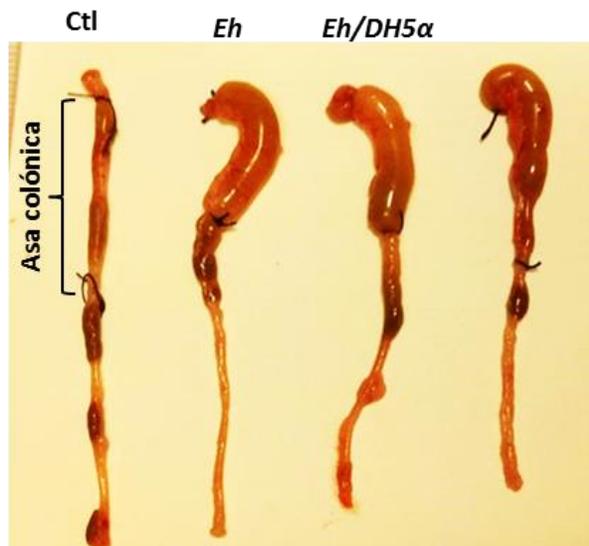
### **8.7 Establecimiento de la amibiasis hepática**

Se evaluarán 5 condiciones de inóculo: EhNvir, EhVir, EhNvir y EhVir interactuada con *E. coli* DH5 $\alpha$ , EhNvir y EhVir interactuada con EPEC, inóculo de solo *E. coli* DH5 $\alpha$ , solo EPEC; en grupos de hámsteres (*Mesocricetus auratus*) machos de dos meses de edad, con un peso de 80 a 100 g. Los hámsteres se mantuvieron en ayuno de 24 h previo a la cirugía. Posteriormente fueron anestesiados vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (Anestesal, 4.72mg/100g de peso). Se rasuro la superficie abdominal del hámster y se colocó en posición decúbito dorsal, sujetando las extremidades del animal a los lados de la mesa quirúrgica. Se realizó la asepsia de la zona abdominal con mertiolate y se realizó una incisión longitudinal de la pared abdominal en dos planos, piel y pared muscular, exponiendo el hígado, para proceder a realizar la inoculación de amibas ( $1 \times 10^6$  trofozoítos de *E. histolytica* en 200  $\mu$ l) directamente sobre la superficie hepática del lóbulo izquierdo utilizando una jeringa de tuberculina (observando la difusión subcapsular del inóculo en el hígado). La incisión abdominal fue suturada en dos planos con aguja de sutura e hilo de seda 2/0.

Después de los tiempos: 3, 12, 24, 72 y 96 h posteriores a la inoculación, los hámsteres fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico, se pesó el hígado total, se disectó la lesión hepática, que también se pesó para calcular el porcentaje de hígado con lesión (% de AHA) y se obtuvieron fragmentos representativos de tejido para extracción de RNA y otros fragmentos de la misma sección que se fijaron con paraformaldehído al 4% (pH 7.2) para análisis histológicos posterior.

### 8.8 Establecimiento de la amibiasis intestinal

Se utilizarán ratones C57BL/6 y Ratones Math1<sup>GFP</sup> (cepa 013593) con un fondo genético C57BL/6 comprados en el Laboratorio Jackson (Bar Harbor, YO). Todos los ratones utilizados tenían entre 10 y 12 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron en jaulas con filtro superior esterilizadas. El Comité de Ética Animal de la Universidad de Calgary aprobó todos los estudios. Se sometieron a un ayuno de 24 h, para posteriormente realizar la laparotomía para localizar el ciego, se realizó un nudo con hilo de seda 2/0 en el inicio del colon ascendente justo donde finaliza el ciego, y otro nudo a 1.5 centímetros aproximadamente en dirección hacia el colon transversal, para formar el asa colónica como se ilustra en la Figura 3. Por cada condición a evaluar se inocularan de  $1 \times 10^6$  trofozoítos de *E. histolytica* en 100µl de medio en el ciego o 100µl de cultivo bacteriano utilizado para la interacción con los trofozoítos. La incisión abdominal es suturada en dos planos con aguja de sutura e hilo de seda 2/0.



**Figura 3. Asas colónicas en intestino de ratón.**

Para realizar las asas se ligó con hilo el intestino en la zona en la que termina el ciego y se realizó otro nudo a 1.5-2 cm en dirección al intestino transversal. En la porción de intestino ligado se inocularon los trofozoítos en un volumen de 100µl.

Todos los ratones de cada grupo se sacrificaron a 3 horas posteriores a la inoculación, se disectó el asa colónica, se recuperó el contenido intestinal para posteriores análisis, se lavó el tejido en PBS a pH 7.2 para eliminar el excedente de sangre, segmentos de aproximadamente 3 mm se fijaron en solución de Carnoy (60% etanol, 30% cloroformo y el 10% glacial ácido acético) para posteriores análisis histológicos.

### 8.9 Tinción de hematoxilina y eosina (H&E)

Para analizar los cambios histológicos, el tejido se fijó en parafina y se realizaron cortes de 5µm con un micrótopo, los cortes obtenidos de cada tejido se montaron en laminillas de vidrio y se tiñeron con H&E, siguiendo el protocolo convencional descrito en la figura 4, para el posterior análisis con el microscopio de luz (Nikon eclipse 80i, H550L).

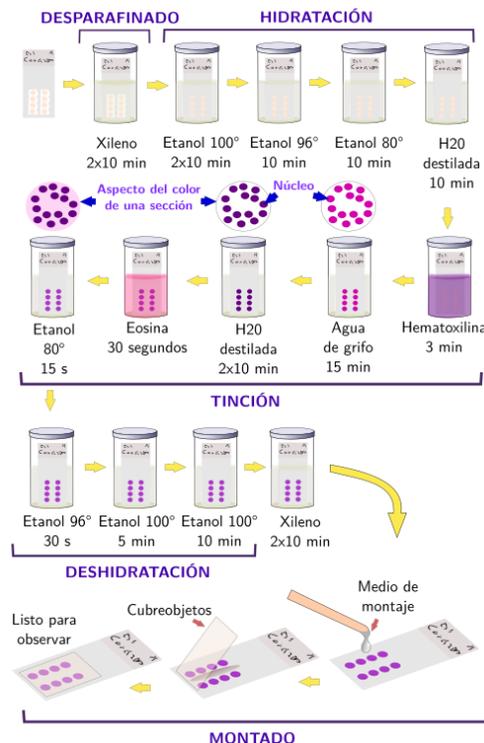


Figura 4. Protocolo de tinción Hematoxilina & Eosina.

Para observar cambios histológicos de tejido. Imagen tomada del atlas de histología vegetal y animal versión digital <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-general.php>

### **8.10 Tinción de Azul de Alciano (AA)**

Para analizar los cambios en la secreción de moco en el intestino durante la amibiasis, se utilizará la tinción de Azul de Alciano. El azul de Alciano es un grupo de tintes básicos polivalentes que son solubles en agua. El color azul se debe a la presencia de la molécula de cobre. Tiñe ácidos sulfatados y carboxilados mucopolisacáridos y glucoproteínas. Se cree que forma enlaces de sal con los Grupos ácidos de mucopolisacáridos ácidos.

### **8.11 Extracción de RNA total**

Se utilizó el método de TRIzol® (Invitrogen Life Technologies). Se agrega 1 ml de TRIzol por cada 100mg de tejido y se homogeniza durante 5 minutos. En el caso de la extracción de RNA de las amibas se utilizaron 800µl de TRIzol por cada  $5 \times 10^6$  trofozoítos, se homogenizaron por pipeteo repetitivo y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Para las muestras de tejido se tomaron de 100 a 200 µg, se agregó un 1 ml de TRIzol y el tejido se degrado con un homogeneizador. Para todas las muestras se agregaron 200 µl de cloroformo y se agitaron vigorosamente durante 15 segundos, se incubaron a temperatura ambiente por 2 a 3 min. Se centrifugo a 12,000 x g durante 15 min a 4°C, se recupera la fase superior y se transfiere a un tubo nuevo. Se agregan 0.5 ml de isopropanol al 100% por cada 1 ml de TRIzol utilizado para la lisis, se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifuga a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. Se elimina el sobrenadante dejando solo la pastilla de RNA, la pastilla se lava agregando 1ml de etanol al 75%, se agita vigorosamente y se centrifuga a 7500 x g por 5 minutos a 4°C, posteriormente se elimina el etanol, y se deja secar la pastilla por evaporación durante 5 a 10 min. Finalmente el RNA se resuspende en 30 µl de agua libre de RNAsas y se almacena a -20°C.

### **8.12 Obtención de cDNA**

El RNA se cuantificó por espectrofotometría, se utilizó 1µg de RNA tratado con 1U de DNase (Invitrogen, Life Technologies, EU.) de acuerdo al protocolo del proveedor.

Se utilizó el kit de retrotranscripción First Strand cDNA Synthesis (FERMENTAS, ThermoScientific, EU) empleando como iniciadores, secuencias de oligodT. La mezcla de reacción consiste en: 10µl de RNA+DNAsa, 1µl de OligodT (10µg/µl), 4µl de Buffer 5x, 1µl de Ribolock (20U/µl), 2µl dNTPs 10mM, 1.5µl Transcriptasa reversa M-Mul V (50 U) y 5.5 µl de agua bidestilada libre de nucleasas; en un volumen total de 25µl. La reacción se incubará a 42°C durante 45 min y es inactivada a 65°C durante 5 min.

### **8.13 PCR y RT-qPCR para factores de virulencia de la amiba y citocinas del huésped.**

Se utilizaron los oligonucleótidos indicados en la tabla 2. La mezcla de reacción para consistió en: 1µl de cDNA, 2µl de Buffer 10x suplementado con 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl de cada oligonucleótido sentido y antisentido (10 µM), 1U de Taq-polimerasa y agua bidestilada libre de DNAsas, en un volumen total de 25µl. La mezcla de reacción para los factores de virulencia de la amiba consistirá en: 1µl de cDNA, 2µl de Buffer 10x, 1 µl de MgCl<sub>2</sub> a 2.5 mM, 1µl de cada oligonucleótido sentido y antisentido (10 µM), 5U de Taq-polimerasa y agua bidestilada libre de DNAsas, en un volumen total de 20µl.

Las condiciones de la reacción para la PCR consistirán en: un ciclo de 5 min a 92°C; 40 ciclos de 30 seg a 92°C, 30 seg a las temperaturas de alineamiento indicadas en la tabla 1 y 30 seg a 72°C; seguido una incubación final de extensión por 10min a 72°C.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

Para los experimentos de amplificación cuantitativa por transcripción reversa (RT-qPCR), las reacciones se realizaron en un sistema de PCR en tiempo real Rotor-Gene 3000 (Corbett Research). Cada mezcla de reacción (total, 20 µl) contenía 100 ng de cDNA, 10 µl de mezcla maestra de qPCR de 2X SYBRgreen (n.º de

catálogo 204072; Qiagen, ciudad, EE. UU.) y cebadores a 1  $\mu$ M (2  $\mu$ l). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 40 ciclos de 95 ° C durante 15 s,  $T_m$  de acuerdo al par de cebadores utilizados durante 20 s, 68 ° C durante 20 s, y un paso de fusión adyacente (67-95 °C). Dos réplicas biológicas se analizaron por duplicado. Las diferencias relativas en la expresión génica se calcularon utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  con el software Rotor-Gene.

Como control interno para evaluar la expresión de factores de virulencia de *E. histolytica* se utilizó en gen rDNA amibiano, para la expresión de citosinas en hígado de hámster se utilizó la amplificación del gen endógeno de la enzima Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*) y para evaluar la expresión de citosinas en intestino de ratón se utilizó el gen endógeno de  $\beta$ -actina.

**Tabla 2.** . Secuencia y temperatura de alineamientos ( $T_m$ ) para amplificar genes de citosinas y de *gapdh* como control endógeno de expresión

Gen	Especie	Secuencia	$T_m$
170 kDa subunidad lectina Gal/GalNac	<i>E. histolytica</i>	F:5'-TGACCTTGGTATTATGTCTCG-3' R:3'-GTCTCCATGGTTGCATAGC-5'	59°C
EhCP1		F:5'-ATAAACACTTCACAGCAGTTGA-3' R:3'-TTCTTCATTTGTCATAGCAGC-5'	59°C
EhCP2		F:5'-TGGACCATTTGCTGCTATGA-3' R:3'-TAACATGATCCGCATTGTGC-5'	59°C
EhCP4		F:5'-GTTAACCATGGTGTGCGCTGTA-3' R:3'-GCATCATGAGCACCAGTTGGGAAA-5'	59°C
EhCP5		F:5'-AATTCATGGGGA ACTATTTGG-3' R:3'-CATCAGCAACCCCAACTGG-5'	59°C
rDNA		F:5'-ATGGTGAACAATCATACTTT-3' R:3'-AAGTTACCACAGGGATAACTG-5'	59°C

<i>il-1β</i>	Hámster ( <i>Mesocricetus auratus</i> )	F:5'-TACAACAAGAGCTTCCGGCA-3' R:5'-GGCCACAGGTATCTTGTCGT-3'	60°C
<i>IL-8</i>		F:5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGC-3' R:5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCTC-3'	58°C
<i>il-10</i>		F:5'-TGGACAACATACTACTACTG-3' R:5'-GATGTCAAATTCATTCATGGC-3'	53°C
<i>lfn-γ</i>		F:5'-CAAACAGCACCGACT-3' R:5'-GACAACCAGGCCATCC-3'	60°C
<i>tnf-α</i>		F:5'-AACGGCATGTCTCTCAA-3' R:5'-AGTCGGTCACCTTTCT-3'	50°C
<i>gapdh</i>		F:5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3' R:5'-CGACATGTGAGATCCACGAC-3'	55°C
<i>il-1β</i>	Ratón C57BL/6	GCCTCGTGCTGTCGGACCCA CTGCAGGGTGGGTGTGCCGT	56°C
<i>il-6</i>		F:5'-GCTTAATTACACATGTTCTCTGGGAAA-3' R:3'-CAAGTGCATCATCGTTGTTTCATAC-5'	59°C
<i>il-12 p35</i>		F:5'-TACTAGAGAGACTTCTTCCACAACAAGAG-3' R:3'-TCTGGTACATCTTCAAGTCCTCATAGA-5'	60°C
<i>il-10</i>		F:5'-AGTGGAGCAGGTGAAGAGTG-3' R:3'-ACGAGGTTTTCCAAGGAGTTGT-5'	60°C
<i>mcp-1</i>		F:5'-AGCCA ACTCTCACTGAAG-3' R:3'-TCTCCAGCCTACTCATTG-5'	60°C
<i>ifn-γ</i>		F:5'-GCAACAGCAAGGCGAAAAAG-3' R:3'-ATCTCTTCCCCACCCCGAAT-5'	60°C
<i>tnf-α</i>		F:5'-CACCACGCTCTTCTGTCTAC-3' R:3'-AGAAGATGATCTGAGTGTGAGG-5'	60°C
<i>Muc2</i>		F:5'-GAAGCCAGATCCCGAAACCA-3' R:5'-CCAGCTTGTGGGTGAGGTAG-3'	61°C
<i>Math1</i>		F:5'-AAAGGAGGCTGGCAGCAA-3' R:3'-TGGTTCAGCCCGTGCAT-5'	61°C
<i>actin</i>		F:5'-TGGGGTGTGAAGGTCTC-3' R:3'-CTACAATGAGCTGCGTGTG-5'	55-60

## 9. Resultados

### 9.1 Evaluación de la virulencia in vitro e in vivo de diferentes aislados de *E. histolytica* HMI:IMSS

La virulencia de los diferentes aislados de *E. histolytica* HMI: IMSS se evaluó de acuerdo con la capacidad para destruir una monocapa de células MDCK y se comparó con la capacidad de producir daño en el hígado de hámster.

Para calcular el porcentaje del AHA inducido por cada aislado, los hámsteres se sacrificaron siete días después de la inoculación intrahepática de trofozoítos. Los aislamientos amebianos nombrados A1, B1 y C1, que fueron pasados regularmente a través del hígado de hámster para mantener su virulencia, fueron capaces de producir altos porcentajes de AHA ( $39 \pm 23.7$ ,  $52 \pm 29.5$  y  $65 \pm 9.4$  % respectivamente), pero mostraron un moderado citopática efecto (CE), de destrucción menor a la mitad de la monocapa ( $30.93 \pm 9.2$ ,  $37 \pm 8.6$  y  $28 \pm 1$  %, respectivamente). Estos aislamientos se consideraron virulentos, en base al gran daño producido in vivo, a pesar del poco daño que fueron capaces de producir in vitro. Sin embargo, otro aislado denominado Pt1, que se también se pasó a través del hígado de hámster todos los meses, fue capaz de producir un gran daño en monocapas celulares ( $75 \pm 3.6\%$ ) y también producir un gran porcentaje de daño hepático ( $40.9 \pm 23.9\%$ ). Al comparar el daño in vivo e in vitro producido por los aislados A1, B1, C1 con el aislado Pt1, observamos que la virulencia determinada in vivo (AHA) fue alta de forma similar entre estos aislados, pero el EC producido por los aislados A1, B1, C1 fue relativamente bajos en comparación con el producido por el aislado Pt1, lo que nos indica que no existe una correlación entre el EC bajo con la capacidad de los aislamientos para inducir un gran daño in vivo (Tabla 3). Aun así, cuando los aislados virulentos A1, B1 y C2 se mantuvieron en cultivo durante 3 meses sin pasar por el hígado de hámster (nominados después de este periodo como A2, B2 y C2) su capacidad de EC aumentó hasta destruir más de la mitad de la monocapa de células MDCK ( $79 \pm 1.8$ ,  $55 \pm 2.2$  y  $72 \pm 3.5\%$ , respectivamente). Sin embargo, los aislamientos A2, B2 y C2 produjeron lesiones más pequeñas en el hígado de hámster de  $27 \pm 14.2$ ,  $27.3 \pm 21.8$  y  $46.6 \pm 27$  %, respectivamente, (Tabla 3).

Los aislamientos de *E. histolytica* que produjeron los porcentajes más altos de EC fueron los denominados como Pt2 y N1 ( $96\pm 1.8$  y  $85\pm 1.3\%$ , de destrucción celular in vitro respectivamente). Estos aislados no fueron pasaron regularmente a través del hígado de un modelo animal para mantener su virulencia, en cambio, Pt2 permaneció en cultivo axénico durante más de cinco años y el aislado N1 permaneció congelado durante más de 10 años, como se esperaba, ambos aislamientos fueron incapaces de producir lesiones en el hígado del hámster, lo que demuestra la pérdida de virulencia de la amiba, aunque, la capacidad de producir destrucción celular in vitro fue claramente preservada (Tabla 3). Por otra parte, un aislado denominado Xi, que se mantuvo en cultivo durante tres años, fue aun capaz de inducir daño de  $29.8\pm 9.3\%$  del total de hígado de hámsteres y produjo una destrucción celular de  $69 \pm 3.3\%$  de la monocapa de células MDCK (Tabla 3). Consideramos al aislamiento Xi de virulencia moderada debido a su capacidad de destrucción celular in vitro y al daño que es capaz de producir in vivo en comparación con los otros aislamientos evaluados.

**Tabla 3.** Análisis del Efecto citopático sobre monocapas de células MDCK y formación de AHA en hámster producido por diferentes aislados de *E. histolytica* HM1-IMSS conservados bajo diversas condiciones de cultivo.

HMI:IMSS aislados	Condiciones de conservación	% EC MDCK	Hamsteres con AHA/hámsteres inoculados	% AHA
A1	Pasados por hígado de hámster cada mes	30.93±9.2	5 / 5	39 ±23.7
B1		37±8.6	4 / 6	52 ±29.5
C1		28±10	5 / 5	65 ±9.4
A2	A1, B1, C1 aislados en cultivo por 3 meses	79±1.8 <sup>abc</sup>	4 / 8	27 ±14.2 <sup>c</sup>
B2		55±2.2 <sup>d</sup>	3 / 9	27.3 ±21.8 <sup>c</sup>
C2		72±3.5 <sup>abce</sup>	5 / 7	46.6 ±27
Xi	Tres años en cultivo	69±3.3 <sup>abcde</sup>	9 / 9	29.8 ±9.3 <sup>c</sup>
Pt1	Pasados por hígado de hámster cada mes	75±3.6 <sup>abce</sup>	9 / 9	40.9 ±23.9 <sup>e</sup>
Pt2	5 años en cultivo	96±1.8 <sup>abcdefgh</sup>	0 / 10	0
N1	10 años congelado	85±1.3 <sup>abceh</sup>	0 / 16	0

a **EC**: A1 comparado con A2\*,C2\*,Xi\*,Pt1\*,Pt2\*,N1\*

b **EC**: B1 comparado con A2\*,C2\*,Pt1\*,Xi\*,Pt2\*,N1\*

c **EC**: C1 comparado con A2\*,C2\*,Pt1\*, Xi\*, Pt2\*, N1\*; **ALA**: C1 compared with A2\*\*,B2\*, Xi\*\*\*

d **EC**: A2 compared with B2\*, Xi\*, Pt2\*

e **EC**: B2 comparado con C2\*,Pt1\*, Xi\*, Pt2\*, N1\*; **ALA**: B2 compared with Pt1\*

f **EC**: C2 comparado con Pt2\*

g **EC**: Pt1 comparado con Pt2\*

h **EC**: Xi comparado con Pt2\*, N1\*

Para evaluar el efecto citopático, los trofozoítos se cocultivaron en una proporción de 1:2 con células MDCK en monocapa al 80% de confluencia durante 1 hora a 37°C. El AHA se evaluó inoculando hámster de forma intrahepáticamente con  $1 \times 10^6$  trofozoítos. Los hámsteres se sacrificaron siete días después de la inoculación y se calculó el porcentaje de formación de AHA. Los valores representan la media con desviación estándar (DS), n=4 para el EC, la n para

AHA en hámsteres utilizada para cada aislado se indica en la tabla, los valores de significancia P se establecieron mediante la prueba U de Mann-Whitney, \* P <0.05, \*\* P <0.01, \*\*\* P <0.001.

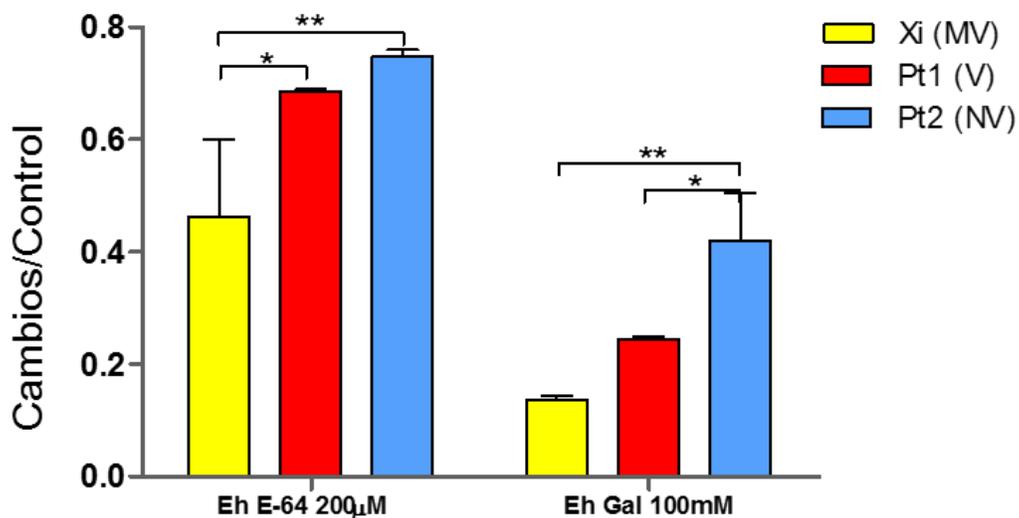
## **9.2 El uso del inhibidor de cisteína proteasas E-64 y galactosa afecta de manera diferente la capacidad del efecto citopático de *E. histolytica* X1, Pt1, Pt2 aislados.**

Los aislados Pt2, X1 y Pt1 considerados como no virulentos, moderadamente virulentos y virulentos, respectivamente, se seleccionaron para determinar si el tratamiento de los trofozoítos con E-64 y galactosa, previo a la interacción con una monocapa celular, inhibía en una manera diferente el EC producido por aislados de *E. histolytica* con diferente virulencia.

El tratamiento en la misma concentración con el inhibidor de CP E-64, afectó en diferente grado la capacidad de los aislados amebianos para destruir una monocapa de MDCK, siendo el más afectado el aislado X1 con una reducción en EC de un 54%, mientras que el EC de Pt1 se redujo en un 32% y el EC producido por el aislado Pt2 fue el menos afectado, reducido en solo un 25% (figura 5). Con el tratamiento de E-64, no se observaron diferencias significativas en la disminución de la capacidad de EC de los trofozoítos de Pt2 en comparación con Pt1, en contrasta la reducción de EC de X1 fue significativamente mayor en comparación con la reducción observado para los aislados Pt1 y Pt2 (\*P≤ 0.05, \*\*P≤0.001, respectivamente), lo que demuestra una correlación directa de una mayor capacidad de CE con la actividad de CP en nuestros aislados de *E. histolytica* evaluados.

De la misma manera, la figura 5 muestra que la galactosa 100 mM, al bloquear la adherencia de trofozoitos mediada por la lectina Gal/GalNAc, redujo el EC producido por el X1 aislado en el 86%, el producido por Pt1 en 76% y el producido por Pt2 en 68%. Estadísticamente, la reducción de la capacidad del EC del aislado Pt2 fue significativamente menor en comparación con Pt1 y X1 (\*\*P≤ 0.001, \*P≤ 0.05, respectivamente), y no se observaron diferencias entre los aislados X1 y Pt1, lo que indica que estos dos aislados tienen una capacidad

similar para adherirse a las células hospedadoras, menor que la mostrada por el aislado Pt2 no virulento. Como se observó anteriormente, el aislado Pt2 comparado con Pt1 y X1, tiene una mayor capacidad de EC, asociada a su alta actividad proteolítica y capacidad de adhesión a las células mamíferas, como se demuestra en los resultados obtenidos al usar E-64 y galactosa, estos resultados también indican una correlación de la capacidad de EC con la capacidad de adhesión y la actividad proteolítica.



**Figura 5. Impacto sobre la capacidad de efecto cotopatico de la inhibición de cisteína proteasas por E-64 y de la adherencia a células en monocapa por competición con galactosa, de trofozoítos de los aislados Xi, Pt1 y Pt2 de *E. histolytica*.**

Los trofozoítos de cada aislado se colocaron sobre una monocapa de células MDCK en confluencia en una proporción 1:2 amibas por celular, la monocapa con los trofozoítos se incubo durante 1 hora a 37 ° C. El porcentaje de daño producido para cada aislado de *E. histolytica* se normalizó a uno y se comparó con el daño producido por el mismo aislado previamente tratado con 200 µg de E-64 durante 30 minutos o con galactosa 100 mM durante 10 minutos. Las barras corresponden a la media  $\pm$  SD, n = 3, en tres experimentos independientes. La significancia se calculó por el método *t-Student*, \*P $\leq$  0.05, \*\*P $\leq$ 0.01.

### **9.3 Actividad proteolítica de los aislados de *E. histolytica* HMI:IMSS**

En los geles de zimograma, fue posible observar que los aislados Pt2, Pt1 y N1, que produjeron el EC más alto, también fueron los mismos que mostraron las bandas de degradación más intensas, indicando una mayor cantidad de CP, en comparación los aislados A1, B1, C1 y X1 (figura 6A), que produjeron un alto daño in vivo pero una baja destrucción celular in vitro, produjeron bandas de menor degradación del gel (figura 6A).

Las CP en los lisado amebianos, produjeron bandas de pesos moleculares de 70, 48, 35, 29 y 27 kDa, y los valores de la densidad de estas bandas se representaron como número de píxeles en las barras de histograma que se muestra en la figura 2B. Los datos de densitometría mostraron un mayor número de píxeles en la mayoría de las bandas de diferentes pesos moleculares producidas por el aislado Pt2, lo que indica una mayor actividad individual de CP entre todos los aislados evaluados, con la excepción para las bandas de 70 y 48 kDa que mostraron densidades similares entre el aislado Pt2 y Pt1 (figura 6B). Por otra parte, solo se encontraron diferencias significativas para la banda de 48 kDa que mostró una mayor densidad en el aislado N1 en comparación con el C1, y para la banda de 35 kDa que era más gruesa en el lisado del aislado Pt1 en comparación con C1 (figura 6B).

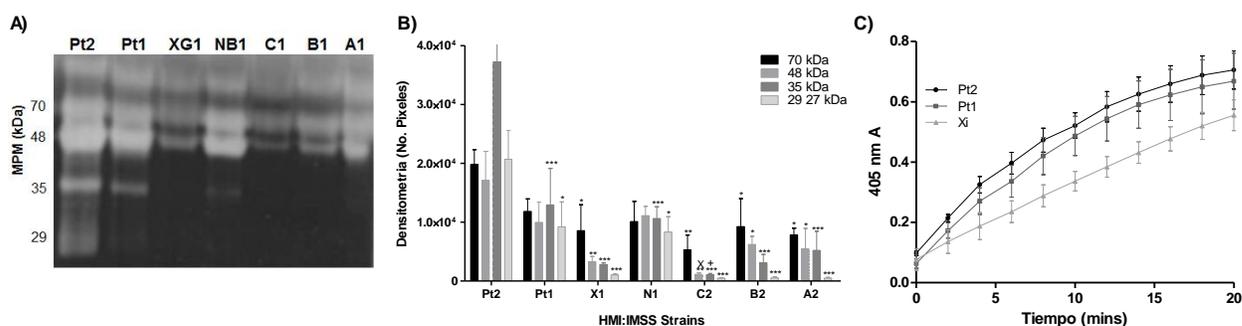


Figura 6. **Actividad de cisteína proteasas en lisados de *E. histolytica* HM1-IMSS.**

A) Zimograma representativo de 2  $\mu$ g de proteína en lisados amebiano de cada aislado de *E. histolytica* HMS-IMSS. B) Análisis densitométrico de las bandas de diferentes pesos moleculares producidas en el gel de poliacrilamida por cada aislado. C) Cinética de degradación durante 20 min del sustrato Z-Arg-Arg-pNA por los aislados X1, Pt1 y Pt2, evaluada por espectrofotometría a 405 nm. n = 4. La significancia se estableció usando la prueba *t-student* no apareada. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

Otro método ampliamente utilizado para evaluar la actividad proteolítica es la degradación de sustratos sintéticos unidos a un cloroforo. Se ha demostrado que el sustrato Z-Arg-Arg-pNA (Z-RR-pNA) puede ser degradado por *EhCP1*, *EhCP2*, *EhCP3*, *EhCP4*, *EhCP5* y *EhCP112*, mostrando la actividad en conjunto de estas proteasas en el lisado amebiano. Se evaluó mediante este método la actividad proteolítica del aislado considerado virulento (Pt1), del aislado que consideramos de virulencia moderada (X1) y del aislado Pt2 considerado como no virulento. La figura 4C muestra la cinética de degradación del sustrato Z-RR-pNA durante 20 min, mediante la cual se corroboró que entre los tres aislados el lisado del aislado Pt2 tiene la capacidad de degradaba el sustrato más rápidamente y en mayor medida ( $19.9 \pm 3.3 \mu\text{M}/\text{min}.\text{mg}$ ), seguido por el lisado Pt1 ( $17.9 \pm 4.8 \mu\text{M}/\text{min}.\text{mg}$ ), mientras el lisado de X1 fue el que produjo una menor degradación del sustrato de forma más lenta ( $16.2 \pm 3.9 \mu\text{M}/\text{min}.\text{mg}$ ). Sin embargo, la diferencia en la actividad

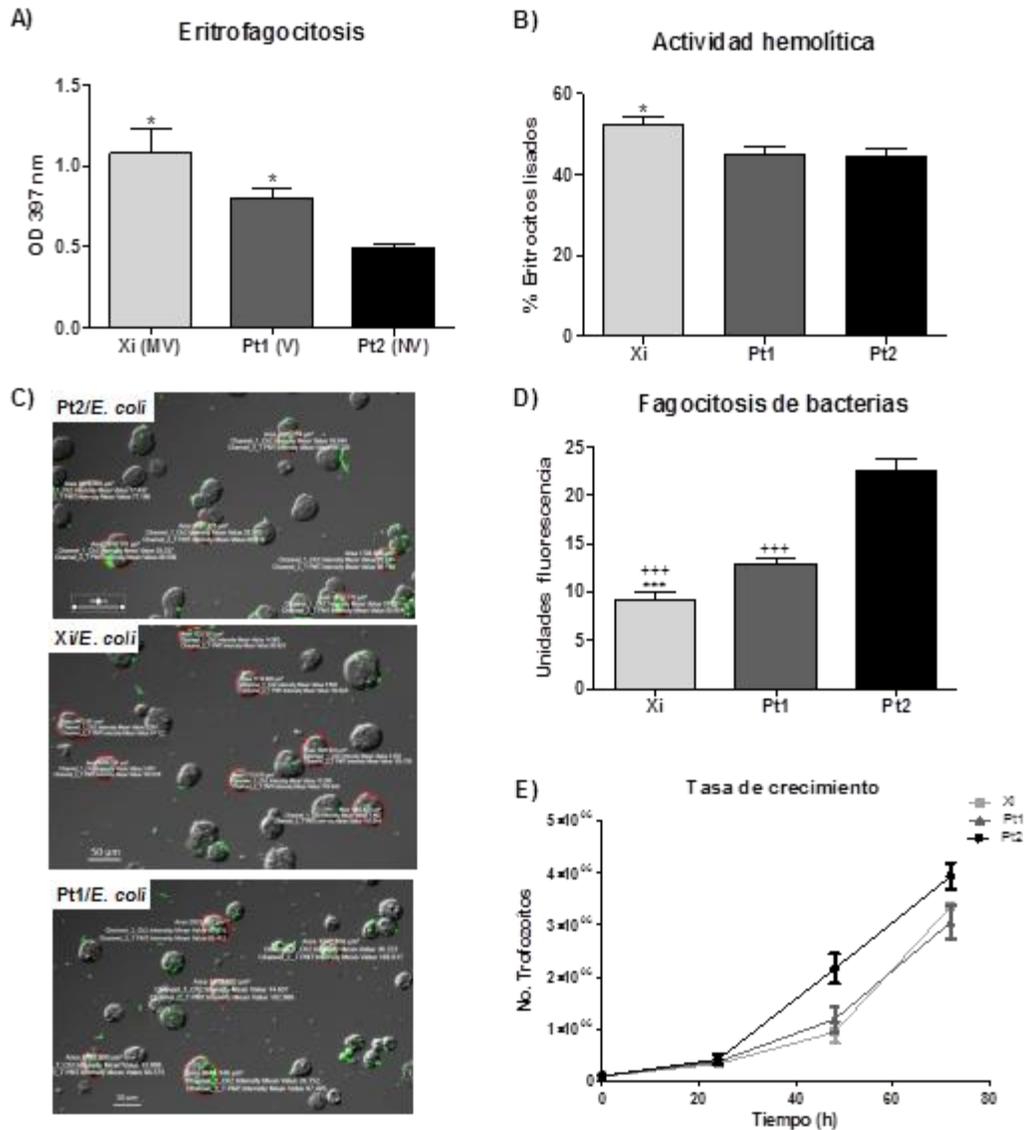
proteolítica entre estos aislados de *E. histolytica* no fue estadísticamente diferente cuando se evaluó mediante este método.

#### **9.4 Análisis de habilidad para fagocitar eritrocitos, bacterias, actividad hemolítica y tasa de crecimiento de aislados de *E. histolytica* HMI:IMSS con diferente virulencia.**

Continuamos utilizando los aislados Pt2, X1 y Pt1 de *E. histolytica* HMI:IMSS para determinar algunas de sus características fenotípicas, específicamente la capacidad de fagocitar eritrocitos y bacterias, su actividad hemolítica y la tasa de crecimiento de los trofozoítos en cultivo axénico.

La capacidad fagocítica es esencial para la supervivencia de los trofozoítos, además que la eritrofagocitosis se ha considerado un factor determinante del grado de virulencia de las cepas de *E. histolytica*. Entre los aislados evaluados en este trabajo, X1 considerado de virulencia moderada mostró la mayor capacidad para fagocitar y lisar eritrocitos, sin diferencia significativa con el aislado virulento Pt1 en eritrofagocitosis, mientras que el aislado no virulento Pt2 presentó la menor capacidad de eritrofagocitosis, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la actividad hemolítica con el aislado Pt1 (figura 7A y 7B).

En cuanto a la fagocitosis de bacteriana, observamos la capacidad opuesta entre los aislados en comparación con la capacidad de eritrofagocitosis. En la figura 5C se muestran las unidades de fluorescencia intracelular (UF) en los trofozoítos dadas por la fagocitosis de bacterias marcadas con GFP. Al cuantificar las UF intracelular en 100 trofozoítos de cada aislado y representarlas en un histograma (figura 7D), observamos que el aislado X1 fagocito la menor cantidad de bacterias ( $6.6 \pm 0.77$  UF), seguido de Pt1 ( $12 \pm 0.64$  UF) y al contrario de su capacidad de eritrofagocitosis, Pt2 fagocitos la mayor cantidad de bacterias ( $19.8 \pm 0.77$  UF).



**Figura 7. Caracterización fenotípica de los aislados de *E. histolytica* X1, Pt1 y Pt2.**

A) La eritrofagocitosis se determinó por espectrofotometría a 400 nm midiendo el contenido de hemoglobina en lisado de trofozoitos después de la interacción ameba/eritrocito durante 30 minutos, n = 3 en tres experimentos independientes. B) La capacidad de los trofozoitos para lisar eritrocitos se evaluó de acuerdo al hierro liberado en el sobrenadante medido por espectrofotometría a 540 nm, después de 1 h de incubación de ameba/eritrocito, n = 3 en tres experimentos independientes. C) Microscopía confocal representativa de la interacción ameba /

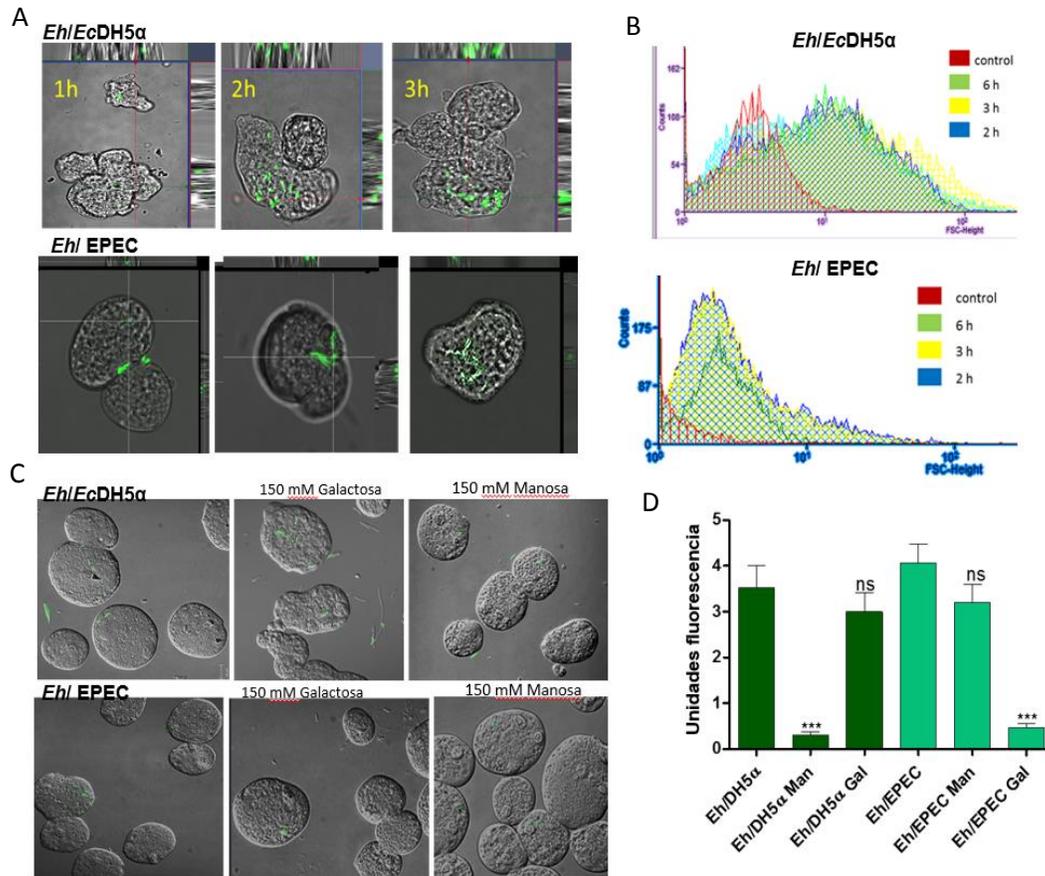
bacteriana durante 30 minutos a 37°C. D) Histograma de cuantificación de la fluorescencia intracelular de los trofozoítos emitidos por las bacterias fagocitadas. La fluorescencia intracelular se cuantificó en 100 trofozoítos para cada condición en dos experimentos independientes. E) Tasa de crecimiento comparativo de Pt2, Xi y Pt1 aislados, los trofozoítos se contaron en un hematocitómetro 24, 48 y 72 h después de sembrar  $1 \times 10^5$  trofozoítos en tubos con 12 ml de medio completo TYI-S33. En los ensayos de eritrofagocitosis, actividad hemolítica y evaluación de la tasa de crecimiento se utilizó una  $n=3$ . Los gráficos se representan como media  $\pm$  SD, la significancia P se calculó por el método de *t-student*, \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\*\* $P \leq 0.001$  Pt2 en comparación con X1 y Pt1; \*\*\* $P \leq 0.001$  Pt1 en comparación con X1.

De acuerdo con estos resultados, la diferente capacidad de fagocitosis selectiva entre eritrocitos y bacterias, presentada por los aislados amebianos, no parece estar relacionada con la virulencia de los trofozoítos, ya que entre dos aislamientos de *E. histolytica* considerados virulento y de moderada virulencia no se observó diferencia en la capacidad de eritrofagocitosis. En el caso de la fagocitosis de bacterias, a pesar de que fue más alta en el aislado virulento Pt1 en comparación con el aislado Xi moderadamente virulento, fue el aislado Pt2 no virulento el que fagocitó más bacterias entre los tres.

Bajos las mismas condiciones de cultivo axénico, se evaluó la tasa de crecimiento después de sembrar  $1 \times 10^4$  trofozoítos por cada aislado. No se observaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento a las 24 h de cultivo entre los tres aislados (X1, Pt1 y Pt2), pero a las 48 y 72 h de cultivo, se observó un aumento significativo en el número de trofozoítos en el aislado Pt2 en comparación con el X1 y Pt1. Entre los aislados Pt1 y Xi no mostraron diferencias significativas en su tasa de crecimiento en ninguno de los tiempos evaluados (figura 7E), lo que sugiere una mayor adaptación del aislado de Pt2 para replicarse en las condiciones de cultivo utilizadas.

### **9.5 Fagocitosis de *E. coli* DH5 $\alpha$ y EPEC por *E.histolytica* y degradación intracelular de las bacterias por la amiba**

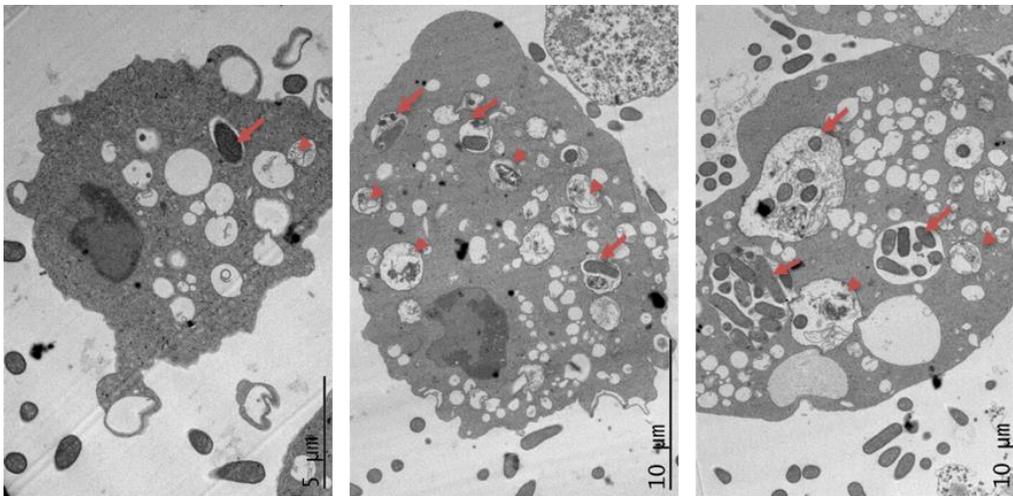
A través de una cinética de 1h a 6h, observamos una mayor unidad de fluorescencia intracelular en la amiba, dada por las bacterias EPEC y *E. coli* DH5 $\alpha$  expresando GFP, entre 2 y 3 h de interacción (figura 8A). La fagocitosis se evaluó mediante microscopía confocal y citometría de flujo como se muestra en la figura 8A y 8B, respectivamente. De acuerdo con los valores obtenidos al evaluar la fagocitosis de las bacterias, se decidió utilizar 2.5h para interactuar los trofozoítos con la bacteria para posteriores experimentos, ya que la mayor cantidad de bacterias fagocitadas se observó entre las 2 y 3 horas.



**Figura 8. Fagocitosis de EPEC y *E. coli* DH5 $\alpha$ , transformadas para expresar GFP, por trofozoítos de *E. histolytica*.**

A) Imágenes tomadas por microscopía confocal después de 1, 2 y 3 horas de interacción de los trofozoítos con EPEC y *EcDH5 $\alpha$*  independientemente. B) valores obtenidos por citometría de flujo de la fagocitosis de EPEC y *EcDH5 $\alpha$*  independientemente durante 1,2,3,4,5 y 6 horas. C) Imágenes tomadas por microscopía confocal después de 30 minutos de interacción de los trofozoítos con EPEC y *EcDH5 $\alpha$*  independientemente sin agregar galactosa o manosa y al agregar los azúcares. Para cada experimento se realizaron tres replicas independientes, para cuantificar la disminución de la fagocitosis de las bacterias al agregar los azúcares se cuantificó las UF de treinta trofozoítos por condición en cada experimento. La significancia se calculó mediante el ensayo estadístico t-student, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

También se corroboró por microscopía confocal que las bacterias EPEC y *E. coli* DH5 $\alpha$  (*EcDH5 $\alpha$* ), son fagocitadas mediante diferentes mecanismos de adherencia, que involucran a la lectina Gal/GalNAc ya que la adición de galactosa redujo la fagocitosis EPEC, y a los receptores de manosa en *E. coli* ya que la adición de manosa redujo la fagocitosis de *EcDH5 $\alpha$*  por los trofozoítos (figura 8B). Las UF intracelular en la amiba dadas por la fagocitosis de EPEC y *EcDH5 $\alpha$* , sin la adición y con la adición de galactosa o manosa se representan en el histograma ilustrado en la figura 8C.



**Figura 9. Foto de microscopía electrónica ilustrando la fagocitosis de EPEC por trofozoítos de *E. histolytica* a 12 horas de interacción amiba/bacteria.**

Las flechas indican vacuolas fagocíticas que contienen estructuras bacterias intactas, las cabezas de flecha indican vacuolas con estructuras bacterianas en proceso de degradación o degradadas.

Por microscopía electrónica, pudimos observar que después de 12 horas de interacción de la amiba con EPEC, los trofozoítos presentaban vacuolas fagocíticas con estructuras bacterianas degradadas o en proceso de degradación al mismo tiempo que poseían otras vacuolas con estructuras bacterianas intactas, lo que nos indica que la fagocitosis de bacterias por la amiba es un proceso de continua ingestión y degradación (figura 9).

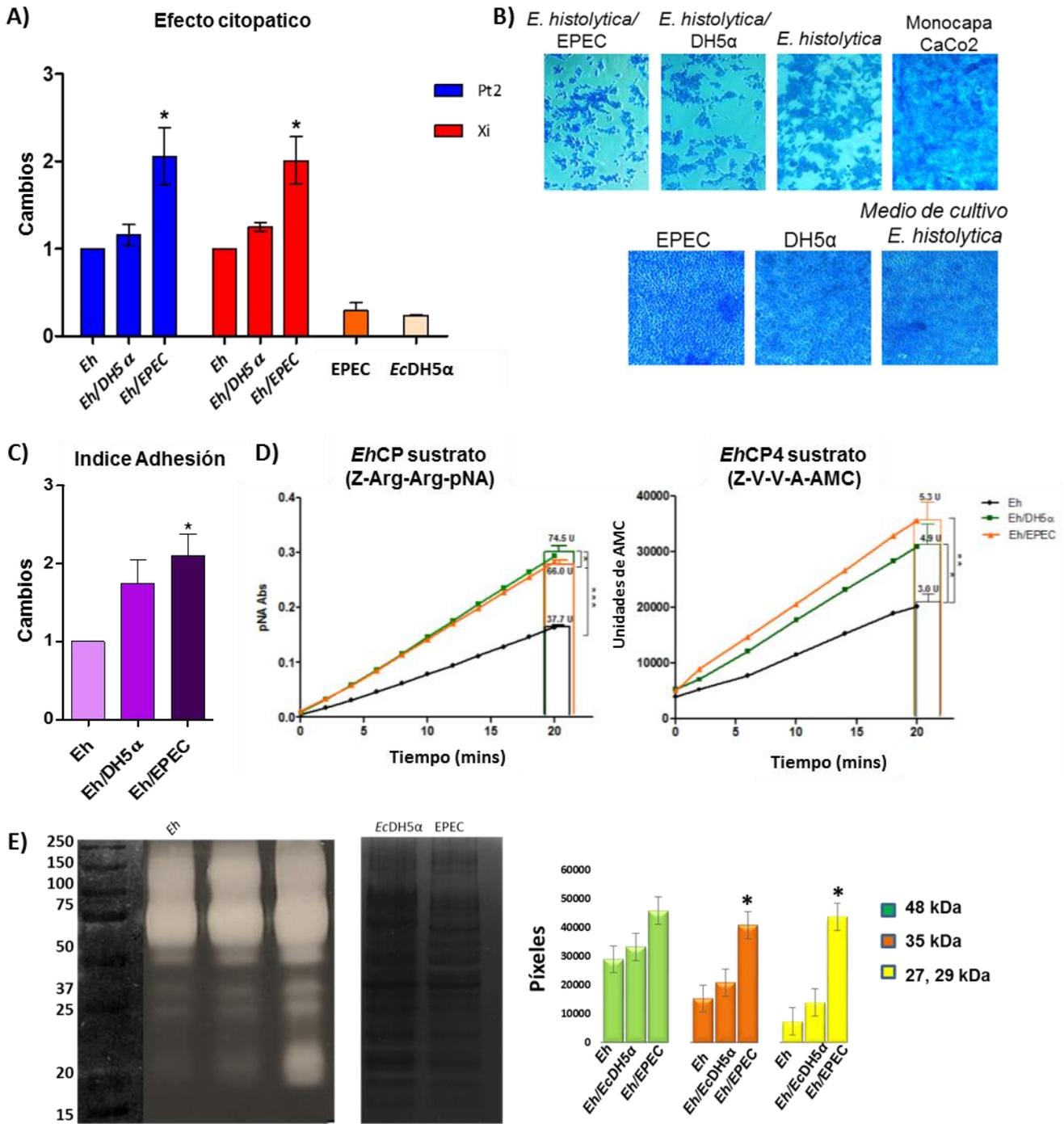
### **9.6 Efecto de la interacción de *E. histolytica* con *E. coli* DH5 $\alpha$ y EPEC sobre la virulencia in vitro del parásito**

Para evaluar el efecto sobre la virulencia de trofozoítos como resultado de la interacción con EPEC y con EcDH5 $\alpha$ , se seleccionaron dos aislados de *E. histolytica* HM1-IMSS, el aislado Pt2 considerado no virulento (*EhNvir*) por ser incapaz de producir AHA en hámster, y el aislado Xi que produjo alrededor del 30% de daño hepático en los hámsteres y considerado como virulento (*EhVir*). Cuando se evaluaron las características fenotípicas de ambos aislados, el aislado *EhNvir* mostró una mayor capacidad de efecto citopático, una mayor actividad proteolítica, más capacidad de adherirse a las células epiteliales in vitro y una mayor capacidad para fagocitar bacterias en comparación con el aislado *EhVir*.

La interacción *E. histolytica*/EPEC (*Eh*/EPEC) durante 2.5 horas, duplicó la capacidad de efecto citopático producido sobre monocapas de células CaCo-2, de forma similar en ambos aislados ( $2.06\pm 0.32$  para *EhNvir* y  $2.01\pm 0.27$  para *EhVir*), mientras que la interacción con EcDH5 $\alpha$  no aumentó significativamente el efecto citopático ( $1.16\pm 0.1$  para *EhNvir* y  $1.25\pm 0.05$  para *EhVir*) (figura 10A). Cuando las monocapas de células CaCo2 se expusieron solo a las bacterias EPEC y EcDH5 $\alpha$ , se cuantificó un pequeño daño en la monocapa celular (Figura 10B). Sin embargo, al analizar por microscópico la morfología de las monocapas celulares expuestas a bacterias, no se observó daño a las células (figura 10B). Dado que el efecto citopático se evaluó mediante el método de azul de metileno, que consiste en medir el colorante absorbido por las células, y calcular el porcentaje de daño a la monocapa al comparar el valor medido con el dado por el colorante absorbido por monocapas intactas como control de 0% daño, es probable que la disminución del colorante absorbido pudo producirse para una respuesta normal de las células epiteliales a los componentes bacterianos, caracterizada por liberación de citoquinas proinflamatorias que inducen interrupción de las uniones estrechas entre las células y pérdida de la continuidad en la monocapa.

El aumento en el efecto citopático después de la interacción *Eh*/EPEC se correlacionó con un incremento en la adherencia de los trofozoitos a la monocapa celular (aumento de  $2.1 \pm 0.27$  unidades), mientras que la adherencia de los trofozoitos después de la interacción *Eh*/*EcDH5 $\alpha$*  también aumentó ( $1.75 \pm 0.29$ ), aunque las diferencias no fueron significativas cuando se compararon con los trofozoitos axénicos (Figura 10C).

Además, la actividad de cisteína proteasa aumentó considerablemente en el lisado de los trofozoitos después de interactuar con ambos serotipos de bacterias, como se observó por la degradación del sustrato sintético Z-Arg-Arg-pNA ( $37.7 \pm 0.75$  por *Eh* axénico,  $74.5 \pm 2.7$  por *Eh*/*EcDH5 $\alpha$*  y  $65.9 \pm 1.9$  por *Eh*/EPEC, unidades enzimáticas degradadas), y por la degradación del sustrato Z-Val-Val-Arg-AMC específico para *Eh*CP4 ( $3.0 \pm 0.2$  por *Eh* axénico,  $4.8 \pm 0.57$  por *Eh*/*EcDH5 $\alpha$*  y  $5.3 \pm 0.45$  por *Eh*/EPEC, unidades enzimáticas degradadas), sin observar diferencias



**Figura 10. Cambios en factores de virulencia de *E. histolytica* al estar en interacción con EPEC o *EcDH5α* durante 2.5 h.**

A) Efecto citopatico sobre monocapa de células CaCo2 evaluado por el método de azul de metileno. B) Análisis morfológico por microscopia del daño inducido a monocapas de células CaCo2 después de teñirlas con azul de metileno y de ser fijadas. C) Índice de adhesión de trofozoítos a una monocapa de células CaCo2 a

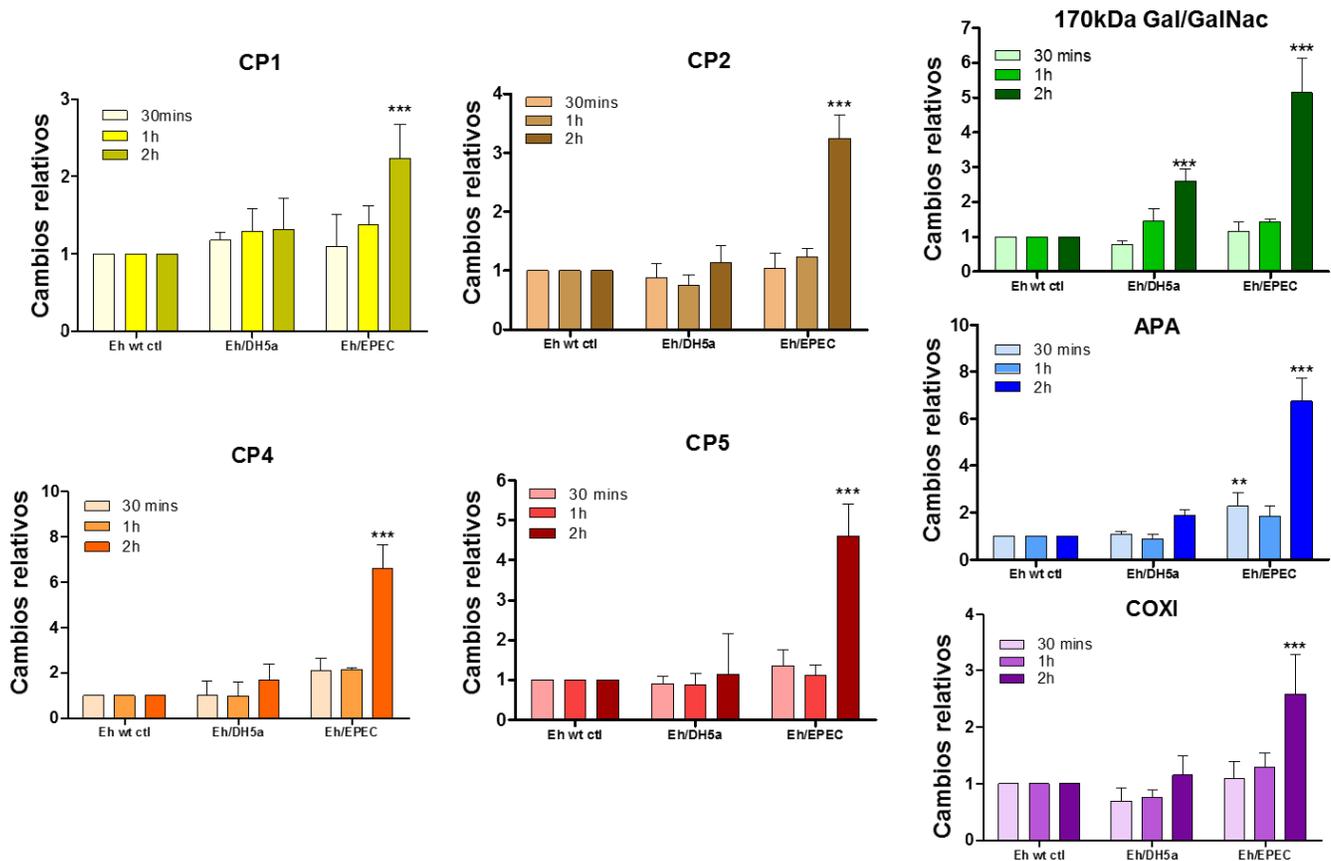
los 30 minutos. D) Cinética de degradación de los sustratos sintéticos Z-Arg-Arg-pNA y Z-Val-Val-Arg-AMC por 25 µg de proteínas en lisado de amibas. E) Zimograma de gelatina porcina en el que se observa un incremento de la actividad proteolítica de los lisados de la amiba después de interactuar con las bacterias, en el histograma de la izquierda se representa en número de pixeles la densidad de las bandas de diferentes pesos moleculares producidas por cisteína-proteasas en los lisados de *E. histolytica*. Los datos se muestran como media de al menos tres experimentos independientes con DS. La significancia se calculó por el método de t-student, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

significativas entre la degradación de ambos sustratos por los trofozoítos interactuados con *EcDH5α* y con EPEC (figura 10D). Sin embargo, mediante la degradación de la gelatina porcina en zimograma, observamos un aumento significativo en la banda de 27, 29 kDa ( $1.38 \pm 0.09$  unidades) en el lisado de la interacción Eh/EPEC en comparación con los lisados de *Eh/EcDH5α* y de trofozoítos axénicos (figura 10E)

### **9.7 Cambios en la expresión de genes relacionados a la virulencia de *E. histolytica* durante la interacción con *E. coli* DH5α y EPEC**

A través de una cinética de 30 minutos, 1 hora y 2 h se evaluó los cambios en la expresión de genes que codifican factores de virulencia de *E. histolytica* durante la interacción *EhVir/EcDH5α* o *EhVir/EPEC*. Observamos que la expresión de *EhCP1*, *EhCP2*, *EhCP4* y *EhCP5*, aumento significativamente  $2.23 \pm 0.25$ ,  $3.24 \pm 0.39$ ,  $6.61 \pm 0.59$ ,  $4.6 \pm 0.46$  unidades, respectivamente, solo después de 2 horas de la interacción *EhVir/EPEC*, al igual que el gen que codifica para la enzima ciclooxigenasa (COX) cuya expresión aumentan  $2.59 \pm 0.39$  unidades (figura 9). El gen que codifica para la proteína Amoebaporo A, se sobreexpresó desde los 30 minutos de la interacción *EhVir/EPEC* ( $2.27 \pm 0.33$  unidades) y aumentó gradualmente a  $6.76 \pm 0.56$  unidades en 2h (Figura 11). Mientras que la subunidad pesada de la lectina Gal / GalNAc (Hgl), se sobreexpresó a las 2 h de la

interacción *EhVir/EcDH5 $\alpha$*  ( $2.6\pm 0.19$  unidades) y  $5.14\pm 0.56$  unidades en *Eh/EPEC* (figura 11).



**Figura 11. . Cambio relativo en la expresión de genes del aislado *E. histolytica* Vir en durante la interacción con *EcDH5 $\alpha$*  o EPEC.**

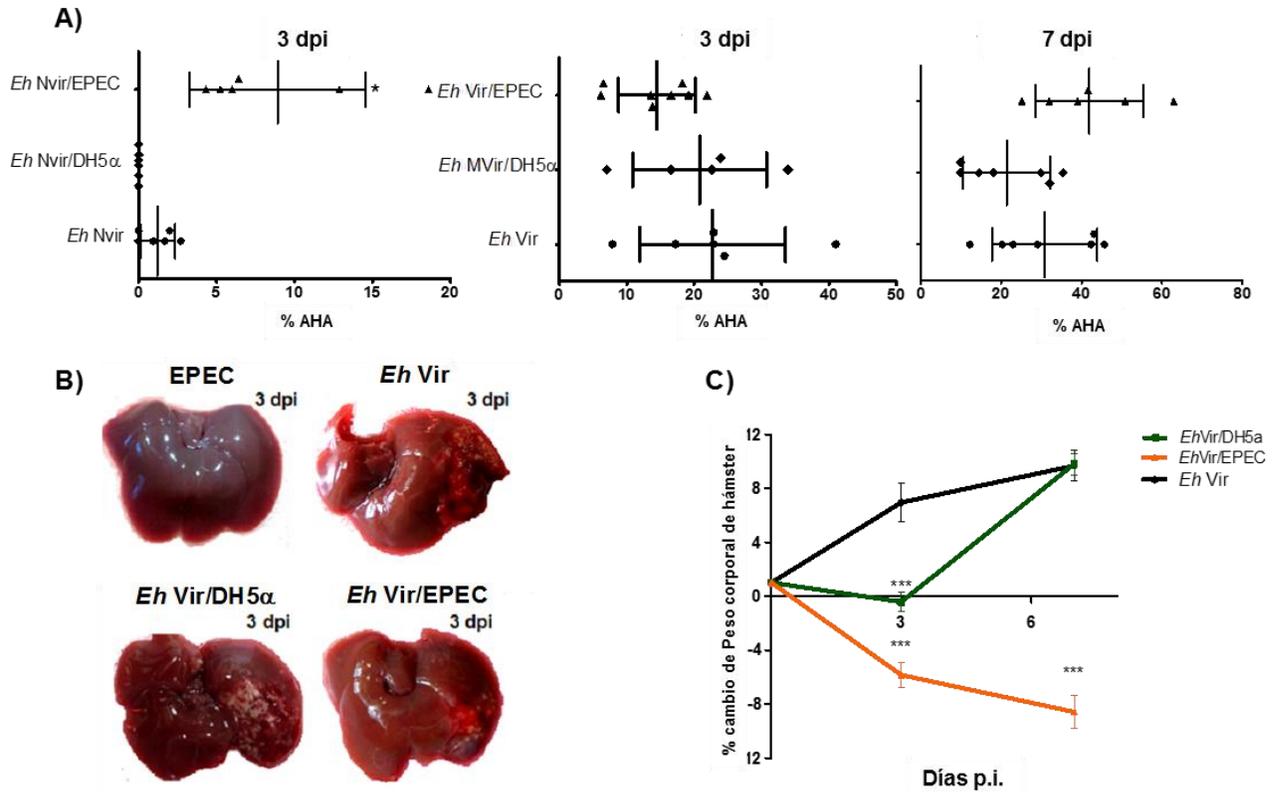
Cinética de expresión génica durante 30 mis, 1h y 2h evaluada mediante qPCR, tomando como expresión basal el aislado axénico *EhVir*. El gen de rDNA de *E. histolytica* se utilizó como control endógeno de expresión. Los datos se muestran como la media de tres experimentos independientes con dos réplicas técnicas cada uno  $\pm$ SD. El valor de p se calculó por *Student-t-test*, \* p <0.05, \*\* p <0.01, \*\*\* p <0.001

### **9.8 Comparación de la producción de AHA en hámsteres al inocular trofozoítos de *E. histolytica* axénica con trofozoítos interactuados con *EcDH5α* o EPEC**

A pesar del aumento en los factores relacionados con la virulencia de la ameba inducido por la interacción *Eh*/EPEC, al inocular de forma intrahéptico trofozoítos de *EhVir*/EPC solo se produjo un daño leve en hígado de hámsters después de 3 días posinoculación (dpi), lesión de 8.9% comparado con 1.2% producido por los trofozoítos de *EhNvir* axénicos (figura 12A). Sin embargo, este aumento en el daño no fue suficiente para que los hámsteres no lo pudieran solucionar por sí solo después de 7 dpi. Mientras que en los hámsteres inoculados con *EhNvir*/*EcDH5α* no se observó daño, incluso a los 3 dpi (figura 12A). No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de AHA a los 3 dpi con el aislado *EhVir* axénico, *EhVir*/*EcDH5α*, o con *EhVir*/EPEC (22.7±4.42, 20.8±4.43, 14.5±2 % de AHA, respectivamente), así como tampoco se observaron diferencias significativas en los porcentajes de AHA a los 7 dpi (30.8±4.9, 21.4±4 y 41.9±5.5 % de AHA producido por *EhVir* axénico, *EhVir*/*EcDH5α*, o por *EhVir*/EPEC respectivamente) (figura 12A). Cuando se inocularon solo bacterias no se observó daño en el hígado del hámster, y no se observaron diferencias en el tipo de lesión hepática en hámsteres, que pudieran ser el resultado de componente bacteriano al inocular trofozoítos interactuados con *EcDHA5α* o EPEC comparado con las lesiones producidas por trofozoítos axénicos (figura 12B).

A pesar de que no se observaron cambios significativos en el porcentaje de AHA, el peso corporal de los hámsteres inoculados con *EhVir*/EPEC disminuyó considerablemente (5,83 ± 2,5%) a los 3 dpi y continuó disminuyendo hasta 8.5±3.2% menos a los 7 dpi (figura 12C). En comparación, el peso de los hámsteres inoculados con *EhVir*/*EcDH5α* disminuyó ligeramente (0.4±1.5%) y los hámsteres inoculados con trofozoito axénico del aislado *EhVir* aumentaron en peso un 6.96±3.1% a los 3 dpi, mientras que a los 7 dpi, los hámsteres inoculados

con ambas condiciones *EhVir/EcDH5α* y *EhVir* axénico, aumentaron de manera similar en peso un  $9.8 \pm 1.6$  y  $9.68 \pm 3.07$  %, respectivamente (figura 12C).



**Figura 12. Diferencias patológicas en hámsteres inoculados con los aislados axénicos de *E. histolytica* Nvir y Vir e interactuaron con *EcDH5α* o EPEC durante 2.5 h.**

(A) Porcentaje de AHA inducido para trofozoíto axénico en comparación con trofozoíto interactuados con *EcDH5α* y EPEC. (B) Fotos macroscópicas de hígados en los cuales se representa que no se produjo daño hepático para la inoculación de EPEC, y no se observaron diferencia en el tipo de absceso producido para los trofozoíto axénicos o interactuados con las bacterias. (C) Cambios en los pesos corporales de hámsteres a los 3 y 7 días después de la inoculación con trofozoíto axénicos o interactuados con las bacterias. Por lo menos seis hámsteres fueron evaluados para cada tiempo y condición. Los datos

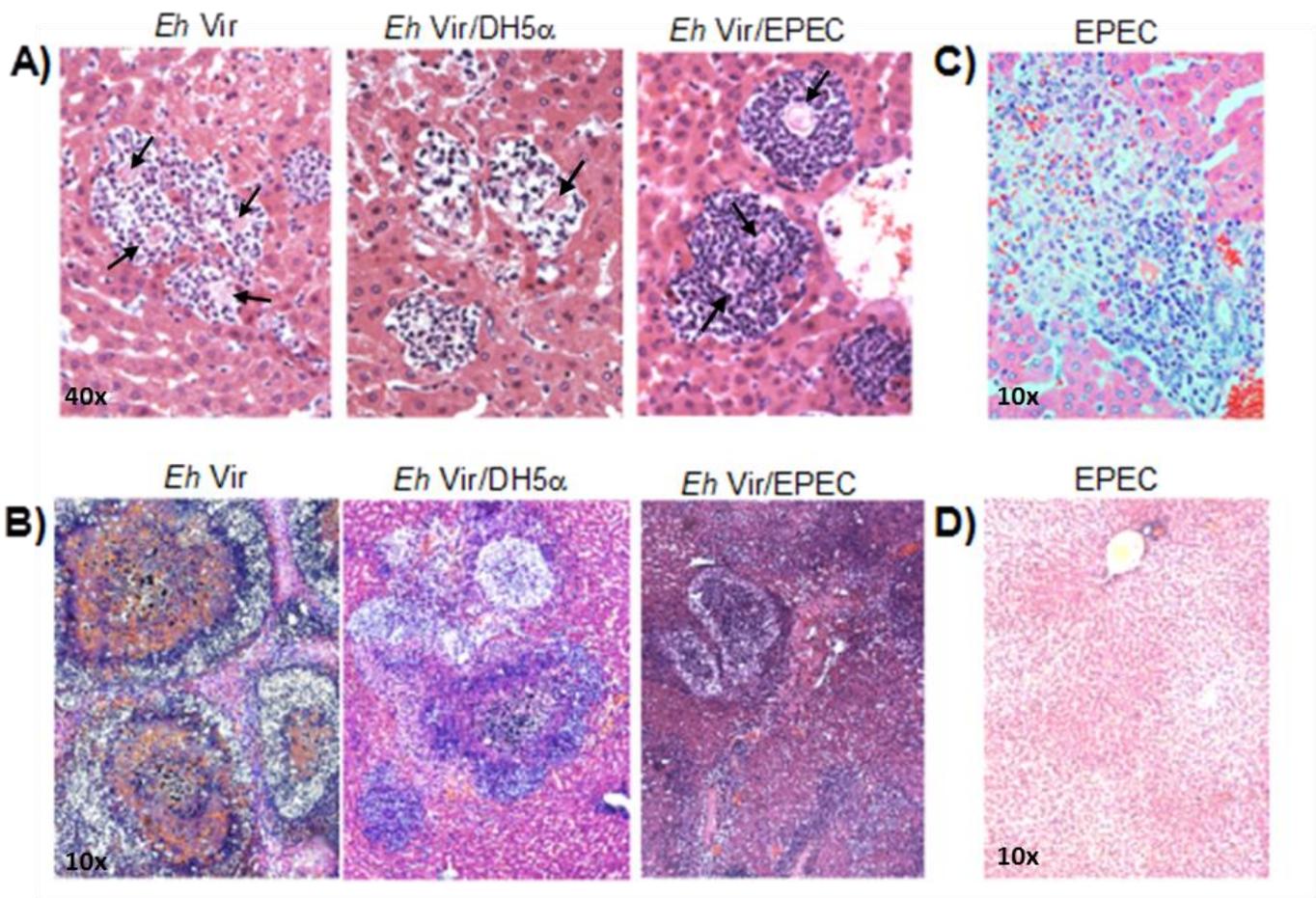
obtenidos se muestran como media de los valores obtenidos por hámster, con DS. El valor de p se calculó por *Student-t-test*, \* p <0.05, \*\*\* p <0.001

### **9.9 Análisis histológico de hígado de hámsteres inoculados con *E. histolytica* Vir axénica y en interacción *EcDH5α* o EPEC**

A pesar de la falta de diferencias macroscópicas durante el desarrollo de los AHA. Mediante el análisis histológico observamos que a las 3 h postinoculación, el grupo de hámsteres inoculados con *EhVir*/EPEC presentaron una mayor infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) rodeando los trofozoítos en los focos inflamatorios, en comparación con la infiltración de células PMN en focos, asociadas a *EhVir*/DH5a o trofozoítos *EhVir* axéricos (figura 13A).

Por otra parte, a los 3 dpi con *EhVir* axénico y con *EhVir*/*EcDH5α*, observamos la clásica estructura de granuloma amebiano, constituida por células epitelioides en el límite externo de las lesiones con trofozoítos localizados entre la empalizada y el centro necrótico (figura 13B). Por el contrario, en los hámsteres inoculados con *EhVir*/EPEC los granulomas adquirieron una apariencia más compacta y las áreas necróticas se dispersaron sin una estructura definida (figura 13B). Esta descripción del daño producido en el hígado del hámster a las 3 horas y 3 días después de la inoculación con *EhVir*/EPEC es similar a las lesiones reportadas en trabajos posteriores del laboratorio a las 6 horas de desarrollo y 7 días después de la inoculación, respectivamente, producidas por trofozoítos axéricos de *E. histolytica*. Lo cual sugiere una progresión más rápida del daño producido por la ameba cuando se inocularon los trofozoítos interactuadas con EPEC.

Mientras que en el hígado de hámsteres inoculado con solo *EcDH5α* o EPEC, a los 3 hpi, observamos poco infiltrado inflamatorio perivascular, que progresó a formar áreas compactas de isquemia a las 24 hpi, sin embargo, a los 3 dpi la respuesta inflamatoria fue completamente delimitada y el tejido hepático adquirió de nuevo una apariencia normal (figura 13C y 13D ).



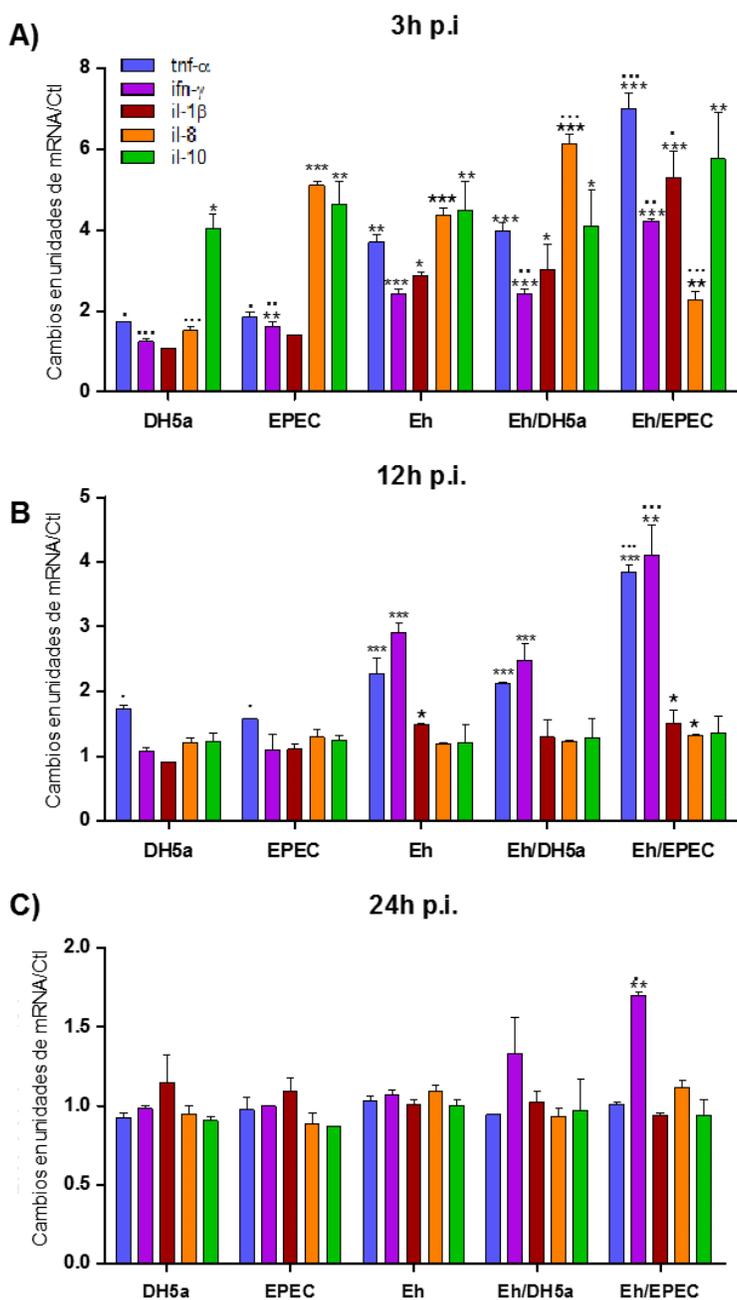
**Figura 13. Análisis histológico de AHA a las 3 horas y 3 días después de la inoculación intrahepática con trofozoítos *EhVir* axénicos y en interacción durante 2.5 horas con *EcDH5α* o EPEC.**

A) Focos inflamatorios producidos por los trofozoítos indicados con flechas, a las 3h después de la inoculación en hámsteres, los trofozoítos se encuentran rodeados por capas de células PMN. Imágenes amplificadas a 40x. B) Estructura clásica de granuloma amebiano, producidos 3 dpi por la inoculación de *EhVir* axénico y *EhVir/EcDH5α*, mientras que la inoculación con *EhVir/EPEC* produjo zonas necróticas más extensas no delimitadas y granuloma más pequeño. C) Infiltración inflamatoria perivascular alrededor de pequeñas zonas isquémicas producidas 3 hdi intrahepática de EPEC. D) Hígado sano después de 3 dpi intrahepática con EPEC. Las imágenes B, C y D se muestran amplificadas a 10X. Todas las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina.

### 9.10 Expresión de citocinas en hámsteres inoculados con *E. histolytica* Vir en interacción con *EcDH5α* y EPEC comparada con la expresión en hámsteres inoculados con *EhVir* axénico.

La inoculación de *EhVir*/EPEC no solo afectó el desarrollo de los granulomas hepáticos en los hámsteres, sino que a las 3 horas postinoculación también indujo una mayor expresión de los genes que codifican para las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  ( $7\pm 0.4$ ,  $5.3\pm 0.66$ ,  $4.2\pm 0.03$  unidades de incremento de la expresión, respectivamente), en comparación con la inoculación de *EhVir*/*EcDH5α* que indujo  $3.9\pm 0.19$ ,  $3\pm 0.61$ ,  $2.4\pm 0.12$  unidades de incremento de la expresión de estas citocinas, respectivamente, y con la inoculación de *EhVir* axénico que incrementó  $3.7\pm 0.18$ ,  $2.8\pm 0.08$ ,  $2.4\pm 0.11$  unidades de expresión de estas citocinas, respectivamente, al tomando como nivel basal la expresión de genes en hámsteres no infectados (figura 14A).

A 3 hpi, la quimiocina IL-8 se sobreexpresó de forma similar en los hámster inoculados con EPEC ( $5.1\pm 0.1$  unidades), con la ameba axénica ( $4.4\pm 0.17$  unidades) y con *EhVir*/*EcDH5α* ( $6.1\pm 0.22$  unidades), en cambio, la sobreexpresión de IL-8 se observó a las 3 horas y 3 días después de la inoculación intrahepática con trofozoítos *EhVir* axénicos y en interacción durante 2.5 horas con *EcDH5α* o EPEC. *EhVir*/EPEC (figura 14A). Sin embargo, la gran cantidad de infiltración de células inflamatorias en los focos producidos en el hígado del hámster por la inoculación de *EhVir*/EPEC, sugiere que puede producirse una mayor sobreexpresión de *il-8* en un tiempo más temprano en este grupo. También, se observó la sobreexpresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 a las 3 hpi de forma similar en los hámsteres inoculados solo con la bacteria, con la ameba axénica, con *EhVir*/*EcDH5α* y *EhVir*/EPEC ( $4\pm 0.33$ ,  $4.6\pm 0.58$ ,  $4.4\pm 0.73$ ,  $4.1\pm 0.89$  y  $5.7\pm 1.14$  unidades, respectivamente) (figura 12A). En un tiempo de 12 hpi, la expresión del gen para IL-8 e IL-10 volvió a los niveles basales y permaneció basal a las 24 horas después de la inoculación en todos los grupos (figura 14B y 14C)



**Figura 14. PCR cuantitativo por transcripción reversa (qRT-PCR) de la expresión de citocinas en hígado de hámsteres inoculado con EhVir, EhVir/EcDH5α y EhVir/EPEC durante el desarrollo de AHA y al inocular solo EcDH5α y EPEC.**

A) Expresión de las citosinas en hígado de hámsteres las 3 hpi. B) A 12 hpi la expresión de tnf-α disminuyó y aumento la expresión de ifn-γ al inocular EhVir, EhVir/EcDH5α, y EhVir/EPEC. C) después de 24 hpi solo ifn-γ permaneció sobreexpresada en hámsteres inoculados con EhVir/EPEC. Se utilizaron hámsters inoculados con solo el medio de cultivo de la amiba como control de expresión basal y el gen para GAPDH como control de expresión endógena. Los datos corresponden a la

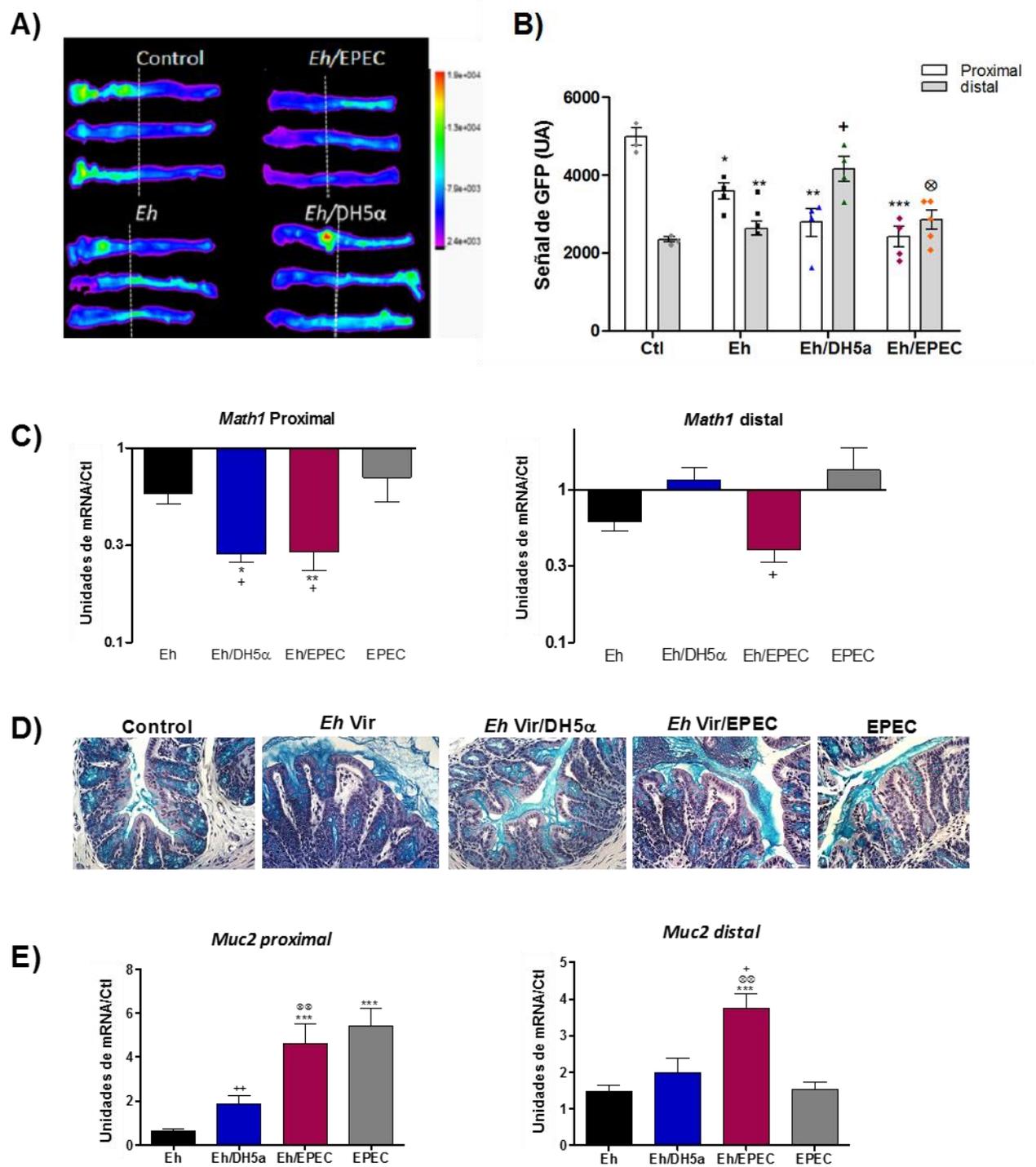
media ± DS, de tres experimentos independientes con 2 réplicas biológicas. El valor de p se calculó mediante la prueba de la *Student-t*, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 en comparación con el control, • P<0.05, •• P<0.01 en comparación con EhVir.

Además, la expresión de los genes que codifican para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , disminuyó a las 12 hpi en los hámsteres inoculados con *EhVir* axénico ( $2.2\pm 0.23$  y  $1.5\pm 0.005$  unidades, respectivamente), inoculados con *EhVir/EcDH5 $\alpha$*  ( $2.1\pm 0.021$  y  $1.3\pm 0.26$  unidades, respectivamente) y en los inoculados con *EhVir/EPEC* ( $3.8\pm 0.09$  y  $1.5\pm 0.19$  unidades, respectivamente), permaneciendo *tnf- $\alpha$*  ligeramente más alto en este último grupo (figura 14B). En este mismo tiempo evaluado (12h pi) aumento la expresión de *ifn- $\gamma$*  en los hámsteres inoculación con la ameba axénica ( $2.9\pm 0.15$  unidades), con *EhVir/EcDH5 $\alpha$*  ( $2.5\pm 0.25$  unidades) y con *EhVir/EPEC* ( $4.1\pm 0.45$  unidades), siendo mayor en este último grupo (figura 11B). Mientras que a las 24 hpi, solo *ifn- $\gamma$*  permaneció sobreexpresado y únicamente en el grupo de hámsteres inoculado con *EhVir/EPEC* ( $1.7\pm 0.02$  unidades), mientras que *tnf- $\alpha$*  e *il- $\beta$*  regresaron al nivel basal en todos los grupos (figura 14C).

#### **9.11 Ratones Math1<sup>GFP</sup> inoculados con *EhVir/EPEC* revelaron una disminución de la inducción de la proliferación de celular secretora y una mayor producción de Muc2 en comparación con los ratones inoculados con *EhVir* y *Eh/ EcDH5 $\alpha$***

Para evaluar cómo influye en el proceso de inflamación la presencia de *E. coli* durante la amebiasis intestinal, se inocularon trofozoitos axénicos *EhVir*, *EhVir/EcDH5 $\alpha$*  y *EhVir/EPEC* interactuados, en asas colónicas realizadas en el modelo de ratones C57BL/6 transformado para expresar el factor de transcripción Math1 etiquetado con GFP. La proteína Math 1 es un factor de transcripción que promueve la diferenciación de células colónicas multipotenciales a un tipo secretor, como las células caliciformes, cuyo linaje se pierde por la ablación de este factor. Se ha observado que la señal Math1<sup>GFP</sup> disminuye durante procesos inflamatorio del colon, colitis, por ejemplo. En este estudio, observamos que, después de 3 hpi, la señal de Math1<sup>GFP</sup> en el tejido de las asas colónicas (región proximal) cuando se inocula con *EhVir* axénico, disminuye aproximadamente 27% en unidades arbitrarias (AU) dadas por la señal de la GFP (figura 15A) y la expresión del gen que codifica para Math1 se mantuvo cerca del nivel basal en  $0.5 \pm 0.2$  unidades (figura 13C), de manera similar, en el inocular *EhVir/EcDH5 $\alpha$*

disminuyó la señal de GFP en alrededor de 44% AU y la expresión del *math1* se redujo en regulado de  $0.28 \pm 0.07$  unidades (figura 15C). En el tejido adyacente al asa colónica (región distal), la señal de  $\text{Math1}^{\text{GFP}}$  aumentó aproximadamente 27% y 77% en AU al inocular *EhVir* axénico y *EhVir/EcDH5 $\alpha$*  (figura 15B), mientras que la expresión de *math1* permaneció en nivel basal en ambas condiciones (figura 15C), lo que señala la translocación de la inducción de células secretoras a la parte distal del colon, inducida normalmente en la región proximal, como se observa en ratones control no inoculados (figura 15A). Cuando se inoculó *EhVir/EPEC*, la señal y la expresión génica de  $\text{Math1}^{\text{GFP}}$  disminuyeron considerablemente en la región proximal (disminución del 48% de AU y  $0.29 \pm 0.18$  unidades que disminuyó la expresión) y se mantuvieron cerca del basal en la región distal (aproximadamente 15% de aumento en AU y  $0.4 \pm 0.19$  unidades de expresión génica), sugiriendo una disminución en la inducción de la línea celular secretora en todo el intestino (figura 15A, 15B y 15C). Sin embargo, al inocular solo EPEC se observaron niveles de expresión de *math1* cercanos al basal en la región proximal ( $0.7 \pm 0.3$  unidades) y distales ( $1.34 \pm 0.1$  unidades), indicando que la disminución de la expresión de *mat1* en los ratones inoculados con *EhVir/EPEC* no estaba dada por la presencia de EPEC (figura 15C).



**Figura 15. Producción de Math 1 y Muc2 y su expresión génica en intestino de ratones inoculados con *EhVir* axénico, *EhVir/EcDH5α*, *EhVir/EPEC* y EPEC.**

A) Intestino de ratones  $Math1^{GFP}$ , la línea punteada divide la región proximal a la izquierda, y la región distal a la derecha, la señal de GFP se observa en color verde. La inoculación de los trofozoítos se realizó en la región proximal y se delimito por un nudo en la zona en la que termina el ciego y otro nudo a aproximadamente 1 cm en la dirección de la región distal. B) Representación en histograma de la señal de GFP medida en UA, en la región proximal inoculada y la región distal no inoculada. C) qPCR relativa de mRNA para  $Math1$  en el tejido de la región proximal y distal, se utilizó como control de expresión basal ratones no inoculados. D) Muestras histológicas de la región proximal en asas colónicas teñidas con azul alciano, el moco y las células caliciformes que contienen moco se tiñen de azul. Todas las imágenes se magnificaron 40X. E) Diferencia en la expresión relativa del gen *muc2* evaluada por RT-qPCR en la región proximal y distal de asas colónicas en ratones C57BL/6 inducidas por los grupos inoculados. Al menos 5 ratones se usaron para evaluar cada condición en dos experimentos independientes. Los niveles de expresión génica se normalizaron utilizando  $\beta$ -actina como gen de expresión endógena. Los valores de P se calcularon por *t-student*, diferencias sobre el \*control, sobre +E axénico, sobre • EPEC, \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

Por otro lado, utilizando la tinción de azul Alciano, se corroboró un aumento en la producción de moco en las asas colónicas, sin embargo, no se apreciaron diferencias en la secreción de moco cuando se inoculó la ameba axénica *EhVir*, o en interacción con la bacteria (*EhVir/EcDH5 $\alpha$*  y *EhVir/EPEC*) o solamente EPEC fue inoculado (figura 15D). Aun así, al evaluar la expresiones del gen que codifica para *Muc2*, se observaron diferencias considerables entre los grupos de inoculación, en la región proximal al inocular *EhVir* axénica, la expresión de *muc2* permaneció cerca del nivel basal ( $0.64 \pm 0.16$  unidades), al inocular *EhVir/EcDH5 $\alpha$*  se observó un ligero aumento ( $1.86 \pm 0.94$  unidades), y se observó un mayor aumento al inocular *EhVir/EPEC* ( $4.6 \pm 2.4$  unidades) o solo EPEC ( $5.4 \pm 1.3$  unidades), mientras que en la región distal, la expresión de *muc2* aumentó de forma similar en los ratones inoculados con el *EhVir*, *EhVir/EcDH5 $\alpha$*  y EPEC

( $1.48 \pm 0.53$ ,  $1.98 \pm 1.19$ ,  $1.53 \pm 0.33$  unidades, respectivamente), y aumento significativamente en  $3.75 \pm 1.2$  unidades al inocular *EhVir*/EPEC (figura 15E).

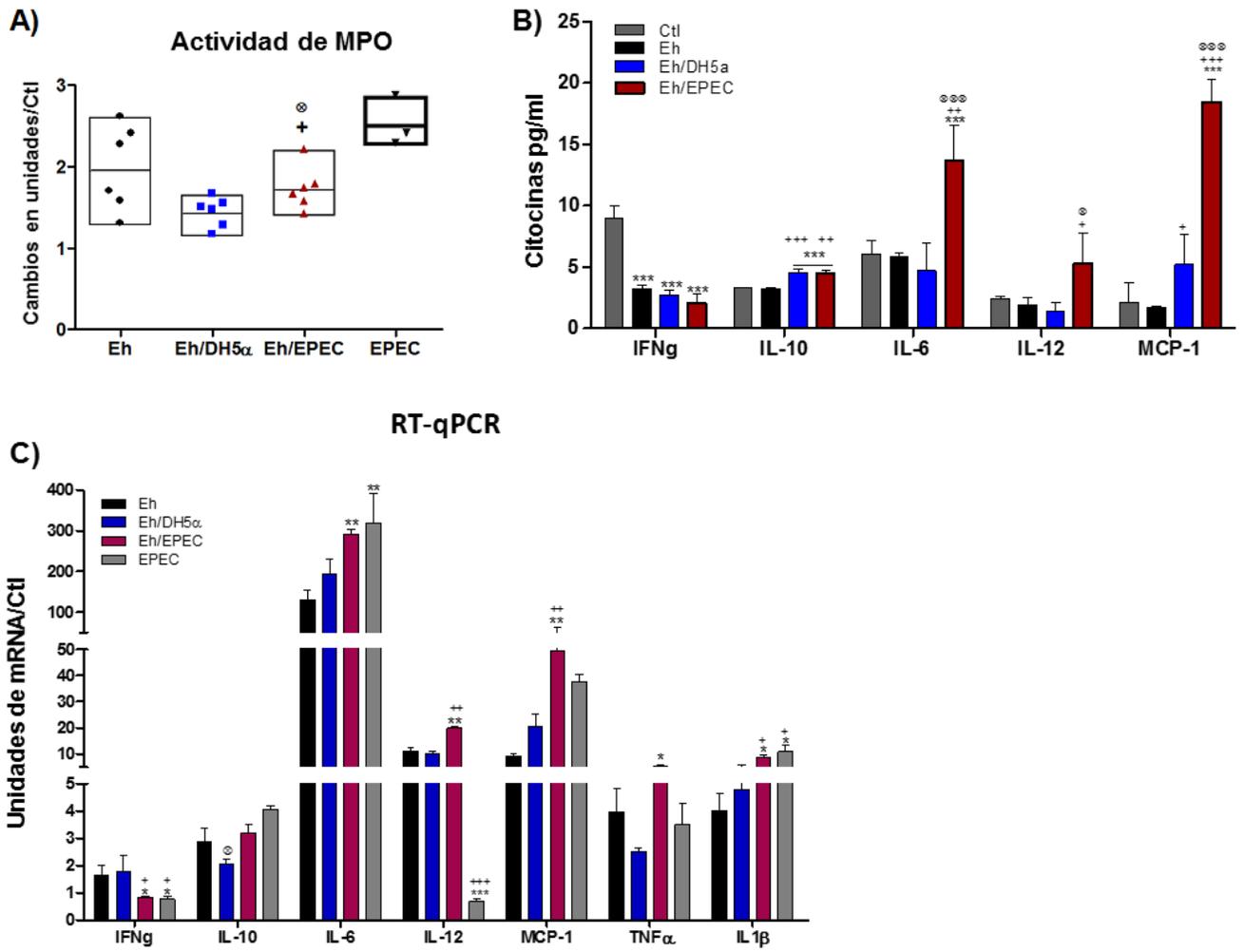
### **9.12 Cambios de la respuesta inmune en intestinal en ratones C57BL/6 inoculados con *EhVir* axénica, *EhVir*/DH5 $\alpha$ y *EhVir*/EPEC**

Dado que la interacción con EPEC induce una mayor respuesta inflamatoria durante el establecimiento de la amebiasis intestinal, indicado por los valores de *Math1* y *Muc2*. Debido a esto, también evaluamos los cambios en la respuesta inmune que podrían ser causados por la presencia de componentes bacterianos cuando se inoculan trofozoítos en interacción con EPEC o *EcDH5 $\alpha$* .

Al medir la actividad de mieloperoxidasa (MOP), no se observaron diferencias en la infiltración de neutrófilos en las asas colonicas inoculadas con *EhVir* axénica ( $1.95 \pm 0.5$  unidades), *EhVir*/*EcDH5 $\alpha$*  ( $1.41 \pm 0.18$  unidades), *EhVir*/EPEC ( $1.7 \pm 0.26$  unidades) o al inocular solo EPEC ( $2.5 \pm 0.3$  unidades), usando el nivel basal de la actividad de MPO en ratones no inoculado como control (figura 16A).

Al cuantificar las citoquina liberada en el lumen intestinal mediante la tecnología Luminex, se observó un gran aumento de IL-6, IL-12 y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) cuando se inoculó *EhVir*/EPEC ( $13.64 \pm 2.97$ ,  $5.3 \pm 2.51$  y  $18.47 \pm 1.86$  pg/ml, respectivamente) en comparación con la cantidad liberada de los ratones control ( $6.05 \pm 1.1$ ,  $2.39 \pm 0.23$  y  $2.1 \pm 1.58$  pg/ml, respectivamente), al inocular *EhVir*/DH5 $\alpha$  o *EhVir* axénico la cantidad de estas citosinas permaneció cercana a la cantidad liberada en los ratones control (figura 16B). Mientras que la liberación de IFN $\gamma$  disminuyó en una tasa similar en todos los grupos ( $3.2 \pm 0.29$ ,  $2.75 \pm 0.33$ ,  $2.04 \pm 0.74$  pg/ml al inocular *EhVir*, *EhVir*/*EcDH5 $\alpha$* , *Eh*/EPEC, respectivamente), en comparación con el control en el cual se cuantificaron  $8.9 \pm 1.01$  pg/ml de IFN- $\gamma$  (figura 16B). En el caso de la citosina anti-inflamatoria IL-10, la cantidad liberada en el lumen intestinal no fue significativamente diferente al inocular *EhVir* axenico ( $3.26 \pm 0.08$  pg/ml), *EhVir*/*EcDH5 $\alpha$*  ( $4.57 \pm 0.28$  pg/ml) y *EhVir*/EPEC ( $4.5 \pm 0.19$  pg/ml), como tampoco fue diferente a la cantidad cuantificada en los ratones control ( $3.32 \pm 0.06$  pg/ml) (figura 16B).

Cuando se evaluó por qPCR, la expresión de los genes para las citocinas en el tejido intestinal, los resultados obtenidos coincidieron con los valores observados por luminex. El mayor incremento en expresión de *il-6* ( $292 \pm 81$  unidades), *il-12* ( $25 \pm 8$  unidades), *mcp-1* ( $52 \pm 25$  unidades), de *tnf- $\alpha$*  ( $6 \pm 2$  unidades) y también de *il-1 $\beta$*  ( $8 \pm 2$  unidades) se observó en los ratones inoculados con *EhVir*/EPEC, sin embargo, *il-6*, *il-1 $\beta$*  y *mcp-1* se sobreexpresaron de forma similar cuando se inoculó solo EPEC IL-6 ( $319 \pm 125$ ,  $10 \pm 4$  y  $37 \pm 4$  unidades de expresión, respectivamente), lo que sugiere que la sobreexpresión de estas citoquinas podría ser respuesta a componentes bacterianos (figura 16C). Además, en los ratones inoculados con *EhVir* y *EhVir/EcDH5 $\alpha$* , no se observaron diferencias significativas en la sobreexpresión de *il-6* ( $136 \pm 68$  y  $194 \pm 89$  unidades, respectivamente), *il-12* ( $11 \pm 5$  y  $10 \pm 6$  unidades, respectivamente), *mcp-1* ( $13 \pm 4$  y  $20 \pm 3$  unidades, respectivamente), *tnf- $\alpha$*  ( $3.7 \pm 0.5$  y  $2.5 \pm 0.1$  unidades, respectivamente) e *il-1 $\beta$*  ( $3.7 \pm 0.7$  y  $4.2 \pm 1$  unidades, respectivamente) (figura 16C). La expresión de *ifn- $\gamma$*  aumentó ligeramente en los ratones inoculados con *EhVir* axénico ( $1.6 \pm 0.2$ ) y *EhVir/EcDH5 $\alpha$*  ( $1.4 \pm 0.3$ ), mientras que los ratones inoculados con *Eh*/EPEC se mantuvo alrededor de los niveles basales (figura 16C). Además, *il-10* se sobreexpresó ligeramente en todos los grupos de ratones inoculados,  $2.8 \pm 0.4$  unidades en *EhVir* axénico,  $2 \pm 0.1$  en *EhVir/EcDH5 $\alpha$* ,  $3 \pm 0.3$  unidades en *EhVir*/EPEC y  $4 \pm 0.1$  unidades en EPEC (figura 16C).



**Figura 16. Modulación de la respuesta inmune durante el establecimiento de la amebiasis intestinal en ratones C57BL/6 inoculados en asas colonicas con trofozoítos *EhVir axenico*, *EhVir/EcDH5 $\alpha$*  y *EhVir/EPEC* y al inocular solo EPEC.**

A) Infiltración de neutrófilos evaluada por la actividad de MOP, se usaron ratones no inoculados como control, se analizaron 5 ratones para cada condición en dos experimentos independientes. B) Liberación de citoquina al lumen intestinal de los ratones, medida en pg/ml mediante tecnología Luminex. Se midieron las mezclas del contenido intestinal de 4 ratones para cada condición en dos experimentos independientes. C) Cuantificación por RT-qPCR del mRNA de citoquina en el tejido intestinal de las asas colonicas. Se analizaron 5 ratones para cada condición en dos experimentos independientes, con dos réplicas técnicas por experimento. Los niveles de expresión génica se normalizaron utilizando  $\beta$ -actina como gen de expresión endógena. Los valores de P se calcularon por *t-student* y se representan como media  $\pm$ DS, diferencias sobre \**EhVir* axénico, <sup>†</sup>*EhVir/EcDH5 $\alpha$* , \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

## 10. Discusión

En países endémicos, el parásito protozooario *Entamoeba histolytica* se ha convertido en un residente común del intestino grueso de individuos infectados, donde puede sobrevivir alimentándose de células muertas del hospedero y bacterias durante varios años, sin causar ningún daño al huésped. Sin embargo, síntomas que van desde diarrea, colitis amebiana, ameboma y hasta una invasión extraintestinal al hígado que amenaza la vida, pueden manifestarse repentinamente, incluso en casos que los que el individuo infectado ha permanecido asintomático durante muchos años. Esto sugiere que los cambios en el entorno intestinal pueden contribuir al desarrollo de la amebiasis.

La hipótesis de este trabajo consistió en que la coinfección con bacterias enteropatógenas, puede ser un factor importante que contribuya a alterar la virulencia de la amiba y la regulación inmunitaria, lo que puede provocar alteración de los factores ambientales en el hospedador que propicien la aparición de los síntomas.

Para comprobar nuestra hipótesis, primero se estudió la virulencia y características fenotípicas de varios aislados de *E. histolytica*, para seleccionar dos aislados que nos permitieran analizar si la interacción con una bacteria enteropatógena, EPEC, podía restaurar la virulencia perdida de un aislado amebiano o sólo incrementar la virulencia de la amiba, conduciendo a la producción de mayores lesiones en modelos *in vivo*.

la diferencia en virulencia entre aislados de *E. histolytica* HMI:IMS mantenidos bajo diferentes condiciones de conservación, se evaluó de acuerdo a la capacidad de producir daño *in vivo* en hígado de hámsters y la capacidad *in vitro* para destruir monocapas de células MDCK, entre seis diferentes aislados: cuatro de ellos, llamados A1, B1, C1 y Pt1, pasados a través de hígado de hámster cada mes para conservar su virulencia; dos aislados incapaces de producir AHA, Pt2 mantenido en cultivo durante más de 5 años y el aislado N1 que se congeló durante al menos 10 años, y el aislado Xi que a pesar de mantenerse en cultivo por más de 3 años, sorprendentemente, conservó su virulencia produciendo lesiones de alrededor del 30% del hígado de hámster. Los resultados obtenidos,

mostraron una gran heterogeneidad en la capacidad de EC y la capacidad de producir AHA entre nuestros aislados, sin correlación entre la destrucción de las células *in vitro* y la capacidad de producir lesiones *in vivo* en el hígado de hámster. Nuestros resultados coincidieron con los obtenidos en un reciente estudio realizado por Meyer *et al.* (2016), cuyo objetivo consistió en dilucidar la diferencia fenotípica y de expresión génica entre 12 clones de la línea celular HM1-IMSS\_A incapaz de producir AHA en jerbos y 12 clones de la línea amebiana HM1-IMSS\_B, que mantuvo un fenotipo patógeno estable, a pesar de que permanecieron en cultivo durante varios años, produciendo abscesos en alrededor del 30% de hígado. En el estudio de Mayer *et al.*, ( ) se demostró que no existe correlación entre el EC sobre líneas celulares y el porcentaje de AHA producido en jerbo, entre las líneas de amebas HM1-IMSS A y B, o incluso entre los clones de HM1-IMSS\_B, independientemente del gran porcentaje de heterogeneidad entre los clones, de los cuales sólo 8 de 12 clones produjeron daño *in vivo*.

En el presente estudio, la capacidad para destruir monocapas celulares se asoció fuertemente con una alta actividad de *EhCPs* y con la capacidad de adhesión de los trofozoítos a las células del hospedero, ya que los aislados N1 y Pt2, que produjeron las bandas de degradación más densa en zimograma, también produjeron el mayor EC en monocapa de células MDCK ( $85\pm 1.3$  y  $96\pm 1.8$  % de destrucción de la monocapa, respectivamente), además, demostrado por el hecho de que el aislado Pt2 exhibió la reducción más baja en la capacidad de EC cuando se usó el inhibidor de CP E-64 y galactosa como un competidor de la adhesión a células epiteliales mediante la lectina Gal/GalNac.

Otro importante factor de virulencia es la fagocitosis, que es esencial para la adquisición de nutrientes, la invasión de los tejidos del huésped y la patogenicidad de la ameba (Huston CD. *et al.*, 2003; Sateriale A. and Huston CD., 2011). Al comparar la fagocitosis de bacterias y eritrocitos de tres aislados de *E. histolytica* HMI:IMSS con diferente virulencia, se observó que el aislado no virulento (Pt2) mostró la tasa más alta de fagocitosis bacteriana y la tasa más baja en eritrofagocitosis,; por el contrario, el aislado Xi considerado moderadamente virulento, presentó la tasa más alta en eritrofagocitosis y la más baja en fagocitosis

bacteriana, mientras que la capacidad para fagocitar bacterias y eritrocitos del aislado virulento (Pt1) fue mediana comprada con la de los aislamientos Pt2 y Xi, lo que indica que una alta capacidad de fagocitosis no se correlaciona con el índice de virulencia de la ameba. Además, a pesar de la diferencia en capacidad para fagocitar *E. coli* entre el considerado aislado no virulento Pt2 (*EhNvir*) y el aislado Xi de moderada virulencia (*EhVir*), de acuerdo con su capacidad para producir AHA in vivo, la interacción con EPEC incrementó de forma similar la capacidad de ambos aislados para destruir monocapas, lo que nos indica que este efecto del incremento de virulencia al asociar *E. histolytica* con EPEC, es independiente de la cantidad de bacterias que puedan fagocitar los trofozoítos.

Como esperábamos, los cambios en la virulencia de *E. histolytica* al interactuar con EPEC, se relacionaron con el aumento de cisteína proteasas y adhesión a células hospedadoras in vitro mediada por la lectina Gal/GalNAc, en los trofozoítos de los aislados *EhVir*, y *EhNvir*, ya que estos factores de virulencia se han asociado directamente con la capacidad del parásito para destruir células in vitro, si correlacionamos su aumento con el incremento de la actividad citopática de los trofozoitos de ambos aislados al interaccionar con EPEC. Lo cual ha sido reportado anteriormente por diferentes grupos de trabajos, en los cuales se cocultivaron trofozoítos de *E. histolytica* con diversos serotipos patógenos de *E. coli*, durante tiempos que variaron de 1 a 2.5 h. Sin embargo, otros mecanismos por los cuales puede haber aumentado el efecto citopático de la ameba al estar en interacción con bacterias, han sido descritos en el estudio realizado por Galván-Moroyoqui *et al.* (2006), en el que se observó que la exposición de monocapas de células MDCK a EPEC o *Shigella dysenteriae* induce una desorganización gradual de las uniones estrechas entre las células, marcada por la interrupción del anillo circunferencial de actina cortical, la pérdida de microvellosidades y reordenamiento de los filamentos basolaterales, que conducen a las células epiteliales a la liberación de citocinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8, que producen una respuesta quimiotáctica en los trofozoítos de *E. histolytica* y contribuyen a la capacidad del parásito para destruir y penetrar las capas epiteliales.

Por otro lado, en nuestro estudio, la interacción EPEC indujo una sobreexpresión de los genes que codifican para *EhCP1*, *EhCP2*, *EhCP4*, *EhCP5*, la subunidad pesada de 170 kDa de la lectina Gal/GalNAc, la proteína Amoebapore A y la enzima ciclooxigenasa (COX), de una manera dependiente del tiempo, ya que la mayor sobreexpresión génica se observó después de 2 h de interacción Eh/EPEC. Mientras que la interacción con *E. coli* DH5 $\alpha$  no patógena solo indujo una ligera sobreexpresión de los genes que codifican para la subunidad pesada de 170 kDa de la lectina Gal/GalNAc y Amoebapore A, después de 2 h de interacción, indicando que no hay realmente una modificación de la virulencia de la ameba al interactuar con esta bacteria.

La actividad proteolítica y la adherencia han sido el objetivo de varios estudios, ya que el incremento de la lectina Gal/GalNAc y algunas *EhCP* (*EhCP*-b8, -b9, a5 y -c13) conducen a una mayor virulencia del parásito in vitro e in vivo, además, se ha observado un aumento en el nivel de expresión de la subunidad pesada de 170kDa de la lectina Gal/GalNAc y algunos genes de *EhCP* (*ehcp*-a3, -a4, -a5, -a6, -a10, -b8, -b9 y -c13) durante la formación AHA (Hellberg A. *et al.*, 2001; Matthiesen J. *et al.*, 2013; Sánchez V. *et al.*, 2016; Ximenez C. *et al.*, 2017). Sin embargo, en nuestro estudio, a pesar de su abundante actividad de *EhCP*, los aislados N1 y Pt2 no fueron capaces de producir daño en el hígado de los hámsters. De manera similar, entre los aislados considerados virulentos, su capacidad proteolítica y de adhesión, no parecen estar relacionada con el porcentaje de daño que fueron capaces de producir. Así como tampoco se observó diferencias significativas en el porcentaje de lesión en el AHA que produjeron los trofozoítos axénicos con el que produjeron, al estar en interacción con EPEC, a pesar del considerable incremento en actividad proteolítica y adherencia a células mamíferas, que esta interacción indujo en los trofozoítos. En el estudio de Meyer *et al.* (2016), también descubrieron que dos de sus clones HM1:IMSS\_B que no podían producir AHA tenían la mayor actividad de CP, entre los clones virulentos de las líneas celulares B y los clones no virulentos de la línea celular A, la actividad de las CP no se correlacionó con la capacidad de formación de AHA del jerbo. Señalando que los diferentes niveles de actividad de CP entre

los clones de ambas líneas celulares (HM1: IMSS A y B) son el resultado del aumento alterado de todas las CP principales, más que de los cambios de CP individuales. Independientemente, es bien sabido que los *EhCP* individuales desempeñan papeles importantes en la patogénesis de la ameba, demostrada por la incapacidad de los trofozoítos de la cepa HM1: IMSS transfectada con un gen antisentido para *EhCP5*, para inducir lesiones en hígado de hámster, a pesar de conservar su EC en monocapas de células de mamíferos [44]. Mientras que en un modelo colónico ex vivo, una cepa silenciada con *EhCP5*/amebaporo A, fue capaz de cruzar la barrera mucosa pero no pudo migrar dentro del tejido mucoso [45]. Además, la invasión amebiana en el modelo de xenoinjerto intestinal humano se reduce en más de 95% cuando se bloquea *EhCP1* con el inhibidor específico WRR483, así como el tratamiento de trofozoítos con inhibidor específico de WRR605 para *EhCP4* disminuyó notablemente la carga de amebas y la intensidad de inflamación cecal en el modelo de ratón C3H/HeJ (Que X and Reed SL, 2000; Meléndez-López SG. *et al.*, 2007; He C. *et al.*, 2010). Por otra parte, Olivos-Garcia et al. (2003), sugieren en su estudio que la actividad de CP está directamente relacionada con la progresión de la inflamación y el daño tisular en el modelo AHA en hámster, ya que al tratar los trofozoítos con E-64 antes de ser inoculados y tratar simultáneamente los hámsteres cada 12 h con E-64 después de ser inoculados, no observaron lesiones en el hígado de los hámsters, y la desaparición amebiana rápida del órgano, debido a esto, los autores argumentaron que la actividad de *EhCP* es principalmente necesaria para las condiciones de supervivencia amebiana en un hospedero, y que la supervivencia amebiana es necesaria para el desarrollo de daño tisular causado por varios mecanismos moleculares. Por lo cual, es posible asumir que la interacción con EPEC, mejora la sobrevivencia de los trofozoítos a las condiciones del hospedero, al incrementar la producción de *EhCP* y adherencia a las células de mamíferos en la amiba, entre otros posibles mecanismos.

Recientemente se observó que la interacción de *E. histolytica* con *E. coli* 055 incrementa la resistencia de la amiba al estrés oxidativo, al revertir los cambios de expresión (sobrexpresión o represión de la expresión) inducidos en la amiba por

el estrés oxidativo, entre los cuales se encontraron genes para enzimas desubiquitininas, que escinden ubiquitina en sustratos protéicos y regulan la degradación de proteínas, enzimas oxidorreductasas, como, alcohol deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y piruvato: ferredoxin oxidorreductasa, y 17 nuevos alelos de la familia LRR, entre los cuales, el modelado de estructura protéica reveló una sorprendente homología con el ectodominio de receptores tipo toll (TLR) para 11 de las 14 proteínas LRR correspondientes a los genes modulados más significativamente, particularmente altos en homología con TLR-4, TLR-13/3 y TLR-7/-9, mientras que otras proteínas mostraron una homología con proteínas bacterianas BspA de la superficie celular, implicadas en la adhesión bacteriana a las células o a la matriz extracelular del hospedero (Varet H. *et al.*, 2018). Cuando *E. histolytica* llegan al hígado se tienen que enfrentar a condiciones de oxigenación y respuesta inmune del hospedero adversas para la sobrevivencia de los trofozoítos, factores que el trofozito combate mediante *EhCP* y enzimas oxidorreductasas, por lo cual es posible que la interacción con bacterias patógenas que potencian la producción de estas proteínas claves en la patogénesis de la amiba, propicien también su sobrevivencia en el hospedero. Sin embargo, cuando inoculamos trofozoítos del aislado *EhNvir* en interacción con EPEC, solo se observó un pequeño incremento en las lesiones producidas en el hígado de hámsteres, las cuales el animal pudo resolver por sí mismo a los 7 días después de la inoculación, lo que nos sugiere que en el caso de este aislado amibiano, la interacción con EPEC no fue suficiente para mejorar la capacidad de los trofozoítos de sobrevivir en el hígado de hámster y producir AHA. Este hecho contradice lo reportado por Wittner y Rosenbaum en 1970, en cuyo estudio la interacción con un serotipo patógeno de *E. coli* fue capaz de restablecer la virulencia de un aislado de *E. histolytica* HMI:IMMS que había perdido su capacidad para producir AHA en hámsteres. Una posible explicación del por qué el aislado *EhNvir* siguió siendo incapaz de producir AHA después de interactuar con EPEC, es que al estar en cultivo por un periodo tan prolongado, los trofozoítos perdieron los mecanismos que le permiten adoptarse al medio hostil dentro de un hospedero. Esto los describen en su trabajo Weber *et al.* (2017), en

el cual, mediante el análisis transcriptómico comparativo entre trofozoítos *E. histolytica* virulentos y trofozoítos de virulencia atenuada por largos periodos de cultivo, demostraron que un cambio rápido en la expresión génica durante su interacción con el colon humano, que permite la adaptación y supervivencia a las condiciones del huésped, es el fenómeno más necesario para la patogenicidad de la ameba, característica que los trofozoítos del aislado de virulencia atenuada parece haber perdido de forma permanente.

Sin embargo al inocular los trofozoítos del aislado *EhVir*, a pesar de que éstos poseen la habilidad para adaptarse y sobrevivir en las condiciones hostiles del hospedero, el incremento en los factores de virulencia inducidos por la interacción con EPEC no parece haber sido suficiente para mejorar su capacidad de producir AHA en hámsteres, ya que no se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de daño producido por los trofozoítos axénicos y en interacción con EPEC. Aun así, al realizar el análisis histológico de las lesiones hepáticas, pudimos observar una aparente más rápida progresión de la lesión cuando se inoculó *EhVir* en interacción con EPEC, que pudo ser producto de una respuesta inmune más agresiva, como se corroboró al observar una mayor cantidad de células polimorfonucleares alrededor de los trofozoítos en los focos inflamatorios producidos a las 3 h después de la inoculación, al igual que la mayor sobreexpresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , en comparación con los hámsteres inoculados con *EhVir* axénica o incluso con *EhVir* en interacción con *E. coli* DH5 $\alpha$ . A pesar de esto, la sola presencia de EPEC en el hígado de hámster no parece ser la causante del incremento en la expresión de las citocinas proinflamatorias, ya que cuando se inoculó solo EPEC, no se observó un incremento considerable para los genes de estas citocinas. La sobreexpresión de estas citocinas se observó previamente durante las 3 a 12 primeras horas del establecimiento de la amebiasis en hígado de hámsteres inoculados con un aislado virulento de *E. histolytica* HMI:IMSS axénico, como también en un modelo de explantes de tejido hepático humano, ambos modelos susceptibles al desarrollo de las lesiones inducidas por la ameba. Sugiriendo que la expresión de estas citocinas pro-inflamatorias contribuyen a la producción del daño durante la

formación de los abscesos hepáticos amebianos, al inducir una respuesta más agresiva por parte de las células polimorfonucleares, monocitos y linfocitos natural killer, que se han observado reclutados a la zona lesionada durante la amebiasis, además de también estar estos factores de la respuesta inmune propiciando una conducta más agresiva por parte de los trofozoítos de *E. histolytica* (Pacheco-Yépez j. *et al.*, 2011; Ximénez C. *et al.*, 2017).

A pesar de que el hígado es un órgano altamente susceptible al daño producido por *E. histolytica*, por lo cual se ha utilizado como un buen modelo para estudiar el desarrollo de la patogénesis amebiana, no es el ambiente natural de los trofozoítos, ni el primer foco de infección. El parásito *E. histolytica* llega al hospedero a través de alimentos contaminados con quistes y se instala en el intestino grueso como trofozoítos, los cuales pueden sobrevivir en el intestino durante periodos prolongados, alimentándose de bacterias intestinales a través de la fagocitosis, sin embargo, cuando se llega a producir la invasión de la mucosa intestinal por trofozoítos, éstos se alimentan de células epiteliales y de glóbulos rojos, causando colitis amebiana, que puede conducir a la penetración de la barrera mucosa, en donde los trofozoítos se pueden propaguen a través del cuerpo por vía sanguínea causando una variedad de enfermedades sistémicas (Espinosa-Cantellano M. and Martínez-Palomo A., 2000; Sateriale A, *et al.*, 2012). En este estudio, evaluamos si la interacción de los trofozoítos del aislado virulento de *E. histolytica* (EhVir) con *E. coli* DH5 $\alpha$  o EPEC inducía cambios en el proceso inflamatorio intestinal en el modelo de ratón C57BL-6 resistente a la amebiasis. Se encontró que Math1 es importante para la homeostasis proliferativa normal dentro del intestino, y por lo tanto es necesario para una respuesta adaptativa normal (Shroyer *et al.*, 2007). Utilizamos los ratones Math1<sup>GFP</sup> que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) en células caliciformes, para observar diferencias en la alteración de la homeostasis intestinal al inocular *EhVir* axénica con *EhVir*/DH5 $\alpha$  o *EhVir*/EPEC, encontrando que al inocular la ameba axénica o en interacción con *E. coli* DH5 $\alpha$  ocurre un desplazamiento de la señal de Math1<sup>GFP</sup> en la zona proximal, en donde se inoculan los trofozoítos, hacia la zona distal, en cambio, cuando se inoculó *EhVir*/EPEC la señal de Math1<sup>GFP</sup> se apagó tanto en la

zona proximal como en la distal, indicando un mayor desbalance en la homeostasis celular intestinal, relacionada con la represión de la proliferación de las líneas celulares secretorias. Además, al evaluar mediante la tinción histológica azul alciano, que nos permite observar la cantidad de moco secretada en el intestino, se observó un considerable aumento de la producción y secreción de moco en los ratones inoculados con *EhVir* axénica, *EhVir/EcDH5 $\alpha$* , *EhVir/EPEC* o sólo con EPEC, que no se pudo diferenciar por evaluación histológica únicamente entre estos grupos, pero al realizar la cuantificación del mRNA expresado para Muc2, principal componente del moco intestinal, se encontró una mayor expresión en los ratones inoculados con *EhVir/EPEC*, tanto en la zona proximal como en la distal, en comparación con los ratones inoculados con *EhVir* axénica, *EhVir/EcDH5 $\alpha$*  o sólo con EPEC, lo que sugiere una mayor inducción de la actividad de las células caliciformes para producir moco cuando se inoculan los trofozoítos en conjunto con EPEC. Muc2 es la primera barrera de defensa contra organismos patógenos en el intestino grueso, se ha demostrado que la deficiencia de esta glicoproteína induce sensibilidad y la producción de mayor daño al epitelio por *E. histolytica* (Bergstrom KS. *et al.*, 2010; Cobo ER. *et al.*, 2017; Steve C. *et al.*, 2017). Sin embargo, otro trabajo mostró que la alta producción de MUC2 aumenta la sensibilidad al estrés oxidativo y la apoptosis, causando pérdida de células caliciformes en el epitelio colónico durante la colitis inducida por DSS, ocurrido tan pronto como el día 2 de la administración de DSS, demostrando que la apoptosis de las células caliciformes es uno de los eventos iniciales que conduce a la pérdida de la barrera protectora del moco en la patogénesis de la colitis (Tawiah A., *et al.* 2018).

Durante el establecimiento de la amebiasis intestinal. la regulación de la respuesta inmune mediada por citocinas, ha sido ampliamente asociada con la producción del daño o la protección contra la ameba (Mortimer L. and Chadee K., 2010; Chelsea M. and Petri Jr. WA., 2014; Nakada-Tsukui K. and Nozaki T., 2016). En nuestro trabajo se observó una mayor secreción de las citocinas pro-inflamatorias IL-12, IL-6, MCP-1, una reducción en la secreción de INF- $\gamma$ , en los ratones inoculados con *EhVir/EPEC*, así como también una mayor expresión en el tejido

intestinal de la zona proximal para los genes de *il-12*, *il-6*, *il-1 $\beta$* , *tnf- $\alpha$*  y *mcp-1*, mientras que la expresión de *ifn- $\gamma$*  permaneció en los niveles basales, en comparación con lo observado en los ratones inoculados con *EhVir* axénico o *EhVir/EcDH5 $\alpha$* .

La eliminación de la infección por *E. histolytica* se ha asociado con la presencia de IFN- $\gamma$ , la producción de IFN- $\gamma$  por células mononucleares periféricas se correlacionó significativamente con la protección a una futura infección por *E. histolytica* en niños (Haque R. *et al.*, 2007). En ratones inmunizados contra la ameba, la protección se asoció a células CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  y células CD8<sup>+</sup> productoras de IL-17 (Guo X. *et al.*, 2011). INF- $\gamma$  estimula los macrófagos para producir iNOS y sintetizar grandes cantidades de óxido nítrico, el cual juega un papel crítico en la destrucción de los trofozoítos y la inhibición de la actividad de *EhCP* (Lin, J.Y. and Chadee, K., 1992).

Mientras que IL-4 y TNF- $\alpha$  se han correlacionado con la progresión de la enfermedad (Peterson KM. *et al.*, 2010; Sanchez-Guillen MDC *et al.*, 2002) En un modelo murino de colitis amebiana se encontró que la respuesta adaptativa Th2 a través de la producción de IL-4 por células CD4<sup>+</sup> determina el establecimiento de la infección en el hospedero (Guo *et al.*, 2008; Deloer S. *et al.*, 2017). Datos obtenidos en humanos y en modelos in vitro e in vivo apoyan el paradigma de que la respuesta Th1 en el intestino ayuda a la eliminación de *E. histolytica* mientras que la respuesta Th2 propicia la infección, probablemente mediante la supresión de INF- $\gamma$  (Mortimer L. and Chadee K., 2010).

Las secreciones de los trofozoítos también inducen a las células epiteliales a producir la proteína quimioattractora de monocitos- 1 (MCP-1), la cual es una potente quimiocina trayente de monocitos, células dendríticas inmaduras y basófilos, y es importante para el reclutamiento de células presentadoras de antígenos (CPA) al sitio de daño (Charo and Ransohoff, 2006; Kammanadiminti *et al.*, 2007). Las CPA secretan IL-6 y TGF- $\beta$ , que en combinación actúan para inducir la diferenciación de células CD4 ingenuas, a células tipo Th17, las células de respuesta Th17 secretan IL-23 que contribuye a la expansión de la respuesta Th17. La combinación de IL-17 y IL-23 es aparentemente importante para el

reclutamiento de neutrófilos y la inhibición de la respuesta Th1 (Korn *et al.*, 2009; Lemos *et al.*, 2009). Además, la prostaglandina 2 (PGE<sub>2</sub>) producida por la enzima ciclooxygenasa, que se observó sobreexpresada en los trofozoítos en interacción con EPEC, puede condicionar a las células dendríticas a inducir IL-23 y la migración de neutrófilos a través de la respuesta inmune Th17, simultáneamente inhibiendo la respuesta Th1, necesarias para la eliminación de la infección por la ameba (Lemos *et al.*, 2009; Boniface *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2009). Sin embargo, en nuestros resultados no se observaron diferencias en el reclutamiento de neutrófilos entre los ratones inoculados con *EhVir* axénico o en interacción con *E. coli* DH5 o EPEC o incluso al inocular solo EPEC, a pesar de que si hubo una considerable respuesta en la producción de citocinas pro-inflamatorias.

Como se ha discutido, varios estudios han reportado que la respuesta inmune del tipo Th1 mediada por IFN- $\gamma$  e IL-12 conduce a la resolución de la amebiasis, y dado que la expresión de INF- $\gamma$  se reprimió en ratones inoculados con *EhVir*/EPEC, podría ser una indicación de que la presencia de EPEC favorece a otro tipo de respuesta inmune que es propicia para la progresión de la enfermedad, como la respuesta tipo Th17 mediado por una alta expresión de TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-1 $\beta$  y las cuales en conjunto con IL-6, IL-1 $\beta$  y IL-23 puede producir que los macrófagos ingenuos continúen induciendo este tipo de respuesta inmune (Li Y. *et al.*, 2018) O que mediante el incremento de IL-6 más PGE<sub>2</sub> se promueva la diferenciación de los macrófagos atraídos por la proteína mcp-1, al tipo de macrófagos de curación de heridas, no efectivos para combatir los trofozoítos de *E. histolytica* (Gordon S., 2003). También una alta expresión de IL-12 asociada con TGF- $\beta$  puede inducir un tipo de respuesta inmune Th3 inmune, relacionado también con la progresión de la amebiasis. Por lo cual futuros estudios que dilucidan las células del tipo de respuesta inmune que estén ocasionando en el establecimiento de la amebiasis, cuando los trofozoítos se inoculan en interacción con EPEC, así es necesario para tener una idea más clara de si la presencia de la bacterias es suficiente para que se propicien las condiciones para el establecimiento y se propicie la infección intestinal.

## 11. Conclusiones

- Las condiciones de cultivo bajo las que se conservan los aislados de *E. histolytica* HMI:IMSS afectan su virulencia.
- La capacidad de los aislados de *E. histolytica* HMI:IMSS para destruir una monocapa celular in vitro no necesariamente se correlaciona con la capacidad de producir daño en un modelo in vivo (hígado de hámster).
- Una gran actividad proteolítica y capacidad de adherencia no está relacionada con el daño in vivo, pero sí con la capacidad de efecto citopático de los trofozoítos.
- Los aislados de *E. histolytica* presentan diferente habilidad de fagocitosis selectiva entre eritrocitos y bacterias, sin embargo la fagocitosis y la actividad hemolítica no parecen estar relacionados con la virulencia.
- La fagocitosis de *EcDH5α* y de EPEC por *E. histolytica* se lleva a cabo mediante diferentes mecanismos de adherencia a través de los receptores de manosa y de galactosa, respectivamente.
- La interacción *Eh*/EPEC por 2.5h incrementa la capacidad de efecto citopático de los trofozoítos sobre monocapas celulares, asociado al incremento de la habilidad de adherencia y actividad proteolítica de los trofozoítos, así como la expresión de los genes que codifican para CP, la lectina Gal/GalNAc, Amoebaporo A y la enzima ciclooxigenasa, que se han relacionado con la virulencia de la ameba.
- El incremento en los factores de virulencia de la ameba evaluados en este trabajo, influyen la capacidad de los trofozoítos para producir abscesos hepáticos en hámsteres.
- La inoculación de *Eh*/EPEC en hígado de hámsteres induce una respuesta inmune inicial más agresiva, pérdida de peso en los hámsteres, y una aparentemente progresión más rápida en el desarrollo de los abscesos hepáticos.
- La inoculación con *Eh*/EPEC en ratones C57BL/6 produce una mayor respuesta inflamatoria intestinal, sugerida por la supresión de la proteína Math1 marcada con la proteína GFP, y una mayor expresión del gen para

MUC2 en el tejido afectado, así como un marcado incremento de citocinas proinflamatorias IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$  y una reducción de IFN- $\gamma$ , estos cambios en la respuesta inmune temprana durante la amebiasis pueden ocurrir de forma similar en co-infecciones con otras bacterias enteropatógenas, frecuentemente reportadas, lo que puede llevar a la progresión de la enfermedad.

## 12. Bibliografía

- Andra, J., O. Berninghausen, et al. (2004). "Membrane lipid composition protects *Entamoeba histolytica* from self-destruction by its pore-forming toxins." FEBS Lett 564(1-2): 109-115.
- Ankri, S., T. Stolarsky, et al. (1998). "Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis." Mol Microbiol 28(4): 777-785.
- Asgharpour, A., C. Gilchrist, et al. (2005). "Resistance to intestinal *Entamoeba histolytica* infection is conferred by innate immunity and Gr-1+ cells." Infect Immun 73(8): 4522-4529.
- Banuelos, C., G. Garcia-Rivera, et al. (2005). "Functional characterization of EhADH112: an *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein." Exp Parasitol 110(3): 292-297.
- Bergstrom KS, Kissoon-Singh V, Gibson DL, Ma C, Montero M, Sham HP, Ryz N, Huang T, Velcich A, Finlay BB, Chadee K, Vallance BA. (2010). Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. PLoS Pathog. 6(5):e1000902.
- Boettner, D. R., C. D. Huston, et al. (2005). "*Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* utilize externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of erythrocytes." Infect Immun 73(6): 3422-3430.
- Boettner, D. R., C. D. Huston, et al. (2008). "*Entamoeba histolytica* phagocytosis of human erythrocytes involves PATMK, a member of the transmembrane kinase family." PLoS Pathog 4(1): e8.
- Boniface, K., Bak-Jensen, K.S., Li, Y., Blumenschein, W.M., McGeachy, M.J., McClanahan, T.K., McKenzie, B.S., Kastelein, R.A., Cua, D.J., de Waal Malefyt, R. (2009). Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. Journal of Experimental Medicine 206, 535–548.
- Bos, H. J. and R. J. van de Griend (1977). "Virulence and toxicity of axenic *Entamoeba histolytica*." Nature 265(5592): 341-343.

- Bracha, R. and D. Mirelman (1984). "Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole." *J Exp Med* 160(2): 353-368.
- Bracha, R., Y. Nuchamowitz, et al. (1999). "Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence." *Mol Microbiol* 34(3): 463-472.
- Brewer, M. T., P. N. Agbedanu, et al. (2013). "Evidence for a bacterial lipopolysaccharide-recognizing G-protein-coupled receptor in the bacterial engulfment by *Entamoeba histolytica*." *Eukaryot Cell* 12(11): 1433-1438.
- Bruchhaus, I., T. Jacobs, et al. (1996). "*Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes." *Mol Microbiol* 22(2): 255-263.
- Chadee, K., W. A. Petri, Jr., et al. (1987). "Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*." *J Clin Invest* 80(5): 1245-1254.
- Charo, I.F., Ransohoff, R.M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *The New England Journal of Medicine* 354, 610–621.
- Christy, N. C., S. N. Buss, et al. (2012). "Common pathways for receptor-mediated ingestion of *Escherichia coli* and LDL cholesterol by *Entamoeba histolytica* regulated in part by transmembrane kinase 39." *Int J Parasitol* 42(4): 393-400.
- Cobo ER, Kissoon-Singh V, Moreau F, Holani R, Chadee K. (2017). MUC2 Mucin and Butyrate Contribute to the Synthesis of the Antimicrobial Peptide Cathelicidin in Response to *Entamoeba histolytica*- and Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis. *Infect Immun*. 85(3). pii: e00905-16
- Cornick S, Moreau F, Gaisano HY, Chadee K. (2017). *Entamoeba histolytica*-Induced Mucin Exocytosis Is Mediated by VAMP8 and Is Critical in Mucosal Innate Host Defense. *MBio*. 8(5). pii: e01323-17.

- Debnath, A., J. S. Tashker, et al. (2007). "Transcriptional and secretory responses of *Entamoeba histolytica* to mucins, epithelial cells and bacteria." *Int J Parasitol* 37(8-9): 897-906.
- Deloer S, Nakamura R, Kikuchi M, Moriyasu T, Kalenda YDJ, Mohammed ES4, Senba M, Iwakura Y, Yoshida H, Hamano S. (2017). IL-17A contributes to reducing IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio and persistence of *Entamoeba histolytica* during intestinal amebiasis. *Parasitol Int.* 66(6):817-823.
- Denis, M. and K. Chadee (1988). "Immunopathology of *Entamoeba histolytica* infections." *Parasitol Today* 4(9): 247-252.
- Denis, M. and K. Chadee (1989). "Human neutrophils activated by interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha kill *Entamoeba histolytica* trophozoites in vitro." *J Leukoc Biol* 46(3): 270-274.
- Diamond, L. S. (1961). "Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*." *Science* 134(3475): 336-337.
- Diamond, L. S. (1968). "Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amebae." *J Parasitol* 54(5): 1047-1056.
- Diamond, L. S. (1982). "Amebiasis: nutritional implications." *Rev Infect Dis* 4(4): 843-850.
- Diamond, L. S., M. Tanimoto Weki, et al. (1978). "Production of cecal lesions in newborn guinea pigs with axenically cultivated *Entamoeba histolytica*." *Arch Invest Med (Mex)* 9 Suppl 1: 223-228.
- Dodson, J. M., P. W. Lenkowski, Jr., et al. (1999). "Infection and immunity mediated by the carbohydrate recognition domain of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin." *J Infect Dis* 179(2): 460-466.
- Eichinger, D. (2001). "A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*." *J Eukaryot Microbiol* 48(1): 17-21.
- Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. (2000). Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev.*13 (2):318-31.

- Espinosa-Cantellano, M. and A. Martinez-Palomo (2000). "Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease." *Clin Microbiol Rev* 13(2): 318-331.
- Espinosa-Cantellano, M. and A. Martinez-Palomo (2000). "Recent developments in amoebiasis research." *Curr Opin Infect Dis* 13(5): 451-456.
- Galvan-Moroyoqui, J. M., M. Del Carmen Dominguez-Robles, et al. (2008). "The interplay between *Entamoeba* and enteropathogenic bacteria modulates epithelial cell damage." *PLoS Negl Trop Dis* 2(7): e266.
- Garcia-Rivera, G., M. A. Rodriguez, et al. (1999). "*Entamoeba histolytica* : a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein." *Mol Microbiol* 33(3): 556-568.
- Ghadirian, E. and D. T. Bout (1988). "In vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites by interferon-gamma-activated mouse macrophages." *Immunobiology* 176(4-5): 341-353.
- Goldston, A. M., R. R. Powell, et al. (2012). "Exposure to host ligands correlates with colocalization of Gal/GalNAc lectin subunits in lipid rafts and phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate signaling in *Entamoeba histolytica*." *Eukaryot Cell* 11(6): 743-751.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* 3, 23–35.
- Gottke, M. U., K. Keller, et al. (1998). "Functional heterogeneity of colonic adenocarcinoma mucins for inhibition of *Entamoeba histolytica* adherence to target cells." *J Eukaryot Microbiol* 45(2): 17S-23S.
- Guerrant, R. L., J. Brush, et al. (1981). "Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils." *J Infect Dis* 143(1): 83-93.
- Guo X, Barroso L, Lysterly DM, Petri WA Jr, Houpt ER. (2011). CD4+ and CD8+ Tcell- and IL-17-mediated protection against *Entamoeba histolytica* induced by a recombinant vaccine. *Vaccine* 29:772–7.
- Guo, X., Stroup, S.E., Houpt, E. (2008). Persistence of *Entamoeba histolytica* infection in CBA mice owes to intestinal IL-4 production and inhibition of protective IFN- $\gamma$ . *Mucosal Immunology* 1, 139–146.

- He C, Nora GP, Schneider EL, Kerr ID, Hansell E, Hirata K, Gonzalez D, Sajid M, Boyd SE, Hruz P, Cobo ER, Le C, Liu WT, Eckmann L, Dorrestein PC, Houpt ER, Brinen LS, Craik CS, Roush WR, McKerrow J, Reed SL.(2010). A novel *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase, EhCP4, is key for invasive amebiasis and a therapeutic target. *J Biol Chem.* 2010; 285(24):18516-27.
- Hecht, O., N. A. Van Nuland, et al. (2004). "Solution structure of the pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*." *J Biol Chem* 279(17): 17834-17841.
- Hellberg, A., R. Nickel, et al. (2001). "Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils." *Cell Microbiol* 3(1): 13-20.
- Huston CD1, Boettner DR, Miller-Sims V, Petri WA Jr. (2003). Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun.* 71(2):964-72.
- Jacobs, T., I. Bruchhaus, et al. (1998). "Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*." *Mol Microbiol* 27(2): 269-276.
- Jarillo-Luna, R. A., R. Campos-Rodriguez, et al. (2002). "*Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance." *Exp Parasitol* 101(1): 40-56.
- Kammanadiminti, S.J., Dey, I., Chadee, K. (2007). Induction of monocyte chemotactic protein-1 in colonic epithelial cells by *Entamoeba histolytica* is mediated via the phosphatidylinositol 3-kinase/p65 pathway. *Infection and Immunity* 75, 1765–1770.
- Kissoon-Singh, V., L. Mortimer, et al. (2011). "*Entamoeba histolytica* cathepsin-like enzymes: interactions with the host gut." *Adv Exp Med Biol* 712: 62-83.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 cells. *Annual Review of Immunology* 27, 485–517.

- Kumate-Gutiérrez (2008). Amibiasis. Infectología clínica. M. Editores. Mexico 209-222.
- Leippe, M., J. Andra, et al. (1994). "Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes." *Mol Microbiol* 14(5): 895-904.
- Lemos, H.P., Grespana, R., Vieiraa, S.M., Cunhaa, T.M., Verri Jr., W.A., Fernandes, K.S., Soutoa, F.O., McInnes, I.B., Ferreiraa, S.H., Liewc, F.Y., Cunhaa, F.Q. (2009). Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN production. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 5954–5959.
- Lidell, M. E., D. M. Moncada, et al. (2006). "*Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(24): 9298-9303.
- Lin, J.Y., Chadee, K., (1992). Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of Immunology* 148, 3999–4005.
- Lushbaugh, W. B., A. B. Kairalla, et al. (1978). "Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated *Entamoeba histolytica*." *Am J Trop Med Hyg* 27(2 Pt 1): 248-254.
- M. Shibayama, J. J. S.-L., J. Aguirre-García and V. Tsutsumi (2015). Chapter 23 Pathology, Pathogenesis and Experimental Amebiasis *Amebiasis*. T. Nozaki, Springer Japon: 411-431.
- Marie C1, Petri WA Jr. (2014). Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol*. 68:493-520.
- Martinez-Palomo, A., V. Tsutsumi, et al. (1989). "Ultrastructure of experimental intestinal invasive amebiasis." *Am J Trop Med Hyg* 41(3): 273-279.
- Matthiesen J, Bär AK, Bartels AK, Marien D, Ofori S, Biller L, Tannich E, Lotter H, Bruchhaus I. (2013). Overexpression of specific cysteine peptidases confers

- pathogenicity to a nonpathogenic *Entamoeba histolytica* clone. MBio.4(2). pii: e00072-13.
- McCoy, J. J., A. M. Weaver, et al. (1994). "Use of monoclonal anti-light subunit antibodies to study the structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc adherence lectin." Glycoconj J 11(5): 432-436.
- Meléndez-López SG, Herdman S, Hirata K, Choi MH, Choe Y, Craik C, Caffrey CR, Hansell E, Chávez-Munguía B, Chen YT, Roush WR, McKerrow J, Eckmann L, Guo J, Stanley SL Jr, Reed SL. (2007). Use of recombinant *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 1 to identify a potent inhibitor of amebic invasion in a human colonic model. Eukaryot Cell. 6(7): 1130–1136.
- Mendoza-Macias, C. L., M. P. Barrios-Ceballos, et al. (2009). "*Entamoeba histolytica*: effect on virulence, growth and gene expression in response to monoxenic culture with Escherichia coli 055." Exp Parasitol 121(2): 167-174.
- Meyer M., Fehling H., Matthiesen J, Lorenzen S, Schuldt K, Bernin H, Zaruba M, Lender C, Ernst T, Ittrich H, Roeder T, Tannich E, Lotter H, Bruchhaus I.(2016).Overexpression of Differentially Expressed Genes Identified in Non-pathogenic and Pathogenic *Entamoeba histolytica* Clones Allow Identification of New Pathogenicity Factors Involved in Amoebic Liver Abscess Formation. PLoSPathog. 12(8):e1005853.
- Mirelman, D. (1987). "Effect of culture conditions and bacterial associates on the zymodemes of *Entamoeba histolytica*." Parasitol Today 3(2): 37-40; discussion 37.
- Mirelman, D., R. Bracha, et al. (1986). "*Entamoeba histolytica*: effect of growth conditions and bacterial associates on isoenzyme patterns and virulence." Exp Parasitol 62(1): 142-148.
- Moncada, D., K. Keller, et al. (2006). "Antisense inhibition of *Entamoeba histolytica* cysteine proteases inhibits colonic mucus degradation." Gastroenterology 130(3): 721-730.
- Moonah, S. N., N. M. Jiang, et al. (2013). "Host immune response to intestinal amebiasis." PLoS Pathog 9(8): e1003489.

- Mortimer L1, Chadee K. (2010). The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol*.126 (3):366-80.
- Nakada-Tsukui K, Nozaki T. (2016). Immune Response of Amebiasis and Immune Evasion by *Entamoeba histolytica*. *Front Immunol*.12 (7):175.
- Nowak, N., H. Lotter, et al. (2004). "Resistance of *Entamoeba histolytica* to the cysteine proteinase inhibitor E64 is associated with secretion of proenzymes and reduced pathogenicity." *J Biol Chem* 279(37): 38260-38266.
- Ofek, I. and N. Sharon (1988). "Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria." *Infect Immun* 56(3): 539-547.
- Olivos-García A, Tello E, Nequiz-Avendaño M, González-Canto A, López-Vancell R, García de León MC, Montfort I, Pérez-Tamayo R. (2004). Cysteine proteinase activity is required for survival of the parasite in experimental acute amoebic liver abscesses in hamsters. *Parasitology*.129(1):19-25.
- Pacheco-Yépez J, Galván-Moroyoqui JM, Meza I, Tsutsumi V, Shibayama M. (2011). Expression of cytokines and their regulation during amoebic liver abscess development. *Parasite Immunol*. 33(1):56-64.
- Paniagua, G. L., E. Monroy, et al. (2007). "Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children." *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 6: 17.
- Peterson KM, Shu J, Duggal P, Haque R, Mondal D, Petri WA Jr. (2010). Association between TNF- $\alpha$  and *Entamoeba histolytica* diarrhea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82(4):620–25
- Petri, W. A., Jr., M. D. Chapman, et al. (1989). "Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*." *J Biol Chem* 264(5): 3007-3012.
- Pillai, D. R., P. S. Wan, et al. (1999). "The cysteine-rich region of the *Entamoeba histolytica* adherence lectin (170-kilodalton subunit) is sufficient for high-affinity Gal/GalNAc-specific binding in vitro." *Infect Immun* 67(8): 3836-3841.
- Que X and Reed SL. (2000) Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 13(2): 196–206.

- R, P. E.-T. (2006). Amibiasis. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas A. F. y. R. P. Tamayo. México Editoriales de Textos Mexicanos 321-336.
- Rivero-Nava, L., J. Aguirre-García, et al. (2002). "*Entamoeba histolytica*: acute granulomatous intestinal lesions in normal and neutrophil-depleted mice." *Exp Parasitol* 101(4): 183-192.
- Salles, J. M., L. A. Moraes, et al. (2003). "Hepatic amebiasis." *Braz J Infect Dis* 7(2): 96-110.
- Sánchez V, Serrano-Luna J, Ramírez-Moreno E, Tsutsumi V, Shibayama M. *Entamoeba histolytica*: (2016). Overexpression of the gal/galnac lectin, ehcp2 and ehcp5 genes in an in vivo model of amebiasis. *Parasitol Int.* 65(A):665-667
- Sanchez-Guillen MDC, Perez-Fuentes R, Salgado-Rosas H, Ruiz-Arguelles A, Ackers J, et al. (2002). Differentiation of *Entamoeba histolytica*/Entamoeba dispar by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66(6):731-37
- Sateriale A, Huston CD. (2011). A Sequential Model of Host Cell Killing and Phagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *J Parasitol Res.* 926706
- Sateriale A, Vaithilingam A, Donnelly L, Miller P, Huston CD. (2012). Feed-forward regulation of phagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun.* 80(12):4456-62.
- Sateriale, A. and C. D. Huston (2011). "A Sequential Model of Host Cell Killing and Phagocytosis by *Entamoeba histolytica*." *J Parasitol Res* 2011: 926706.
- Scholze, H. and W. Schulte (1988). "On the specificity of a cysteine proteinase from *Entamoeba histolytica*." *Biomed Biochim Acta* 47(2): 115-123.
- Serrano-Luna, J., C. Pina-Vazquez, et al. (2013). "Proteases from *Entamoeba* spp. and Pathogenic Free-Living Amoebae as Virulence Factors." *J Trop Med* 2013: 890603.
- Seydel, K. B. and S. L. Stanley, Jr. (1998). "*Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor

- necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis." *Infect Immun* 66(6): 2980-2983.
- Shibayama, M., V. Rivera-Aguilar, et al. (2008). "Innate immunity prevents tissue invasion by *Entamoeba histolytica*." *Can J Microbiol* 54(12): 1032-1042.
- Shroyer NF, Helmraath MA, Wang VY, Antalffy B, Henning SJ, Zoghbi HY. (2007). Intestine-specific ablation of mouse atonal homolog 1 (Math1) reveals a role in cellular homeostasis. *Gastroenterology*. 132(7):2478-88.
- Stanley, S. L. (2001). "Pathophysiology of amoebiasis." *Trends Parasitol* 17(6): 280-285.
- Stanley, S. L., Jr. (2003). "Amoebiasis." *Lancet* 361(9362): 1025-1034.
- Stanley, S. L., Jr., T. Zhang, et al. (1995). "Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice." *Infect Immun* 63(4): 1587-1590.
- Stauffer, W. and J. I. Ravdin (2003). "*Entamoeba histolytica*: an update." *Curr Opin Infect Dis* 16(5): 479-485.
- Tannich, E., D. Mirelman, et al. (2003). "Meeting report: EMBO workshop "Pathogenesis of amoebiasis: from genomics to disease", Institut Pasteur, Paris, May 19-22, 2003." *Protist* 154(3-4): 293-298.
- Tawiah A, Cornick S, Moreau F, Gorman H, Kumar M, Tiwari S, Chadee K. High (2018). MUC2 Mucin Expression and Misfolding Induce Cellular Stress, Reactive Oxygen Production, and Apoptosis in Goblet Cells. *Am J Pathol*.188 (6):1354-1373.
- Tsutsumi, V., R. Mena-Lopez, et al. (1984). "Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation." *Am J Pathol* 117(1): 81-91.
- Varet H, Shaulov Y, Sismeiro O, Trebicz-Geffen M, Legendre R, Coppée JY, Ankri S, Guillen N. (2018). Enteric bacteria boost defences against oxidative stress in *Entamoeba histolytica*. *Sci Rep*. 8(1):9042.
- Velazquez, C., M. Shibayama-Salas, et al. (1998). "Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice." *Parasite Immunol* 20(6): 255-262.

- Vines, R. R., G. Ramakrishnan, et al. (1998). "Regulation of adherence and virulence by the *Entamoeba histolytica* lectin cytoplasmic domain, which contains a beta2 integrin motif." *Mol Biol Cell* 9(8): 2069-2079.
- Weber C, Koutero M, Dillies MA, Varet H, Lopez-Camarillo C, Coppée JY, Hon CC, Guillén N. (2016). Extensive transcriptome analysis correlates the plasticity of *Entamoeba histolytica* pathogenesis to rapid phenotype changes depending on the environment. *Sci Rep*.6:35852.
- Winkelmann, J., M. Leippe, et al. (2006). "A novel saposin-like protein of *Entamoeba histolytica* with membrane-fusogenic activity." *Mol Biochem Parasitol* 147(1): 85-94.
- Wittner, M. and R. M. Rosenbaum (1970). "Role of bacteria in modifying virulence of *Entamoeba histolytica*. Studies of amebae from axenic cultures." *Am J Trop Med Hyg* 19(5): 755-761.
- Ximénez C, González E, Nieves M, Magaña U, Morán P, Gudiño-Zayas M, Partida O, Hernández E, Rojas-Velázquez L, García de León MC, Maldonado H.(2017). Differential expression of pathogenic genes of *Entamoeba histolytica* vs *E. dispar* in a model of infection using human liver tissue explants. *PLoS One*. 12(8):e0181962.
- Yao, C., Sakata, D., Esaki, Y., Li, Y., Matsuoka, T., Kuroiwa, K., Sugimoto, Y., Shuh Narumiya, S., 2009. Prostaglandin E2–EP4 signaling promotes immune inflammation through TH1 cell differentiation and TH17 cell expansion. *Nature Medicine* 15, 633–640.
- Yu, Y. and K. Chadee (1997). "*Entamoeba histolytica* stimulates interleukin 8 from human colonic epithelial cells without parasite-enterocyte contact." *Gastroenterology* 112(5): 1536-1547.
- Zaki, M., P. Meelu, et al. (2002). "Simultaneous differentiation and typing of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*." *J Clin Microbiol* 40(4): 1271-1276.

### 13. Bibliografía Electronica

OMS (1997). "Amoebiasis." <http://www.who.int/ith/diseases/amoebiasis/en/>

OMS.(2013)."Enfermedadesdiarreicas."from

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>.

(<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

<https://mmejias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-general.php>