



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

“Efecto de la apo-Lactoferrina bovina sobre algunos  
mecanismos de patogenicidad de *Entamoeba histolytica*”

TESIS

Que presenta

Q.F.B. Daniela Zarzosa Moreno

Para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
BIOLOGÍA CELULAR

Directores de Tesis

Dra. Guadalupe Mireya de la Garza Amaya

Dr. José de Jesús Serrano Luna

CIUDAD DE MÉXICO

2020

## **TUTORES**

### **DRA. GUADALUPE MIREYA DE LA GARZA AMAYA**

Investigadora Titular del Departamento de Biología Celular, Cinvestav-IPN, Ciudad de México.

### **DR. JOSÉ DE JESÚS SERRANO LUNA**

Investigador Titular del Departamento de Biología Celular, Cinvestav-IPN, Ciudad de México.

## **ASESORES**

### **Doctora Matilde Mineko Shibayama Salas**

Investigadora Titular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav-IPN, Ciudad de México.

### **Doctor José Eduardo Pérez Salazar**

Investigador Titular del Departamento de Biología Celular, Cinvestav-IPN, Ciudad de México.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la **Dra. Mireya de la Garza** y al **Dr José de Jesús Serrano** tutores de esta tesis. Que son perfecto ejemplo de que la calidad humana es compatible con la excelencia académica. Gracias por su valiosa tutoría, por aceptarme en el laboratorio y haberme compartido sus conocimientos. Siempre agradeceré sus enseñanzas, sus consejos y su apoyo. Ha sido un privilegio contar con su guía.

A mis asesores:

**Dra Mineko Shibayama** Salas del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, por su apoyo, valiosa asesoría y crítica en el desarrollo de este proyecto. Gracias por su amabilidad, su tiempo y disposición.

Al **Dr. José Eduardo Pérez Salazar** por su disposición y pronta respuesta para asesorar este proyecto, su valiosa aportación y críticas.

Al **Dr Leopoldo Flores** que por su apoyo y valiosa asesoría al inicio de este proyecto y aunque no pudo estar con nosotros se aprecia su valiosa aportación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca recibida durante mi maestría.

A los integrantes del laboratorio 52:

A **Magda Reyes López** por su amistad, sus enseñanzas, paciencia y sus consejos y su apoyo técnico brindado en todo momento. A **Christian Ávalos**, por su amistad, sus enseñanzas y valiosos consejos. A **Delfino Godínez Vargas** y a **Carlos Villasana** por su amistad y apoyo técnico.

A **Clara Hernández Chávez** por su incondicional apoyo secretarial en todos los trámites administrativos.

A **Angélica Silva Olivares** por su disposición para compartir su conocimiento y apoyo técnico.

A mis padres **Luis Zarzosa Escobedo** y **Diana Moreno Rodríguez** por apoyarme para poder continuar con mis estudios profesionales y por lo tanto mi desarrollo como profesionista. Por ser los principales promotores de mis sueños, y por cada día confiar y creer en mi. Por cada consejo y palabra de aliento, Gracias por el amor y paciencia. Este logro se los debo a ustedes siempre, los amo.

A mi novio **Fernando Navarro Villanueva** por apoyarme en mis decisiones y por siempre estar a mi lado, dándome motivación y esperanza. Gracias por tus buenos consejos, darme otra perspectiva, tu ayuda, palabras de aliento, tu cariño, amor y paciencia. Por sacrificar tu tiempo para que yo pudiera cumplir con el mío. Te amo

Gracias a esas personas importantes en mi vida, mis amigos que siempre estuvieron listos para brindarme toda su ayuda y compartir sonrisas: **Areli Robles Romero** y **Oscar Valencia Maldonado**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>II</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>III</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 AMIBIASIS.....	1
1.2 <i>ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS</i> .....	3
1.2.1 <i>Mecanismos de Patogenicidad</i> .....	4
1.2.2 INMUNIDAD INNATA Y <i>E. HISTOLYTICA</i> .....	21
1.2.3. RESPUESTA HUMORAL Y <i>E. HISTOLYTICA</i> .....	22
1.2.4. TRATAMIENTO AMIBIASIS.....	24
1.3. LACTOFERRINA.....	25
1.3.1. <i>Estructura</i> .....	25
1.3.2. <i>Localización</i> .....	27
1.3.3. <i>Funciones</i> .....	28
<b>2. ANTECEDENTES DIRECTOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>5. OBJETIVO.....</b>	<b>34</b>
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
6.1 REACTIVOS .....	34
6.2 CULTIVOS DE <i>E. HISTOLYTICA</i> .....	34
6.3 MEDIO DE CULTIVO BAJO EN HIERRO .....	34
6.4 VIABILIDAD CELULAR .....	35
6.5 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS TOTALES AMIBIANOS.....	35
6.6 MEDIO CONDICIONADO .....	36
6.7 ZIMOGRFÍA.....	36
6.8 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA Y DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE).....	37
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
7.1 VIABILIDAD .....	37
.....	39
7.2 PRODUCCIÓN Y SECRECIÓN DE PROTEASAS.....	40
7.2.1. <i>Extracto Total</i> .....	40
7.2.2. <i>Medio Condicionado</i> .....	42
<b>9. DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
<b>11. CONCLUSIONES .....</b>	<b>54</b>
<b>12. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>55</b>
<b>13. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>56</b>

## RESUMEN

La amibiasis es una enfermedad infecciosa causada por el protozoario *Entamoeba histolytica*. La enfermedad afecta el intestino grueso y en algunos casos es capaz de causar una infección en el hígado. El metronidazol es el medicamento de primera línea para tratar la amibiasis, pero tiene efectos secundarios, está clasificado como posible carcinogénico y ya se han reportado casos de resistencia. Por lo que existe la necesidad de buscar alternativas para tratar la amibiasis, una opción es la lactoferrina (Lf), una glicoproteína presente en las secreciones de mamíferos, es parte del sistema inmune innato pues tiene actividad antimicrobiana. Ha demostrado ser amibicida *in vitro* y también logra resolver amibiasis intestinal y hepática *in vivo*.

El mecanismo de acción aún necesita ser elucidado, por lo que se decidió investigar el efecto de una concentración subletal de apo-Lf bovina (100  $\mu\text{M}$ ) sobre las proteasas de *E. histolytica*, que es poseedora de una gran cantidad y variedad de proteasas que además de relacionarse con la supervivencia y adquisición de nutrientes, juegan un papel fundamental en la infección, invasión y sobretodo en la destrucción del tejido del hospedero. Se realizaron zimografías con gel copolimerizado con gelatina al 1% como sustrato estándar para ver su actividad, después de exponer a los trofozoítos a 100  $\mu\text{M}$  de apo-Lf bovina por 3 h, se realizaron zimografías del extracto total amibiano y del medio condicionado.

Se encontró que la apo-Lf bovina modifica el patrón de proteasas del extracto total, produciendo una proteasa de aproximadamente 225 kDa que no se produce en las condiciones control. También se modifica la actividad proteolítica de una proteasa de aproximadamente 134 kDa en el medio condicionado, reduciendo la actividad en un 20.70%.

## SUMMARY

Amebiasis is an infectious disease caused by the protozoan *Entamoeba histolytica*, it affects mainly the colon and, in some cases, can cause infection in the liver. Metronidazole is the first-choice medication to treat amebiasis, but it has side effects, this drug is classified as a possible carcinogen, and cases of resistance have been reported. Hence, there is the need to look for alternatives to treat amebiasis, one viable option is lactoferrin (Lf), a glycoprotein present in mammalian secretions, it is part of the innate immune system as it has antimicrobial activity. Moreover, it has in vitro amoebicide capacity and also resolves intestinal and hepatic amebiasis in vivo.

The mechanism of action still needs to be elucidated, so the effect of a sublethal concentration of bovine apo-Lf (100  $\mu$ M) on the proteases of *E. histolytica* was investigated. This protozoan has a wide variety of proteases that not only are related to the survival and acquisition of nutrients, they play a fundamental role in infection, invasion, and, above all, in the destruction of host tissue.

After exposing the trophozoites to 100  $\mu$ M of bovine apo-Lf for 3 h substrate gel copolymerized with 1% gelatin as a standard substrate to observe proteolytic degradation of the total amoebic extract and the conditioned medium were performed. Bovine apo-Lf was found to modify the protease pattern of the total extract, producing a protease of approximately 225 kDa that was not produced under control conditions. The proteolytic activity of a protease of approximately 134 kDa in the conditioned medium was also modified, reducing the activity by 20.70%.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Amibiasis

La amibiasis es una enfermedad infecciosa causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. La amibiasis puede cursar con o sin síntomas; en caso de presentar síntomas, éstos pueden ser leves o graves, es decir, pueden ser desde una diarrea leve hasta una colitis o bien una disentería amibiana. La enfermedad afecta principalmente el intestino grueso, donde se forman úlceras; en algunos casos muy graves los trofozoítos (amibas) son capaces de invadir tejidos distintos del intestino, causando una infección extraintestinal. La infección extraintestinal más común es la amibiasis hepática, donde *E. histolytica* viaja por la vena porta hacia el hígado donde se instala, causando absceso hepático amibiano (AHA) (Nozaki & Bhattacharya, 2015).

En el colon se pueden apreciar las lesiones ocasionadas por las amibas, se pueden distinguir dos tipos de úlceras: úlceras nodulares y lesiones irregulares. Las características de las úlceras nodulares son las siguientes: tamaño de 0.1 a 0.5 cm, son redondas, con bordes elevados y usualmente el centro es necrótico; las lesiones irregulares son de varios centímetros, se encuentran mayoritariamente en el ciego y el colon ascendente, tienen márgenes elevados y están rellenas de fibrina. Cuando las lesiones progresan hay una gran necrosis e inflamación, que en casos graves puede implicar a toda la pared intestinal y finalmente llegar a la perforación de ésta.

El AHA es la infección extraintestinal más común. Las lesiones en el hígado se caracterizan por una sustitución del parénquima hepático por material necrótico, y se puede observar un color amarillento y de consistencia cremosa (Shibayama et al., 2015). En 1984 fue descrita la secuencia de los eventos morfológicos que ocurren durante la formación del AHA, desde las etapas más tempranas hasta los 7 días de desarrollo de la lesión en un modelo animal. Al hámster se le inocularon las amibas en la vena porta y haciendo cortes y posteriores tinciones histológicas, se encontró que después de 1 h se encontraban esparcidos por los lóbulos y se encontraban rodeados

de células polimorfonucleares (PMN), a las 3 h ya se podía observar una reacción inflamatoria aguda y también trofozoítos rodeados de cientos de células PMN y algunas células mononucleares, conforme pasaba el tiempo el infiltrado celular en las lesiones era aún mayor y estaban acompañados de leucocitos lisados. Finalmente se desarrollaron áreas necróticas extensas entre los 5 y 7 días (Tsutsumi et al., 1984), los autores sugirieron que el extenso daño no es causado por las amibas directamente hacia a las células del hígado, y que en realidad el daño esta mediado mayoritariamente por la lisis de las células PMN, siendo un mecanismo importante de la destrucción del tejido del hospedero. Posteriormente se comprobó la información anterior en el mismo modelo animal, por medio de microscopia electrónica, adicionalmente se demostró que al sitio también se reclutan otro tipo de células como macrófagos y eosinófilos (Tsutsumi & Martinez-Palomo, 1988).

La amibiasis afecta a toda la población mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO, por sus siglas en inglés) estima que 50 millones de personas están infectadas con este parásito, y aproximadamente hay 100,000 muertes al año a causa de esta enfermedad. A nivel mundial las enfermedades diarreicas ocupan el lugar número 5 en la categoría de causa de muerte (Global Burden of Disease 2004 WHO). Además, el 16% de muertes de niños menores de 5 años (postnatal) y el 2.6% (neonatal) son a causa de enfermedades diarreicas, dentro de las que se encuentra la amibiasis (Global Burden of Disease 2004 WHO). La amibiasis se encuentra en el segundo lugar de enfermedades causadas por parasitosis intestinal y es la tercera causa de muerte debida a parásitos (López-Soto et al., 2009).

A pesar de ser un problema global, los países en vías de desarrollo son los más afectados, por la falta de higiene y servicios de salud adecuados. En este tipo de países se considera a la amibiasis como endémica, este es el caso de México, en el que durante el 2018 se reportaron un total de 133,760 casos de amibiasis intestinal y 319 casos de AHA. Los estados con mayor incidencia de amibiasis intestinal son Chiapas, Oaxaca y Veracruz con un total de 15,440, 10,941 y 10,713 casos en el 2018, respectivamente. En relación al AHA, los estados con mayor incidencia son Sinaloa, Jalisco y Sonora con 46, 41 y 24



casos en el 2018. (SINAVE/DGE/Salud 2019. Información preliminar, incluye casos probables).

Por otro lado, hasta la semana 32 del 2019, se tienen reportados en nuestro país un total de 118,757 casos de amibiasis intestinal y 460 casos de AHA (SINAVE/DGE/Salud 2019. Información preliminar, incluye casos probables). Las causas de muerte en el periodo que va de 1998 a 2014 debidas a enfermedades infecciosas y parasitarias ocuparon el tercer lugar (Gutiérrez-Jiménez, Luna-Cazáres, & Vidal, 2017). Así mismo, en un estudio realizado en el año 2015 se encontró que en tres comunidades del estado de Durango la seroprevalencia de *E. histolytica* es del 41.8% (Alvarado-Esquivel, et al., 2015).

## 1.2 *Entamoeba histolytica*

*E. histolytica* es el protozoo agente etiológico de la amibiasis. Su nombre viene del griego *histos* que significa tejido y *lysis* que significa disolución, lo que significa una amiba que disuelve tejidos. Como el nombre lo indica, este parásito es capaz de causar una gran destrucción a los tejidos del hospedero (Ghosh et al., 2019).

El ciclo de vida del parásito consiste de dos formas fundamentales: el quiste (forma infectiva) y el trofozoíto (forma invasiva). La infección al ser humano comienza con la ingestión de los quistes por medio de agua o comida contaminada. El quiste es resistente al pH del estómago por lo que puede llegar sin contratiempos al intestino, una vez en el íleon terminal se desenquista y puede llegar fácilmente intestino grueso, donde se multiplica, establece y coloniza, aquí es donde puede o no causar enfermedad. El trofozoíto se multiplica por fisión binaria. Algunos trofozoítos se enquistan de nuevo y salen junto con las heces en forma de quiste, los cuales pueden ser ingeridos por el mismo u otro hospedero, perpetuando el ciclo de vida. Adicionalmente, en algunos casos las amibas pueden invadir la mucosa intestinal o bien diseminarse a otros órganos como el hígado y causar el llamado AHA; formas menos frecuentes de infección son la amibiasis en pulmón y cerebro (Nozaki & Bhattacharya, 2015).

## 1.2.1 Mecanismos de Patogenicidad

### 1.2.1.1. Adherencia

Las moléculas de superficie más estudiadas de *E. histolytica* son: la proteína rica en lisina y ácido glutámico KERP1, la adhesina de 112 kDa que se asocia con una cisteína-proteasa formando un complejo y por último la lectina de 260 kDa llamada también la lectina inhibible por galactosa y N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNAc) (Faust & Guillen, 2015).

#### 1.2.1.1.1. KERP1

KERP1 es una proteína rica en lisina y ácido glutámico que se encuentra en la membrana plasmática de la amiba, así como en vesículas internas. Está involucrada en el proceso de adhesión a la superficie de las células del hospedero (Faust & Guillen, 2015).

#### 1.2.1.1.2. Complejo adhesina 112 y Cisteína proteasa 112 -kDa

Se le llama también el complejo proteico asociado a la superficie; está conformado por dos polipéptidos, uno de 49 kDa y otro de 79 kDa. El de 49 kDa es una cisteína proteasa a la que se le llama proteasa 112 (CP112); el de 79 kDa es la adhesina 112.

En realidad, el peso molecular del complejo está entre 109 y 124 kDa, dependiendo de las modificaciones postraduccionales que tenga la cisteín-proteasa (García-Rivera et al., 1999). El complejo está localizado en la membrana de la amiba y también se ha encontrado en vacuolas intracelulares. Este complejo se cree está involucrado en adherencia y fagocitosis.

La cisteín-proteasa tiene un dominio transmembranal putativo y una vez maduro tiene un motivo de unión a integrinas (RGD) que pudiera tener la función de unirse a integrinas del hospedero. (Faust & Guillen, 2015; García, Gutiérrez-Kobeh, & Vancell, 2015).

#### 1.2.1.1.3. Lectina Gal/GalNAc

Esta lectina es un heterodímero que pesa 260 kDa, está conformado por 3 subunidades: pesada, ligera e intermedia (Petri et al., 2002). La subunidad pesada tiene un peso molecular de 170 kDa, tiene un dominio transmembranal, un dominio intracelular y otro extracelular, el cual es rico en cisteínas. Se cree que esta subunidad puede tener una función de señalización pues en su carboxilo terminal tiene homología con  $\beta$ 2-integrina, señalización involucrada en la reorganización del citoesqueleto (Petri et al., 2002). Adicionalmente, en esta misma subunidad se encuentra el dominio de reconocimiento a carbohidratos (CRD), específicamente en la región rica en cisteínas y tiene una gran afinidad por moléculas del hospedero que contengan los azúcares galactosa y N-acetil-D-galactosamina (Dodson et al., 1999; Mann et al., 1993).

La subunidad ligera pesa 35 kDa y existen diferentes isoformas, adicionalmente tiene un anclaje al acil-glicosil-fosfatidilinositol que le permite su asociación con la membrana. La subunidad pesada y la ligera se encuentran unidas por medio de puentes disulfuro. La subunidad intermedia pesa 150 kDa y se asocia al complejo de la subunidad pesada y la ligera de una manera no covalente (García et al., 2015).

Esta lectina es probablemente una de las moléculas más estudiadas en este protozoario, está presente en la superficie de la amiba y es parte fundamental de la patogénesis. En 1981 se estudió *in vitro* la interacción que existía entre *E. histolytica* y células de ovario de hámster chino (CHO) y con eritrocitos humanos (hRBC), esto se realizó a bajas temperaturas para estudiar exclusivamente la adherencia. Se encontró que los trofozoítos forman rosetas con dichas células y N-acetil-D-galactosamina inhibe la adherencia tanto a células CHO como a hRBC, uniéndose a lo que en ese tiempo se consideraba un receptor localizado en la superficie de la amiba (Ravdin & Guerrant, 1981). Unos cuantos años después, en 1987 la lectina fue aislada por medio de columnas de afinidad con monómeros de galactosa y/o con glicoproteínas que contenían este sacárido y con anticuerpos monoclonales que anteriormente se había demostrado inhibían la adherencia. Finalmente se pudo identificar a la proteína de 170-kD de la lectina y se comprobó su localización en la superficie del trofozoíto por inmunofluorescencia indirecta. Por último, se demostró que la lectina purificada es

capaz de inhibir la adhesión de trofozoítos a células CHO, si éstos habían sido expuestos a la lectina purificada previamente (Petri et al., 1987).

Posteriormente, se comprobó que la lectina Gal/GalNAc se une a los glúcidos que llevan su nombre, que se encuentran en la superficie de las células blanco (Ravdin et al., 1989), esto se logró utilizando mutantes de células CHO las cuales tenían diferentes glicosilaciones en su carbohidratos de superficie. Se encontró que la adhesión de trofozoítos era indetectable cuando en las células CHO mutantes Gal y GalNAc estaban ausentes y la adhesión estaba exacerbada en las mutantes con residuos de Gal incrementada. Cabe mencionar que la lectina se une con mayor afinidad a glicoproteínas de las células blanco, que a los monosacáridos Gal o Gal/NAc (Ravdin et al., 1989).

Además de la adhesión a células blanco a través de la lectina Gal/GalNAc, se ha demostrado la adhesión de la amiba a componentes del moco intestinal a través de esta misma lectina. Antes de llegar a las células del epitelio intestinal, los trofozoítos se encuentran con este moco intestinal, Chadee y colaboradores (1987) al estudiar la interacción entre las amibas y las mucinas tanto de rata como de humano, encontraron que el moco previene la adherencia de los trofozoítos a células CHO. Además, después de una digestión con glicosidasas para remover los residuos de Gal y GalNAc de la mucina, la inhibición de adhesión a células CHO desaparecía. Otro dato importante fue que un anticuerpo monoclonal específico para lectina (170kDa) inhibe la unión al moco. Pero después de la adhesion al moco intestinal la amiba puede proceder a la degradación del mismo. *E. histolytica* cuenta con cisteín-proteasas capaces de alterar la red polimérica de mucina del moco protector. Lidell y colaboradores (2006) utilizando cisteín-proteasas secretadas por los trofozoítos, encontraron los sitios de corte específicos en MUC2, el componente mayoritario de la mucina secretada por las células caliciformes del intestino. También se demostró, por medio de zimografías, donde el gel fue copolimerizado con mucina al 1%, que la EhCP5 purificada de lisados de *E. histolytica* es capaz de degradar mucina (Hellberg et al., 2002). Así mismo, Moncada y colaboradores (2006) encontraron que una mutante de *E. histolytica*, que expresaba un transcrito antisentido de la EhCP5 era menos efectiva para degradar la mucina y que no

podía sobrepasar la barrera de moco para llegar a las células. Pero las amibas sí son capaces de adherirse a monocapas que no tienen la barrera de moco, demostrando que la adhesión no se ve afectada por la falta de EhCP5.

#### 1.2.1.1.4. Proteofosfoglicano

Aparte de las proteínas antes mencionadas, existen otras moléculas que son el componente mayoritario de la superficie de *E. histolytica*; al conjunto de ellas se les llama proteofosfoglicanos (PPG). Estas moléculas de superficie están conformadas por un péptido como estructura base, la cual tiene asociada cadenas de glicanos de diferentes tamaños y composiciones. Así mismo, cuentan con un glicofosfatidilinositol que les permite anclarse y formar parte de la membrana celular del parásito. Estas moléculas forman una capa gruesa que recubre a toda la amiba, brindándole protección (Moody-Haupt et al., 2000).

Existen dos tipos de PPG que son sintetizados por *E. histolytica*, el PPG1 y el PPG2 que también se les conoce como lipofosfoglicano (LPG) y lipofosfopéptidoglicano (LPPG), respectivamente. En ambos PPGs el polipéptido base es rico en aminoácidos ácidos que tienen unidas cadenas de carbohidratos de diferentes tamaños, los que le confieren sus propiedades. Estas cadenas de carbohidratos a su vez se encuentran ensambladas sobre el disacárido glucosa-galactosa (Glc $\beta$ 1-6Gal) (Moody-Haupt et al., 2000).

Se cree que los PPG juegan un papel en la adhesión y citotoxicidad *E. histolytica*, Stanley y colaboradores (1992) para poder estudiar las moléculas de superficie de la amiba, obtuvieron anticuerpo monoclonal de ratones que habían sido inmunizados con los lisados de la cepa patógena HM1:IMSS, este anticuerpo reduce la adhesión a células CHO y la capacidad citotóxica del parásito, adicionalmente el anticuerpo es capaz de unirse a la cepa HM1:IMSS pero no lo hace con la cepa Laredo, *E. invadens*, o *E. moshkovski* evidenciando una expresión diferencial entre especies y cepas, que pudiera estar relacionado con la virulencia. Estos mismos autores determinaron que el antígeno al cual se unía el anticuerpo era un glicoconjugado que contenía lípidos y además se encuentra fosforilado.

Hay autores que afirman que *Entamoeba dispar*, una especie de *Entamoeba* que es

considerada no patógena, no contiene a los llamados LPG en su superficie (Bhattacharya et al., 1999) pues no se lograron identificar en *E. dispar* cuando se analizaron por SDS-PAGE después de su extracción, en contraste con *E. histolytica*. Pero otros autores describen que el LPG sí se encuentra en la superficie de *E. dispar*, aunque en una proporción mucho menor cuando se compara con su contraparte patógena *E. histolytica* (Moody et al., 1997).

Los LPG en la superficie de *E. histolytica* juegan un papel importante en la patogénesis y son factores de virulencia claves, cuando se trata a ratones inmunodeficientes con anticuerpos contra estas moléculas de superficie reducen la inflamación y el daño a tejido o incluso pueden prevenir dicha inflamación y daño, sugiriendo una relación directa con estos efectos (Zhang et al., 2002).

#### **1.2.1.2. Citotoxicidad**

*E. histolytica* es conocida por su gran efecto citotóxico, esta característica es una parte importante de su patogenicidad. Es capaz de ejercer su efecto citotóxico sobre las células epiteliales, y es así como puede pasar de los enterocitos a la mucosa y submucosa intestinal y también migrar hacia otros tejidos, como el hígado (Ghosh et al., 2019).

La citotoxicidad que ejerce *E. histolytica* es dependiente de contacto, la adhesión es un prerrequisito para poder ejercer el efecto citotóxico. Como se mencionó anteriormente, la lectina Gal/GalNAc está estrechamente relacionada con la adhesión a las células blanco, pero además también con la capacidad citotóxica de *E. histolytica*. Al igual que en la adhesión, los sacáridos Gal y GalNAc son capaces de inhibir la citotoxicidad en células CHO (Ravdin & Guerrant, 1981; Saffer & Petri, 1991). Las funciones de adhesión y citotoxicidad están separadas dentro de la lectina, esto se demostró con anticuerpos monoclonales que reconocían a diferentes epítopes de la lectina, uno de estos anticuerpos denominado MAb 3F4 era capaz de disminuir la citotoxicidad sin inhibir la adhesión, demostrando que la lectina se encontraba participando directamente en la capacidad citotóxica de *E. histolytica*, además de que esta función es independiente de la adhesión (Saffer & Petri, 1991).

La lectina se une a los glicoconjugados que se encuentran en la superficie de las células blanco. Cuando se probó el efecto citotóxico de *E. histolytica* sobre diferentes mutantes de células CHO con diferentes patrones de glicosilación se encontró que las células RIC<sup>R</sup> 15B que son deficientes en unidades N-acetilactosamina, son menos susceptibles a la citolisis mediada por la ameba (Li et al., 1989). Células CHO deficientes en carbohidratos con residuos Gal y GalNAc también son resistentes a la citolisis y mutantes con residuos Gal incrementados la citólisis se exacerbaba (Ravdin et al., 1989).

Adicionalmente, al estudiar diferencias entre especies virulentas y avirulentas de *E. histolytica*, la cepa Rahman considerada avirulenta tiene una menor expresión de la subunidad pequeña de la lectina Gal/GalNAc comparada con la cepa virulenta HM-1:IMSS; así mismo, cuando se inhibe la expresión de la subunidad pequeña (35 kDa) por medio de un RNA antisentido en la cepa HM-1:IMSS se disminuye la actividad citotóxica de *E. histolytica* (Ankri et al., 1999). Lo que demuestra también una relación directa con la citotoxicidad del parásito y la lectina Gal/GalNAc.

Después del contacto de la lectina Gal/GalNAc con los carbohidratos (Gal/GalNAc) que se encuentran en la superficie celular de la célula blanco ocurren una serie de eventos que culminan en la muerte de la célula. Una vez hecho el contacto con células CHO y neutrófilos existe un incremento en el calcio intracelular, un tiempo después hay permeabilidad de la membrana y finalmente ocurre la muerte de la célula (Ravdin et al., 1988).

Las células después del contacto con los trofozoítos de *E. histolytica* también sufren una condensación de la cromatina nuclear y hay una fragmentación del DNA, ambos signos de apoptosis (Ragland et al., 1994). Otra evidencia de que la muerte celular que ocurre después del contacto con *E. histolytica* es una muerte apoptótica, fue demostrado en tejido colónico de ratones infectados con trofozoítos de *E. histolytica*, células del epitelio y células inmunes de este tejido tiñen positivo para la tinción TUNEL, un método para detectar fragmentación de DNA (característica de células apoptóticas)(Huston et al., 2000). Así mismo, en células Jurkat, una línea celular de linfocitos T, se demostró que la muerte apoptótica causada por el parásito es independiente de la caspasa 8 y 9 pero sí se activa la caspasa-3, un efector río abajo (Huston et al., 2000). Otra característica que

coincide con una muerte apoptótica es la exposición de fosfoatidil serina en células Jurkat co-incubadas con trofozoítos de *E. histolytica*, la transferencia de esta molécula de la cara interior hacia la cara externa de la membrana plasmática es uno de los cambios más característicos de células apoptóticas (Huston et al., 2003).

### 1.2.1.3. *Proteasas*

*E. histolytica* es poseedora de una gran cantidad y variedad de enzimas que además de relacionarse con la supervivencia y adquisición de nutrientes, juegan un papel fundamental en la infección, invasión y sobretodo en la destrucción del tejido del hospedero. Las enzimas pueden ser secretadas, encontrarse en la superficie o dentro de la amiba. Además, pueden actuar sobre una gran variedad de sustratos, en la Tabla 1 se encuentra un resumen de las enzimas más importantes, indicando su localización y el sustrato al que degradan.

*E. histolytica* cuenta con 86 genes de peptidasas, siendo 50 de cisteín-proteasas, 4 de aspartato-peptidasas, 10 serín-proteasas y 22 metalo-peptidasas (Tillack et al., 2007). Dentro de las cisteín-proteasas, al examinar la expresión de éstas en *E. histolytica*, se encontró que el 90% de la actividad enzimática de los lisados corresponde a tan sólo 3 proteasas, la EhCP1, EhCP2 y EhCP5 (Bruchhaus, et al., 1996).

El papel clave que cumplen las proteasas de *E. histolytica* dentro de la virulencia y curso de la enfermedad invasiva queda evidenciado en distintas investigaciones.

Primeramente, existe una expresión diferencial de estas enzimas entre cepas y entre especies que correlaciona con su virulencia. Cuando se comparó la capacidad para destruir una monocapa de células de riñón de hámster bebé (BHK) de una cepa virulenta (HM-1:IMSS) y una avirulenta (HK-9), se pudo encontrar una relación entre la destrucción y el contenido de enzimas proteolíticas, la cepa virulenta teniendo mayor actividad enzimática que la no virulenta (Gadasi & Kobiler, 1983). También se ha comparado la capacidad de degradar colágena tipo I en diferentes cepas con diferente grado de virulencia, HM-1:IMSS, 200-NIH y HK-9, se encontró la cepa altamente virulenta HM-1:IMSS es capaz de degradar la colágena, pero las otras cepas que son consideradas menos virulentas tienen una capacidad de degradación mucho menor



(Gadasi & Kessler, 1983). Así mismo, al comparar la expresión de genes de cisteín-proteasas en distintas especies de *Entamoeba*, no se logró encontrar análogos de las *ehcp1* y *ehcp5* en *E. dispar*, las EhCP1 y EhCP5 son responsables de aproximadamente el 70% de la actividad proteolítica de *E. histolytica* (Bruchhaus, et al., 1996).

Se ha relacionado a las proteasas con la patogenicidad de *E. histolytica*, en 1989 se realizó un estudio con aislados clínicos de *E. histolytica* donde los pacientes presentaban colitis o infección extraintestinal y se encontró que todos los aislados tenían una proteasa de 56kDa, mostrado por zimografía copolimerizada con gelatina, estos resultados sugieren que la capacidad de producir la enfermedad invasiva está relacionada con la capacidad de secretar proteasas (Reed et al., 1989). También se ha relacionado a las proteasas, específicamente a la cisteín-proteasas, con la formación de AHA, las proteasas están presentes de manera extracelular en los abscesos hepáticos, en un modelo de ratón susceptible a la infección, esta localización se logró encontrar generando anticuerpos específicos para proteasas que posteriormente fueron localizados con un anticuerpo secundario marcado con oro en los tejidos de los ratones infectados. Adicionalmente al pretratar a los trofozoítos con un inhibidor de cisteín-proteasas llamado E64 se reducía de manera considerable la formación de los abscesos (Stanley et al., 1995).

Uno de los trabajos más contundentes en relación a la patogenicidad y la expresión de cisteín-proteasas fue la investigación de Matthiesen y colaboradores (2013) donde por medio de PCR en tiempo real determinaron la expresión de genes de cisteín-proteasas durante el AHA en los modelos de ratón y de jerbo, se encontró que se expresaban *ehcp-b8*, *ehcp-b9*, *ehcp-c13*, entre otros. Posteriormente, al sobreexpresar estos genes por medio de una transfección, en una clona de *E. histolytica* incapaz de generar AHA (clona A1) restaura su capacidad de generarlo.

A continuación, se describirán otros procesos en los que se encuentran implicadas las proteasas de este protozooario, como son destrucción de componentes del sistema inmune, adhesión e invasión a otros tejidos, todos contribuyendo a la patogenicidad y daño de *E. histolytica* a su hospedero.

#### 1.2.1.3.1. Degradación de componentes del sistema inmune

Para poder llegar a las células del epitelio intestinal, los trofozoítos primero deben sobrepasar la capa de moco que recubre y protege a las células del intestino. Moncada y colaboradores (2000) aislaron y marcaron con  $^{35}\text{S}$ -cisteína las mucinas de células epiteliales humanas LS174T, y demostraron que las cisteín-proteasas secretadas por *E. histolytica* son capaces de degradar estas mucinas, y la degradación depende del tiempo y la dosis. Después de la incubación con los productos secretados, las mucinas tenían un peso molecular reducido y una menor densidad; adicionalmente, la actividad mucinasa se veía bloqueada por el inhibidor de cisteín-proteasas E64. Posteriormente, este mismo grupo de trabajo, evaluó la funcionalidad de la mucina que había sido previamente degradada por las cisteín-proteasas secretadas por *E. histolytica*, es decir la capacidad de la mucina para evitar la adhesión de la amiba a células CHO, la mucina degradada tenía su capacidad protectora reducida comparada con el control (Moncada et al., 2003).

Finalmente, se comprobó que las cisteín-proteasas de *E. histolytica* son capaces de cortar a la MUC2, el componente mayoritario del moco intestinal y que el corte ocurre en el dominio carboxilo terminal. Mucinas recombinantes que expresaban dominios ricos en cisteínas en su C- terminal fueron tratadas con las secreciones de *E. histolytica* y los digeridos se analizaron por SDS-PAGE donde se pudieron observar los fragmentos de degradación (Lidell et al., 2006). Queda aún la incógnita de cuáles o cuál es la cisteín-proteasa responsable de degradar la mucina del moco, un buen candidato es la EhCP5 que forma parte del 90% de la actividad enzimática de *E. histolytica* (Bruchhaus et al., 1996), por lo que Moncada y colaboradores (2006) investigaron las características que tendría una amiba que tuviera alteradas las cisteín-proteasas, para esto crearon una amiba deficiente en EhCP5 por inhibición antisentido. Estos trofozoítos modificados no eran capaces de degradar mucina marcada con  $^{35}\text{S}$ cisteína, tampoco lograban adherirse a células de colon humano, puesto que eran incapaces de degradar el moco, contrario a células CHO donde podían adherirse pues este tipo de células cuentan con el moco protector.

El conjunto de estos resultados nos indican que las proteasas de *E. histolytica* juegan un papel fundamental para poder llegar al epitelio intestinal y seguir el curso de la enfermedad invasiva.

Otro de los componentes del sistema inmune con los que se encuentra *E. histolytica* al invadir al ser humano, pero que puede de alguna manera sobrepasar gracias a sus proteasas son las inmunoglobulinas (Ig). La IgA es la inmunoglobulina más abundante en mucosas, también se encuentra en el calostro y la leche humana, indicando un papel en la adquisición de inmunidad de manera pasiva. La IgA secretoria es la que se libera hacia el lumen del intestino y puede proteger al organismo contra patógenos, se ha demostrado que esta IgAs es capaz de reducir la colonización de patógenos y limita su crecimiento, también puede neutralizar virus, toxinas y enzimas (Kilian et al., 1988; Woof & Ken, 2006). *E. histolytica* es capaz de degradar a la IgA, demostrado por Kelsall y Ravdin (1993) que tomaron IgA en su forma sérica y secretoria, que posteriormente fue expuesta a sonicados y medio condicionado de trofozoítos, al realizar un SDS-PAGE y posteriormente a un inmunoblot con un anticuerpo a la cadena pesada de la IgA se logró determinar que *E. histolytica* es capaz de degradar a la IgA (sérica y secretoria) en múltiples fragmentos. Existe otro trabajo en donde se evaluó la capacidad de *E. histolytica* para degradar subclases de IgA1 y IgA2 secretorias, adicionalmente de la IgA sérica; en este caso se evaluó el efecto de las proteasas asociadas a la superficie de la amiba, utilizando un modelo en donde las amibas se encuentran fijadas pero aún tienen actividad proteolítica, después del contacto con los distintos tipos de IgA se puede observar la degradación en un SDS-PAGE con su posterior inmunoblot, estos autores sugieren que la EhCp5 es la principal responsable de la degradación pues es la principal en la membrana (Garcia-Nieto et al., 2008).

Otra inmunoglobulina que se ha demostrado que las proteasas de *E. histolytica* pueden degradar es la IgG. La IgG es abundante en la sangre y en tejidos, pero también está presente en el lumen del intestino. Tran y colaboradores (1998) demostraron que proteasas secretadas son capaces de degradar IgG monoclonal y policlonar de ratón, pudiendo observar los productos de degradación en un SDS-PAGE, y su respectivo inmunoblot.

#### 1.2.1.3.2. Adhesión

Como ya se mencionó anteriormente la adhesión es esencial para la virulencia de *E. histolytica*, y para poder establecer un contacto íntimo con la superficie apical de los enterocitos, la amiba debe primero alterar las microvellosidades de las células del intestino. Se ha encontrado que *E. histolytica* es capaz de degradar villina, uno de las proteínas de unión a actina de las microvellosidades del intestino. Al examinar los lisados del cocultivo de células Caco-2 y trofozoítos vivos, por medio de Western-blot inmuno-teñidos con un anticuerpo contra villina, se encontró la proteólisis de la misma lo cual fue evidenciado por varias bandas marcadas por el anticuerpo, esta proteólisis se le atribuye a las proteasas, ya que inhibidores de cisteín-proteasas fueron capaces de bloquear la proteólisis de villina (Lauwaet et al., 2003).

También se han logrado relacionar directamente algunas de las proteasas de superficie con la adhesión de los trofozoítos a las células blanco. Un ejemplo, es la metaloproteasa de superficie 1 (MSP-1) que, al ser silenciada los trofozoítos muestran una capacidad mucho mayor de adherirse al cultivo de células CHO, lo mismo ocurrió para cultivos de linfocitos Tjurkat vivas y apoptóticas. Los autores sugieren que la MSP-1 está involucrada en la regulación de la adhesión de *E. histolytica* (Teixeira et al., 2012).

Otra proteasa que se cree está involucrada en la adhesión, es la proteasa romboide 1 (ROM1) es una serín-proteasa que se encuentra en la superficie de la amiba. Al estudiar el fenotipo de trofozoítos “knockdown” de la ROM1, se encontró que estos parásitos tenían disminuída su adhesión a células CHO, hecho que se repite con trofozoítos silvestres que habían sido tratados con un inhibidor específico para serin-proteasas (Baxt et al., 2010).

Así mismo, existen varias proteasas de *E. histolytica* que contienen un motivo RGD como la EhCP112 (García-Rivera et al., 1999), la EhCP5 y EhCP18 (Bruchhaus et al., 2003). El motivo RGD es importante porque es conocido por unirse a integrinas del hospedero. La EhCP5 ha demostrado ser capaz de unirse a la integrina  $\alpha v \beta_3$  de células del colon Caco-2 a través de su motivo RGD, pero además esta unión es capaz de iniciar una respuesta proinflamatoria en estas células como la secreción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  y

también en ratones donde se estimulaba la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  (Hou et al., 2010).

#### 1.2.1.3.3. Invasión a otros tejidos

Para poder invadir otros tejidos, siendo el más común el hepático, los trofozoítos deben romper el complejo de las uniones estrechas que existen entre las células del intestino que impiden el paso paracelular. *E. histolytica* es capaz de perturbar este paso paracelular, evidenciado por la disminución de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de células T84 después del contacto directo con trofozoítos (Leroy et al., 2000). También se ha visto que los trofozoítos provocan cambios en las proteínas ZO-2, ZO-1, estas proteínas forman parte importante de las uniones estrechas; estos cambios son la degradación de la ZO-1 y la desfosforilación de ZO-2 que ocurre después del contacto con trofozoítos (Leroy et al., 2000). Por otra parte, una cepa de *E. histolytica* (cepa Rahman) considerada avirulenta no tiene la capacidad de afectar la TEER (Leroy et al., 2000), lo que muestra que ésta desestabilización en el paso paracelular es importante para que se presente la enfermedad invasiva.

Evidencias de que las proteasas son las responsables de la alteración en las uniones estrechas, fueron aportadas por Lauwaet y colaboradores (2004) que demostraron que dos inhibidores de proteasas (tosil-L-fenilalanina clorometil cetona y N- $\alpha$ -Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona) eran capaces de prevenir la disminución en la TEER. En cuanto a la proteólisis de ZO-1 y ZO-2, estas proteínas después del cocultivo con trofozoítos y estos mismos inhibidores se encontró que estos últimos son capaces de impedir su proteólisis, mostrado por un análisis por SDS-PAGE y posterior inmunotinción con anticuerpos anti-ZO-1 y 2 donde se observan diferencias en los productos de proteólisis.

Otras moléculas que forman parte de las uniones estrechas de los enterocitos son las ocludinas y claudinas, y se ha encontrado que el complejo EhCP/ADH112 de *E. histolytica* colocaliza con ocludina, claudina-1, ZO1 y ZO2, su interacción se confirmó por medio de ensayos de inmunoprecipitación y overlay (Betanzos et al., 2013). Extractos de trofozoítos también son capaces de degradar las proteínas ocludina, claudina-1, ZO1 y ZO2 de las uniones estrechas, células MDCK fueron incubadas con los

extractos totales de *E. histolytica*, después del tiempo de incubación las células fueron lisadas y procesadas para ensayos de Western blot donde se localizaron dichas proteínas para analizar su degradación, los extractos de trofozoítos no sólo fueron capaces de degradar las proteínas de las uniones estrechas, sino que si los trofozoítos eran tratados previamente con inhibidores de proteasas se bloqueaba dicha degradación, adicionalmente la degradación le fue atribuida a la EhCPADH112 pues trofozoítos tratados con un anticuerpo contra este complejo, eran incapaces de degradar las proteínas de las uniones estrechas mencionadas anteriormente (Betanzos et al., 2013).

Las alteraciones en estas proteínas conducen a un influjo de albúmina sérica y agua hacia el lumen del colon, esto contribuye en gran medida a la diarrea que se presenta durante la enfermedad (Cornick & Chadee, 2017).

Una vez que las amibas cruzan la barrera entre las células del intestino, se encuentran con otras barreras que deben superar, la lámina basal y la matriz extracelular (MEC). La lámina basal se encuentra justo debajo de las células y posteriormente está la MEC que es una especie de andamio para las células. Está compuesta de una red de colágena, entre otras proteínas, que las amibas deben degradar para poder migrar y alojarse en otros tejidos.

*E. histolytica* es capaz de degradar laminina, pues se pueden observar los productos de degradación en un SDS-PAGE, esta degradación se puede bloquear con un inhibidor de cisteín-proteasas (Schulte & Scholze, 1989). Así mismo *E. histolytica* fue capaz de degradar la MEC en un modelo *in vitro*, en donde se utiliza una MEC marcada radioactivamente, y posteriormente se puede cuantificar la degradación de ésta por medio de la radiación liberada, los trofozoítos vivos y el sobrenadante del cultivo pudieron degradar esta MEC (Keene et al., 1986). Posteriormente, se probó la degradación de algunos de los componentes de la MEC como fibronectina, laminina, elastina, y colágena tipo I, después del contacto con el sobrenadante del cultivo o fracciones purificadas de enzima, los sustratos se analizaron por SDS-PAGE para estudiar y observar los productos de degradación (Keene et al., 1986). Las cisteín-proteasas purificadas de los sonicados de trofozoítos también han probado degradar

elementos de la MEC laminina, fibronectina y colágena, una vez más logrando observar los productos de degradación en un SDS-PAGE, esta degradación se podía bloquear con un inhibidor de cisteín-proteasas (Schulte & Scholze, 1989).

Estudios más recientes de la relación entre las cisteín-proteasas y la degradación de la MEC indican que en un modelo tridimensional de matriz de colágena (colágena marcada con FITC para la cuantificación), *E. histolytica* degrada significativamente la colágena, mientras que la avirulenta *E. dispar* no es capaz de hacerlo, y la cepa Rahman de *E. histolytica* tampoco logra la degradación, además de que el inhibidor de proteasas E64 inhibe completamente la actividad de colagenasa de *E. histolytica*. Estos autores sugieren que las cisteín proteasas son las responsables de la actividad colagenasa de *E. histolytica* (Thibeaux et al., 2012).

*E. histolytica* al degradar estas proteínas que forman parte de la MEC, le permite moverse a través de ella con mayor facilidad y así poder llegar a otros sitios con mayor facilidad. Curiosamente, esta remodelación de la MEC la hace también con ayuda de las metaloproteasas del hospedero, por ejemplo: la EhCP5 de *E. histolytica* es capaz de cortar y por lo tanto activar a la MMP-3 del hospedero (Thibeaux et al., 2014).

**TABLA 1. Principales enzimas de *E. histolytica***

<b>Tipo</b>	<b>Nombre</b>	<b>Localización</b>	<b>Sustrato</b>
Cisteín-Proteasas	EhCP1 21 ± 2 kDa	Superficie Fagosoma	Colágeno, pro-IL-1β, villina, C3, IgG
	EhCP2 26 kDa	Asociada-membrana Fagosoma	Colágena, Proteoglicano, pro-IL-1β
	EhCP3 31 kDa	Fagosoma	Nutrientes en el fagosoma
	EhCP4 26 kDa	Nuclear Citoplásmica Secretada	C3, IgA, IgG, laminina, proIL-18, villina
	EhCP5 30 kDa	Superficie Fagosoma	IgG, mucina, BSA, fibrinógeno, hemoglobina, colágena, pro-IL-18
	EhCPADH (CP112+ADH112) 49 y 75 kDa	Vesículas del citoplasma Superficie Secretadas	Colágena, fibronectina, hemoglobina
Metaloproteasa	MSP-1	Superficie	Matriz Extracelular
Serín-proteasa	ROM1	Superficie Vesículas	lectina Gal/GalNac
	β-amilasa	Superficie Vesículas	Glúcidos
	Lisozima	Superficie Fagosoma	Degradación Nutrientes
(Serrano-Luna et al., 2013)			



#### 1.2.1.4. Fagocitosis

*E. histolytica* es conocida por su gran capacidad fagocítica y esto se considera un mecanismo de patogenicidad, pues le ayuda a sobrevivir y al mismo tiempo causar un gran daño al hospedero. En el diagnóstico clínico se utiliza a la fagocitosis como diferencial para distinguir entre cepas patógenas y no patógenas, ya que en muestras fecales se pueden observar fácilmente trofozoítos con eritrocitos en su interior en caso de ser patógenos (Gonzalez-Ruiz et al., 1994).

Se ha relacionado la alta capacidad fagocítica como una característica de cepas patógenas en varios trabajos de investigación. Trissl y colaboradores (1978), compararon la capacidad de ingerir hRBC de varias cepas de *Entamoeba*; cepas obtenidas de casos de disentería, así como de casos asintomáticos, cepas atenuadas, etc. Para evaluar la eritrofagocitosis, los hRBC se pusieron en contacto con los trofozoítos de cada cepa, se cuantificó la cantidad de hRBC fagocitados con un método para visualizar peroxisomas (3,3-diaminobenzidina) y la presencia de componentes positivos en el citoplasma de la amiba se consideran hRBC fagocitados. Se encontró que las cepas aisladas de casos de disenteria fagocitaban una mayor cantidad de hRBC en un tiempo dado, comparadas con las cepas aisladas de pacientes asintomáticos u otras cepas consideradas avirulentas. Orozco y colaboradores (1983) también relacionaron la capacidad fagocítica con la virulencia de *E. histolytica*, en este caso se aisló una clona deficiente en fagocitosis derivada de la cepa virulenta HM-1:IMSS, denominada clona L-6, la virulencia de esta clona era menor, demostrada por su incapacidad de producir AHA en hámsteres. Esta clona posteriormente recuperó su virulencia al ser pasada sucesivamente por hígado de hámster, los trofozoítos que recuperaban su capacidad de formar AHA también recuperaban su capacidad eritrofagocítica, estos autores sugieren que la eritrofagocitosis está involucrada en los mecanismos más agresivos de *E. histolytica*.

Existe también un estudio similar en donde se aislaron 10 cepas mutantes deficientes en su fagocitosis y fueron evaluadas en capacidad para destruir monocapas de células MDCK en cultivo y capacidad de formar AHA en hámsteres. Las cepas deficientes en

fagocitosis también eran deficientes en su capacidad de formar AHA, también eran menos eficientes destruyendo monocapas de células MDCK (Rodríguez & Orozco, 1986).

*E. histolytica* no sólo fagocita eritrocitos, sino que es capaz de fagocitar por ejemplo a las células apoptóticas que sufrieron del efecto citotóxico de la amiba. *E. histolytica* ingiere células Jurkat apoptóticas de una manera más eficiente, comparado con células sanas o necróticas en estudios realizados usando microscopia confocal e inmunotinciones para distinguir los diferentes tipos de células (Huston et al., 2003). Otro tipo de células apoptóticas que *E. histolytica* es capaz de fagocitar son hepatocitos, evidenciado por hepatocitos CK18 positivos que se pueden encontrar en el interior de la amiba en un modelo de AHA en hámster (Blazquez et al., 2007). Existe un modelo que propone una secuencia de pasos en el ataque de *E. histolytica*, en el cual después de adherirse a la célula blanco, la amiba ejerce su efecto citotóxico y una vez muerta la célula procede a fagocitarla (Sateriale & Huston, 2011); aunque este modelo ya ha sido rebatido cuando se descubrió el proceso de trogocitosis. Este proceso consiste en que los trofozoítos ingieren “pedazos” de células vivas, esto incluye membrana celular, citoplasma y en ocasiones organelos. Al igual que la fagocitosis, la trogocitosis requiere de adhesión a la célula blanco, y posteriormente se arranca el pedazo, el calcio intracelular se eleva resultando en la muerte de la célula blanco, pero ésta no es ingerida (Ralston et al., 2014).

*E. histolytica* también ha mostrado ser capaz de ingerir una variedad de bacterias como *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus* (Mirelman & Bracha, 1982), así como bacterias de la biota normal del intestino como *Lactobacillus ruminus* (Iyer et al., 2019).

Para poder fagocitar, *E. histolytica* cuenta con receptores que son capaces de unirse a moléculas de la superficie de la célula blanco y empezar la señalización hacia fagocitosis. Ejemplos de este tipo de moléculas son la C1q y la fosfatidilserina, las cuales se exponen en la superficie de células apoptóticas y son reconocidas por la calreticulina de la amiba (Marie & Petri, 2014; Vaithilingam et al., 2012), para iniciar el proceso de fagocitosis que involucra un rearrreglo del citoesqueleto del trofozoíto.

### 1.2.2 Inmunidad Innata y *E. histolytica*

La primer defensa con la que se encuentra este parásito es la acidez del estómago, pero como se ha mencionado anteriormente, los quistes son capaces de resistir esta acidez. Una vez que las amibas desenquistan y llegan al colon, se encuentran con la capa protectora de moco intestinal, que ha mostrado ser capaz de inhibir la adhesión a células CHO (Chadee et al., 1987). Pero como ya se mencionó con anterioridad *E. histolytica* es capaz de degradar el moco y llegar hasta el epitelio intestinal. Una vez en contacto con el epitelio intestinal, las células intestinales reconocen la lectina Gal/GalNAc de la amiba a través de receptores tipo Toll (TLR), el dominio de reconocimiento a carbohidratos de la lectina de la amiba se une a los TLR-2 y TLR-4 de células de colon humano Caco2. Después del contacto estas mismas células inician una respuesta que implica la liberación de citosinas proinflamatorias como la IL-8 (Galván-Moroyoqui et al., 2011). Esta elevación en la IL-8 se puede apreciar incluso sin el contacto directo con los enterocitos, lo cual fue demostrado por Yu y colaboradores (1997), donde se observaba una elevación en los niveles de RNAm y de proteína de la IL-8 al contacto de las células de colon con proteínas amibianas, con secreciones y con los trofozoítos vivos. Otra molécula de la amiba que logra activar a los TLR-2 y TLR-4 pero de monocitos, es el LPPG, estas moléculas aisladas de trofozoítos después de una coincubación con monocitos humanos desencadenan una reacción proinflamatoria también donde se producen IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-8 (Maldonado-Bernal et al., 2005).

En un modelo de intestino humano *ex vivo* se determinó que *E. histolytica* induce la secreción de citocinas proinflamatorias de las células del tejido del colon, IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN-  $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ; y esta secreción no ocurre con la especie no patógena *E. dispar* (Bansal et al., 2009).

La respuesta proinflamatoria hace que se recluten otro tipo de células al sitio de infección, como neutrófilos y macrófagos (Ghosh et al., 2000). Los neutrófilos son células que responden contra *E. histolytica* y aparentemente juegan un papel importante en la defensa contra este parásito; *in vitro*, estas células cuando son activadas con IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  son capaces de matar a los trofozoítos de *E. histolytica* (Denis & Chadee, 1989). Aunque, como se ha mencionado a lo largo de este escrito, la

respuesta de los neutrófilos hacia las amibas contribuyen a las lesiones del tejido del hospedero. Así mismo, la capacidad para matar a trofozoítos no se conserva para diferentes cepas de *E. histolytica*, al poner en contacto neutrófilos con una cepa no virulenta (303) los neutrófilos eran capaces de rodear a las amibas, fragmentarlas e ingerirlas, pero al enfrentarse a una cepa virulenta HM-1:IMSS los neutrófilos se desgranulaban pero no lograban la muerte de los trofozoítos (Guerrant et al., 1981). Aún así, se cree los neutrófilos juegan un papel importante en la defensa contra este parásito, ratones CBA que son naturalmente resistentes a la amibiasis, si se tratan con un anticuerpo monoclonal que depleta a los neutrófilos disminuye esta resistencia natural (Asgharpour et al., 2005). Se han llevado a cabo estudios en pacientes con amibiasis intestinal, de los cuales se tomaron biopsias para su posterior análisis histoquímico, se encontró que las poblaciones de células más frecuentes en las lesiones eran linfocitos y neutrófilos, y que la cantidad de estas células está relacionada con la cantidad de trofozoítos (Dickson-Gonzalez et al., 2009).

### **1.2.3. Respuesta Humoral y *E. histolytica***

El perfil de inmunoglobulinas (Ig) de pacientes se ha monitoreado para obtener información de la respuesta humoral en la amibiasis. Se ha estudiado la respuesta diferencial entre pacientes asintomáticos y sintomáticos para poder encontrar una explicación de la diferencia que existe en el curso de la enfermedad.

Al obtener suero de pacientes filipinos con o sin diarrea para obtener el perfil de IgA, IgG e IgM, de individuos sintomáticos y asintomáticos; se encontró que ambos tipos de pacientes tienen altos niveles de IgG y niveles bajos de IgA e IgM, pero cabe destacar que las 3 Ig del suero de los pacientes sintomáticos tenían una reacción mayor contra *E. histolytica*, IgA teniendo la reacción más alta. Al buscar diferencias entre IgG de pacientes sintomáticos y asintomáticos, se encontró que reconocen diferentes antígenos (Rivera et al., 2012).

Otro estudio seroepidemiológico se realizó en pacientes con una diversidad de síntomas, desde AHA hasta pacientes asintomáticos, pero con quistes en las heces. En

pacientes con AHA y amibiasis intestinal, la IgG era la mayoritaria comparada con pacientes con quistes. Así mismo, los niveles de IgM eran mayores en pacientes con AHA comparado con los pacientes con quistes, y los niveles más altos de IgA se encontraron en pacientes con amibiasis intestinal (Kaur et al., 2004).

Además de la respuesta humoral entre pacientes asintomáticos y sintomáticos también se han buscado diferencias en el perfil de Ig entre una colonización por *E. moshkovskii* o *E. histolytica*. Este estudio se realizó en un modelo murino, los ratones que fueron inmunizados con *E. moshkovskii* tenían niveles más altos de Ig y además la respuesta era de una mayor duración que los ratones inmunizados con *E. histolytica*. Cuando se caracterizaron los anticuerpos, se encontró que los de *E. histolytica* estaban dirigidos a proteínas citoplasmáticas y del citoesqueleto, mientras que de *E. moshkovskii* eran a proteínas de la membrana plasmática (Khomkhum et al., 2019).

Se ha investigado el rol de protección que tiene la respuesta humoral en lugares donde la amibiasis es endémica, en un estudio realizado con niños en Bangladesh, se encontró que el 100% de los niños con anticuerpos IgA contra *E. histolytica* en sus heces no presentaban una colonización de la amiba. Adicionalmente, niños con la IgA tenían menos infecciones nuevas a lo largo de 5 meses, y en los casos donde ocurría una infección nueva y fueron monitoreados, se encontró que cuando el niño estaba cerca de resolver la infección existía una respuesta IgA. Estos autores concluyeron que una respuesta IgA en la mucosa está asociada a una protección contra la colonización de *E. histolytica*.

Más acerca de la protección contra *E. histolytica* a través de las Ig, queda reflejado cuando se estudió el perfil de Ig en pacientes curados de AHA pero que seguían teniendo contacto con el parásito (evidenciado en la incidencia en la población). Se monitorearon los niveles de IgA a lo largo de 36 meses, los pacientes control eran personas asintomáticas pero en proximidad de los pacientes con AHA como por ejemplo, sus parientes; se encontró que la IgA intestinal en respuesta a *E. histolytica* de pacientes curados de AHA tiene picos con mayor frecuencia y amplitud comparada con los controles, los autores sugieren que la sensibilización debido a una infección invasiva

previa juega un papel importante en la forma en que los pacientes responden al contacto con el parásito en lugares donde la amibiasis es endémica, pues tienen una respuesta inmunológica mayor y no existe reinfección (Abd-Alla et al., 2006).

#### 1.2.4. Tratamiento Amibiasis

El metronidazol es el medicamento de primera línea para tratar la amibiasis intestinal y el AHA. El metronidazol es una droga sintética derivada de la azomicina, de la familia de los nitroimidazoles. Se puede encontrar en varias formas farmacéuticas para poder ser administrado de manera oral, intravenosa, tópica y vaginal (DrugBank).

Es utilizado para el tratamiento de infecciones que involucran organismos anaeróbicos y precisamente esto es la clave para su mecanismo de acción, pues los organismos que no toleran el oxígeno son poseedores de una enzima, la cual reduce el grupo nitro del metronidazol, activándolo. Primero, el metronidazol cruza la membrana de la célula blanco por difusión pasiva y una vez dentro de la célula, la enzima ferredoxina o flavodoxina reduce el grupo nitro de la molécula produciendo radicales libres, que son altamente tóxicos para el microorganismo anaerobio (Hernández Ceruelos et al., 2019). El tratamiento consiste en 3 dosis orales de 750 mg de metronidazol por 5 a 10 días (Hernández Ceruelos et al., 2019); lamentablemente su uso prolongado provoca efectos secundarios muy incómodos para el paciente como son: dolor de cabeza, sabor metálico, vómito, náuseas y diarrea. Adicionalmente, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC por sus siglas en inglés), tiene clasificado al metronidazol como posible carcinogénico en seres humanos. Así mismo, ya se han reportado casos de resistencia y de relapso de amibiasis intestinal (Azam et al., 2015).

También se utilizan otros nitroimidazoles para el tratamiento de la amibiasis como el ornidazol y tinidazol. Los nitroimidazoles se utilizan para tratar tanto la amibiasis intestinal como el AHA, e incluso para invasiones de otros tejidos. Por otro lado, existen otros medicamentos disponibles para tratar la amibiasis intestinal, como el yodoquinol, la paramomicina y furoato de diloxanida llamados medicamentos luminales, pues actúan directamente sobre la luz intestinal y no se absorben de manera considerable (Mohammad, 2019); por esta razón no se utilizan para tratar amibiasis

extraintestinales. Para estas infecciones en otros tejidos se pueden utilizar tratamientos sistémicos, que son menos efectivos en el intestino, como la cloroquina y la emetina (Martínez-Castillo et al., 2018; Mohammad, 2019).

### 1.3. Lactoferrina

La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína de aproximadamente 80 kDa que está presente en las secreciones de mamíferos, pertenece a la familia de las transferrinas y tiene una gran homología con la transferrina. La Lf es capaz, al igual que las transferrinas, de unir moléculas de hierro férricas ( $\text{Fe}^{3+}$ ). La Lf puede unir dos iones de  $\text{Fe}^{3+}$  con la ayuda de un ión bicarbonato. Se han descrito 4 isoformas: Lf- $\alpha$ , Lf- $\beta$ , Lf- $\delta$  y Lf- $\gamma$ . La Lf- $\alpha$  tiene la capacidad de unir  $\text{Fe}^{3+}$ , pero Lf- $\beta$  y Lf- $\gamma$  tienen actividad de ribonucleasa y no son capaces de unir  $\text{Fe}^{3+}$  (Levay & Viljoen, 1995). La Lf- $\delta$  es una isoforma intracelular, considerada un factor de transcripción pues su expresión a mostrado inducir arresto en el ciclo celular de células MCF7 (Mariller et al., 2012).

La Lf debe su nombre a que es muy abundante en la leche materna y es donde fue descubierta por primera vez, aunque también se ha detectado en secreciones de las glándulas exocrinas, en los gránulos de neutrófilos y en general en secreciones de mucosas. Esta glicoproteína es parte del sistema inmune innato y protege a las mucosas, pues tiene actividad antimicrobiana (Luna-Castro et al., 2017).

#### 1.3.1. Estructura

La Lf humana cuenta con 703 residuos de aminoácidos, se le considera una proteína catiónica. La cadena de aminoácidos se encuentra estructurada para formar dos lóbulos globulares, a los cuales se les llama lóbulo C, por carboxilo y lóbulo N, por amino. Los

lóbulos están unidos por medio de una  $\alpha$ -hélice y existe una gran homología entre los dos, por lo que se cree que surgieron de una duplicación en un gen hace millones de años (Figura 1) (Rosa et al., 2017).



**Figura 1.** Estructura de apolactoferrina

(Rosa et al., 2017).

Dentro de cada lóbulo, existen 2 dominios (4 en total) llamados C1, C2 y N1, N2, en cada lóbulo; entre los dos dominios, se une el ion de  $Fe^{3+}$  con ayuda de un anión carbonato. Los aminoácidos a los que se une el  $Fe^{3+}$  son iguales en los dos lóbulos: un ácido aspártico, dos tirosinas y una

La molécula de Lf tiene distintos sitios potenciales de glicosilación, la cual ocurre dependiendo de la especie animal de la que se hable. Los sacáridos más comunes que se unen a la molécula son manosa, hexosa y hexosaminas (Adlerova et al., 2008). Además de los sitios de glicosilación, el grado de ésta también varía. Dependiendo de esta modificación postraducciona se le confiere a la molécula distinto grado de resistencia a proteasas y a bajo pH.

Dependiendo del estado de saturación de  $Fe^{3+}$  pueden existir 3 formas de Lf: apo-Lf (sin  $Fe^{3+}$ ), Lf monoférrica (un  $Fe^{3+}$ ) y holo-Lf (dos  $Fe^{3+}$ ). La estructura terciaria es diferente en cada una de estas formas, cuando tiene unido  $Fe^{3+}$  adopta un estado conformacional cerrado haciéndola más resistente a la digestión por enzimas; por otro lado, en la forma de apo-Lf tiene una estructura tridimensional abierta y es más susceptible a un ataque proteolítico. Es importante mencionar que la unión del  $Fe^{3+}$  es reversible, pero Lf logra quelar el  $Fe^{3+}$  y retenerlo aún en pHs muy ácidos (pH 3), lo que es importante para su función (Aisen & Leibman, 1972).



### 1.3.2. Localización

La Lf se encuentra presente en la leche de mamíferos. Se ha estudiado Lf en seres humanos, vacas, cerdos, elefantes, ratones, borregos, chivos, camellos, alpacas, entre otros (Conesa et al., 2008).

En los seres humanos adultos los niveles más altos de Lf se encuentran en el calostro y en la leche. También se encuentra en secreciones de mucosas, como en fluido uterino, secreción vaginal, fluido seminal, saliva, bilis, jugo pancreático, moco intestinal, secreciones nasales y lágrimas (Masson et al., 1966). En la Tabla 2 se encuentran las concentraciones de Lf reportadas en diferentes tejidos mucosales.

Los neutrófilos también son una fuente importante de Lf, se encuentra en sus gránulos secundarios. Se ha encontrado que la concentración de Lf en sangre se incrementa durante una infección o inflamación aguda, derivada precisamente del aumento de neutrófilos en la circulación (Adlerova et al., 2008).

**Tabla 2.**

#### Concentraciones reportadas de lactoferrina en distintos tejidos y fluidos

Fluido/Tejido	Concentración
Calostro	5-8 mg/mL
Leche Materna	1-3.2 mg/mL
Líquido Amniótico	2-32 µg/mL
Moco Bronquial	35.2 ± 6.5 µg/mL
Lágrimas	2.2 mg/mL
Intestino	0.71-1.07 µg/mL
Moco Vaginal	62.9-218 µg/mg de proteína
Líquido Seminal	1.18±0.74 mg/mL
Fluido Sinovial	46.4 ±35.9 µg/mL

(Levay & Viljoen, 1995; Bruni et al., 2016; Adlerova et al., 2008; Rosa et al., 2017)

### 1.3.3. Funciones

Se ha relacionado a la Lf con varias funciones dentro del cuerpo humano: primeramente, está relacionada con el metabolismo del  $\text{Fe}^{3+}$  ya que, como parte de la familia de las transferrinas, es capaz de transportar el  $\text{Fe}^{3+}$  de zonas de infección hacia otras partes del cuerpo. Al tener la propiedad de quelar  $\text{Fe}^{3+}$  es inherente su función antioxidante, pues al poder transportar  $\text{Fe}^{3+}$  de manera segura se previene la formación de radicales libres que ocurre a través de la reacción de Fenton.

Se ha demostrado que la Lf es un inmunomodulador que afecta las defensas del huésped, tanto por su capacidad de unir  $\text{Fe}^{3+}$ , como por su interacción con células con receptores para la Lf. Por un lado, puede influenciar la respuesta inmune de una manera positiva “activándola” y por otro lado de manera negativa actuando como antiinflamatorio (Adlerova et al., 2008). Algunos ejemplos son: la Lf exagera la acumulación de neutrófilos en los sitios de infección, promueve la producción de radicales libres para matar microorganismos, ayuda a controlar la actividad de monocitos y macrófagos, aumenta la citotoxicidad de células NK, afecta la liberación de citocinas, etc. (Levay & Viljoen, 1995). También se ha encontrado que la Lf tiene actividad antitumoral, que se cree el mecanismo está relacionado con la inducción de la respuesta citotóxica contra células tumorales, consistente con la producción de IL-18, la actividad de las células NK y de células el  $\text{CD8}^+$  (Varadhachary et al., 2004). La Lf también es un regulador de la actividad celular de huesos, promoviendo la diferenciación de osteoblastos y la proliferación de condrocitos (Cornish et al., 2004).

La función de la Lf que interesa a en el presente proyecto es la actividad anti-amibiana. La Lf que se localiza en las superficies mucosales no es ninguna coincidencia, pues al estar ahí se encuentra en una posición estratégica para poder defender al organismo. Es una de las primeras líneas de defensa contra agentes invasores, y ya se ha demostrado su acción contra una gran variedad de agentes patógenos como bacterias, hongos, virus y parásitos (Bruni et al., 2016).

El mecanismo de acción para afectar el crecimiento y proliferación de los microorganismos invasores se puede dividir en dos tipos: dependiente de su capacidad de unir  $\text{Fe}^{3+}$  e independiente de ésta, el primero depende totalmente de la capacidad de

quelar el  $\text{Fe}^{3+}$  del ambiente. Todos los organismos requieren de  $\text{Fe}^{3+}$  para sobrevivir, y la Lf, al quitar este importante elemento del medio, restringe su uso. Sin  $\text{Fe}^{3+}$  el invasor limita su crecimiento y también lo hará más susceptible para su posterior eliminación (Rosa et al., 2018).

Por otro lado, tenemos actividad independiente de la capacidad de unir  $\text{Fe}^{3+}$ , aquí entra su propiedad de unirse a superficies cargadas negativamente, como por ejemplo las membranas bacterianas. Se ha demostrado la unión de la Lf al lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram-negativas, esta unión desestabiliza la membrana y provoca la muerte celular (González-Chávez et al., 2009). Para el caso de bacterias Gram-positivas, se basa también en la naturaleza catiónica de la Lf, que se une a moléculas cargadas negativamente de la superficie bacteriana (ácidos teicóicos), causando una alteración en la permeabilidad (Leitch & Willcox, 1999).

La actividad antiviral que posee la Lf no se conoce del todo, pero se cree que la Lf es capaz de unirse a la superficie del virus o de la célula blanco, previniendo la entrada del virus a la célula (González-Chávez et al., 2009), también se encontró que la Lf es capaz de activar  $\text{IFN-}\alpha/\beta$  que tiene actividad antiviral (Ishikawa, et al. 2013) así que el conjunto de estos mecanismos es capaz de resolver infecciones virales. Por otro lado, la Lf ha probado ser útil contra los hongos como es el caso de los dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*, proponiéndose que el mecanismo de acción se centra en la capacidad de la Lf de unirse a la membrana de dichos hongos y desestabilizarla (Wakabayashi et al., 2000).

Por último, la Lf ha probado ser útil contra protozoarios parásitos, como *Giardia intestinalis* (Aguilar-Díaz et al., 2016), *Plasmodium falciparum* (Fritsch, et al., 1987) y contra trofozoítos de *E. histolytica* (León-Sicaíros et al., 2006; León-Sicaíros et al., 2012; Ordaz-Pichardo et al., 2012).

## 2. ANTECEDENTES DIRECTOS

Debido a que la amibiasis es un problema de salud pública en México y que el tratamiento con metronidazol puede presentar efectos colaterales en los pacientes, es necesario encontrar alternativas de tratamiento, ya sea para sustituir el fármaco actual

o disminuir las dosis que se utilizan en el tratamiento contra la amibiasis intestinal y el AHA. Por esa razón, nuestro laboratorio inició la investigación del uso de apo-lactoferrina (apo-Lf) como coadyuvante en el tratamiento contra *E. histolytica*.

Primero se investigó la acción microbicida de la apo-Lf tanto bovina como humana sobre *E. histolytica in vitro* (León-Sicairos et al., 2006), en este trabajo se demostró que la apo-Lf bovina, así como la humana tienen actividad amebicida, se expuso a la *E. histolytica* a una concentración de 31.25  $\mu\text{M}$  de apo-Lf humana y apo-Lf-bovina en medio de cultivo bajo en hierro, se siguió la viabilidad de los trofozoítos a través del tiempo hasta las 24 h de exposición a través del ensayo de exclusión de azul de tripano. Se encontró que la viabilidad de *E. histolytica* disminuía a un 60% con una concentración de 31.25  $\mu\text{M}$  de apo-Lf después de 3 h de exposición. Así mismo, se exploró la dependencia entre la dosis y la acción amebicida, esta vez se expuso a los trofozoítos a distintas concentraciones de apo-Lf humana y apo-Lf bovina (0, 12.5, 31.25, 50, y 100  $\mu\text{M}$ ) por 1 h, al finalizar el tiempo de incubación se evaluó la viabilidad por medio de exclusión de yoduro de propidio (PI) y citometría de flujo, una vez más se comprobó la acción amebicida de los dos tipos de apo-Lf y que ésta era dependiente de la concentración, es decir entre más concentración más muerte. Cabe mencionar que no había una diferencia significativa entre apo-Lf humana y apo-Lf bovina. Para indagar sobre el mecanismo de acción amebicida de la apo-Lf, se exploró la posibilidad de que ésta se adhiriera a la membrana de *E. histolytica* como lo hace con bacterias, los trofozoítos se incubaron a 15 o 45 min, con PI (colorante que solo pasa a través de la membrana si está permeabilizada) y apo-Lf 31.25  $\mu\text{M}$ . Después las muestras se incubaron con un anticuerpo anti-Lf, posteriormente se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a Cy5. Por último, se observaron las muestras en un microscopio confocal, a los 15 min de interacción la apo-Lf se localizaba en la membrana celular de los trofozoítos, y el colorante PI se podía apreciar dentro de la célula, los autores sugieren que la apo-Lf es capaz de permeabilizar la membrana de los trofozoítos pues el PI se encuentra en el interior de la célula a diferencia del control sin apo-Lf donde no se observa colorante. A los 45 min de interacción las amibas se observaban lisadas.

Así mismo León-Sicairos y colaboradores (2006) exploraron la posibilidad de la existencia de sinergismo entre Lf y metronidazol, el tratamiento de primera línea para la amibiasis, así que se encontró la concentración a la que el 95% de los trofozoítos muere (IC95) del metronidazol, apo-Lf humana/bovina y su combinación. La viabilidad se estimó utilizando PI y citometría de flujo. La concentración efectiva de metronidazol fue 58.4  $\mu\text{M}$ , la de apo-Lf humana de 100  $\mu\text{M}$  y la de apo-Lf bovina de 100  $\mu\text{M}$ , se encontró un efecto sinérgico pues 17.5  $\mu\text{M}$  de metronidazol más una concentración de apo-Lf bovina de 31.25  $\mu\text{M}$  lograba el objetivo de matar al 95% de los trofozoítos, reduciendo a más de la mitad la concentración de metronidazol necesaria para conseguir el objetivo por sí solo.

La apo-Lf humana también ha demostrado tener un efecto sinérgico con sIgA y lisozima proteínas que también se encuentran en la leche materna. Trofozoítos de *E. histolytica* se coincubaron con 1 mg/mL de apo-Lf humana, IgA y lisozima, por separado y el conjunto por un tiempo de 3 h, pasado el tiempo de incubación se midió la viabilidad por medio del ensayo de exclusión de azul de tripano, al combinar la apo-Lf, IgA y lisozima se obtenía una viabilidad de sólo el 12%, cuando por separado se obtenía: apo-Lf 62%, IgA 66% y lisozima 78% (León-Sicairos, López-Soto, et al., 2006).

Explorando un poco más la posibilidad de utilizar apo-Lf bovina para tratar la amibiasis intestinal, se utilizó un modelo animal para evaluar el efecto terapéutico de la apo-Lf bovina administrada oralmente a ratones C3H/HeJ que son susceptibles a la amibiasis intestinal. Los ratones fueron inoculados con  $10^6$  trofozoítos en el ciego, 14 días después (cuando se esperaban lesiones) los ratones se dividieron en 3 grupos: 1) sin tratamiento, 2) tratamiento oral con apo-Lf bovina dosis baja (20 mg/kg) y 3) tratamiento oral con apo-Lf bovina dosis alta (200 mg/kg), el tratamiento se hizo por 7 días. Pasado los 7 días los animales fueron sacrificados y se obtuvo el ciego para examinar las lesiones y hacer el estudio histológico.

Se encontró que 20 mg de Lf bovina/kg, administrada de manera oral por una semana, logra eliminar la infección en 12 de los 19 ratones que fueron tratados, pues estos no presentaban daño en la mucosa intestinal, ni inflamación al observar cortes histológicos del ciego. En los siete ratones restantes, aunque no estaban completamente curados, se

observó una reducción en el número de trofozoítos y en la secreción de moco, comparados con los ratones que no fueron tratados; por lo que se determinó que hubo una resolución parcial de la infección (León-Sicairos et al., 2012).

Al investigar el tratamiento de AHA con apo-Lf bovina, se evaluó su efecto terapéutico en hámsteres (*Mesocricetus auratus*), un modelo animal susceptible a lesiones hepáticas. Los animales fueron divididos en 8 grupos: I) control negativo al que se le inoculó medio de cultivo, II) control positivo inoculando  $1.5 \times 10^6$  trofozoítos en un lóbulo del hígado, sin tratamiento y sacrificados al día 3, III) control positivo desarrollo AHA, inoculados con trofozoítos sin tratamiento por 12 días, IV) control positivo de tratamiento, inoculados con amibas y que recibieron tratamiento con metronidazol, V) hámsteres inoculados con trofozoítos y tratados con metronidazol a una dosis baja, VI) animales inoculados con trofozoítos y tratados con una dosis alta de apo-Lf bovina, VII) animales inoculados con trofozoítos y tratados con una dosis baja de apo-Lf bovina, y por último VIII) animales inoculados con trofozoítos y tratados con una combinación de dosis baja de apo-Lf bovina y metronidazol. Los tratamientos se administraron de manera intragástrica por un periodo de 8 días, pasado el tiempo los animales se sacrificaron y se caracterizaron las lesiones hepáticas de manera macroscópica y también se realizó el análisis histopatológico. Se encontró que el daño al hígado disminuyó significativamente, evidenciado por el porcentaje de lesión bajo encontrado en el hígado en los grupos tratados con apo-Lf bovina a una dosis baja, siendo el grupo VII con la combinación de tratamiento el más significativo. Además de que en el análisis histológico se podía observar una menor cantidad de trofozoítos e infiltrado celular en los grupos IV, VII y VIII. Cabe mencionar que los animales tratados con la dosis alta de metronidazol, aunque lograron disminuir el porcentaje de lesión de manera significativa comparada con el control, los animales mostraban signos de estrés, sugiriendo toxicidad al metronidazol. Adicionalmente, se realizó un perfil hepático a los animales de todos los grupos, este perfil muestra las proteínas, enzimas y células del hígado que en caso de enfermedad se alteran, se encontró que los grupos tratados con apo-Lf bovina a una dosis baja o la combinación de metronidazol y apo-Lf bovina regresaban a los parámetros normales a diferencia de los otros grupos. Los autores sugieren utilizar una combinación de Lf y metronidazol, pues así se puede bajar la dosis

de este último y así se pueden evitar los efectos tóxicos de este fármaco (Ordaz-Pichardo et al., 2012).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La amibiasis es un problema que le cuesta al mundo 100, 000 muertes al año, y que a pesar de haber sido descubierta hace más de un siglo sigue siendo un problema en países en desarrollo como México, que es una zona donde la amibiasis es endémica. El tratamiento que existe actualmente resulta ser efectivo, pero con efectos secundarios muy desagradables para el paciente, lo cual aumenta la probabilidad de que se abandone el tratamiento. Además, resulta preocupante que el metronidazol esté clasificado como posible carcinogénico y que existe la posibilidad de resistencia a este medicamento. Por lo que existe una necesidad de encontrar moléculas que puedan sustituir al metronidazol como tratamiento o que puedan actuar como adyuvante para entonces bajar la dosis de metronidazol y evitar los efectos tóxicos.

Una propuesta de este tipo de moléculas es la apo-Lf bovina, que con los trabajos anteriores se evidencia su acción amebicida contra *E. histolytica* y la posibilidad de utilizarla como tratamiento o adyuvante en la amibiasis.

Sin embargo, queda el interés de investigar si es posible que la apo-Lf bovina, pueda afectar algunos de los mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica*, aportando información sobre el mecanismo de acción de esta molécula y su capacidad para resolver la amibiasis intestinal y AHA *in vivo*. Los mecanismos considerados importantes para la patogénesis de *E. histolytica* son: adhesión, citotoxicidad, fagocitosis y las proteasas, estas últimas, juegan un papel crítico en la patogénesis de la amibiasis invasiva causada por *E. histolytica*, y están involucradas a lo largo de todo el proceso de invasión tanto del colon como del hígado contribuyendo a la destrucción del tejido del hospedero.

Adicionalmente, la apo-Lf ha mostrado ser capaz de unirse a la superficie amibiana, al hacer esto podría afectar su funcionalidad y recordemos que *E. histolytica* cuenta con proteasas ancladas a la membrana y además el proceso de secreción necesita de una membrana celular funcional.

## 4. HIPÓTESIS

La apo-Lf bovina altera la producción y secreción de proteasas de *E. histolytica*

## 5. OBJETIVO

Determinar el efecto de una concentración subletal de apo-Lf bovina sobre algunos mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica*

### 5.1 Objetivos particulares

Determinar el tiempo y concentración para alcanzar una condición de subletalidad  
Evaluar la producción y secreción de proteasas a una concentración subletal de apo-Lf bovina

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Reactivos

Todos los reactivos químicos utilizados para este trabajo fueron de la marca Sigma-Aldrich (Alemania) a menos que se especifique.

El material de cristalería fue tratado con HCl 6 N por toda la noche para eliminar las trazas de Fe que pudiera tener.

### 6.2 Cultivos de *E. histolytica*

En todos los casos se cultivaron axénicamente trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM-1:IMSS en medio BI-S-33 (Diamond et al. 1978) adicionado con suero bovino adulto al 20% a 37°C, hasta llegar a la fase logarítmica de crecimiento (entre 48 y 72 h.).

### 6.3 Medio de Cultivo Bajo en Hierro

Se preparó medio BI-S-33 sin adicionar citrato férrico de amonio. Posteriormente, se adicionó resina Chelex100 marca Bio-Rad (EUA) y se incubó por 16 h a 4°C para remover el fierro contenido como trazas en los reactivos. (León-Sicairos, et al., 2006).



#### 6.4 Viabilidad celular

La prueba de viabilidad fue llevada a cabo como lo describe León-Sicairos y colaboradores (2006). Fueron colocados  $1 \times 10^6$  de amibas en medio de cultivo bajo en  $\text{Fe}^{3+}$  y sin suero. Posteriormente se agregaron distintas concentraciones de apo-Lf bovina (0, 12.5, 31.25, 50, y 100  $\mu\text{M}$  apo-Lf) marca Nutriscience (EUA). Se co-incubaron durante 3 h (Tabla 3).

Para determinar la viabilidad celular de los trofozoítos después de estar expuestos a las diferentes concentraciones de apo-Lf bovina, se realizó el ensayo de exclusión de azul de tripano. En este ensayo los trofozoítos muertos se tiñen de un color azul mientras que los vivos no tienen color y presentan refringencia.

<b>Tabla 3. Muestras</b>			
<b>Muestras</b>	<b>Concentración Lf (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Trofozoítos</b>	<b>Medio</b>
1	12.5	$1 \times 10^6$	Bajo $\text{Fe}^{3+}$
2	31.25	$1 \times 10^6$	Bajo $\text{Fe}^{3+}$
3	50	$1 \times 10^6$	Bajo $\text{Fe}^{3+}$
4	100	$1 \times 10^6$	Bajo $\text{Fe}^{3+}$
Control	--	$1 \times 10^6$	Bajo $\text{Fe}^{3+}$

Para calcular el porcentaje de células viables, se dividió el número de células viables (sin color) entre el número total de células contadas (sin color+azules) y este número se multiplicó por 100.

#### 6.5 Preparación de extractos totales amibianos

Se colocaron  $2 \times 10^6$  de trofozoítos en medio con bajo  $\text{Fe}^{3+}$  y sin suero, se adicionó apo-Lf bovina hasta llegar a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , y se incubó durante 3 h. Como control se tomaron  $2 \times 10^6$  amibas en medio de cultivo con bajo  $\text{Fe}^{3+}$  y sin suero, sin apo-Lf bovina, incubando por 3 h. Una vez pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a 597 g por 10 min, y se separó el sobrenadante de la pastilla. Para obtener los extractos amibianos, la pastilla se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4

(PBS) adicionando un volumen igual. Una vez hecho esto, la suspensión fue sometida a 4 ciclos de congelación-descongelación. La congelación en nitrógeno líquido a una temperatura aproximada de  $-196^{\circ}\text{C}$  y la descongelación se lleva a cabo en agua que estaba a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se midió la cantidad de proteína por medio del método de Bradford (Bradford, 1976).

## 6.6 Medio condicionado

Se colocaron  $2.5 \times 10^6$  de trofozoítos en medio de cultivo de bajo  $\text{Fe}^{3+}$  y sin suero, se adicionó apo-Lf bovina hasta llegar a una concentración de  $100 \mu\text{M}$ , y se incubó durante 3 h. Una vez pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 597 g por 10 min, y se separó el sobrenadante de la pastilla. Como control se tomaron  $2.5 \times 10^6$  trofozoítos en medio de cultivo con bajo  $\text{Fe}^{3+}$  y sin suero y éste recibió el mismo tratamiento que la muestra con apo-Lf bovina.

Se realizó un lavado de la pastilla con PBS para retirar la apo-Lf, posteriormente se incubó durante 12 h con medio de cultivo bajo  $\text{Fe}^{3+}$  y sin suero. Una vez pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a 597 g por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se separó el sobrenadante. Se centrifugó una vez más a 1500 g por 10 minutos (Luna-Castro et al., 2014) y posteriormente se realizó la precipitación de las proteínas, adicionando isopropanol en una proporción 1:1 y se mantuvo a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  por 16 h.

Una vez pasado este tiempo, se centrifugó a 10000 g durante 45 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se retiró el sobrenadante (Luna-Castro et al., 2014). Se resuspendió el precipitado en PBS y se cuantificó la proteína por medio del método de Bradford (Bradford, 1976).

## 6.7 Zimografía

Las muestras obtenidas del extracto total amibiano y del medio condicionado se corrieron en geles al 10% de acrilamida co-polimerizados con gelatina porcina al 1%, en el caso del extracto también se realizó la corrida en un gel al 7%, (3 h, 90 V,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente los geles se incubaron con Tritón X-100 al 2.5% (v/v) durante 1 h a temperatura ambiente para retirar el SDS. Posteriormente se incubó durante toda la noche en amortiguador de activación pH 7 (10 mM de  $\text{CaCl}_2$  en pH 7 (0.1 M Tris/NaOH)). Por último, el gel se tiñó con azul de Coomassie.

## 6.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

En este caso, sólo se corrió el extracto total amibiano, se le adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (consultar Tabla 4) para prevenir su degradación. Se les agregó  $\beta$ -mercaptoetanol (al 5 % (volumen final)) y se hirvieron por 5 min.

Tabla 4. Mezcla de inhibidores	
Inhibidor	
PHMB (5mM)	
NEM (5mM)	
PMSF (12mM)	
EGTA (30 mM)	
E64 (10 $\mu$ M)	

Las muestras obtenidas del extracto total amibiano se corrieron en geles de poliacrilamida al 12% y al 7% (2 h, 100 V, temperatura ambiente). El gel se tiñó con nitrato de plata (Merril et al., 1981) con el Silver Stain Plus kit de Bio-Rad (EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 7. Resultados

### 7.1 Viabilidad

Con el trabajo de León-Sicarios y colaboradores (2006), se demostró que la Lf-bovina es un potente amebicida, en el presente trabajo se quiere determinar si la Lf-bovina es capaz de afectar los mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica*.

Sin embargo, hubo un cambio de marca de Lf-bovina de Morinaga Milk a NutriScience, y por lo tanto se presentó la necesidad de estandarizar la nueva marca de Lf y establecer las condiciones de trabajo. Específicamente, se debía encontrar una concentración subletal, es decir, la concentración donde no ocurre la muerte de la mayoría de las amibas y al mismo tiempo existe la mayor probabilidad de que exista alguna afectación en la membrana plasmática del parásito.

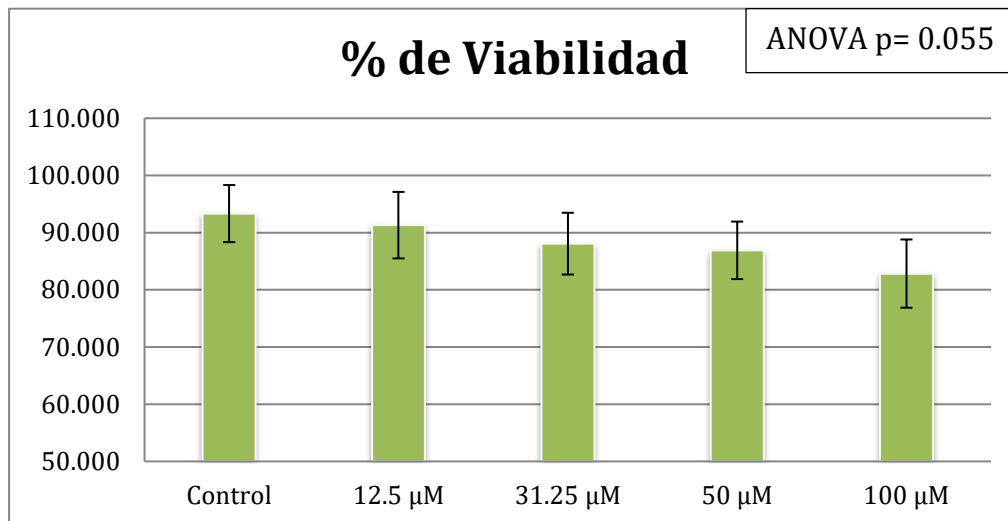
Se trabajó primeramente con las concentraciones de Lf utilizadas por León-Sicairos, y colaboradores (2006), las cuales corresponden a 12.5, 31.2, 50 y 100  $\mu\text{M}$ .

En la Figura 2. Inciso A, tenemos una gráfica donde se tiene el porcentaje de viabilidad en la ordenada y las distintas concentraciones de Lf en el eje de las abscisas. Se puede observar una tendencia de disminución en el porcentaje de viabilidad conforme se aumenta la concentración de Lf. Sin embargo, al realizar un análisis de varianza el valor de P es de 0.055, lo que nos indica que no es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95%. Sin embargo, este dato se encuentra justo en el límite, ya que para ser un dato estadísticamente significativo la P debe ser  $<0.05$ .

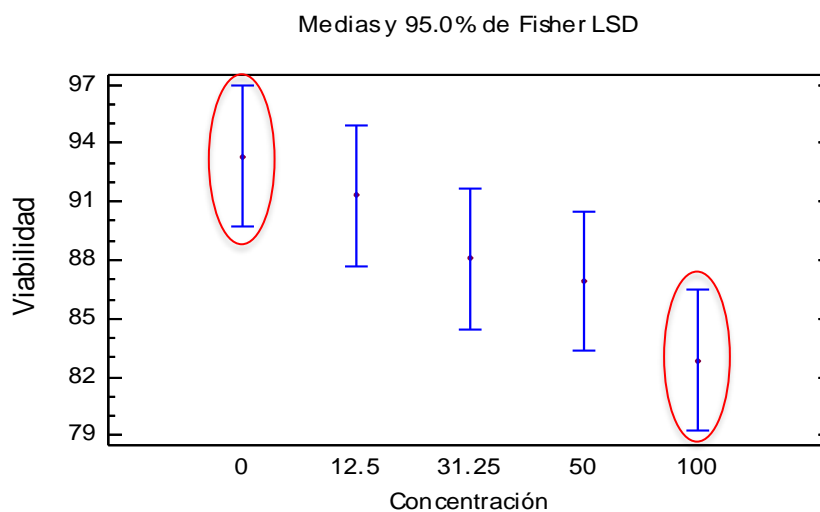
Después de obtener el resultado anterior se decidió realizar la prueba estadística de comparación de medias de Fisher LSD (Figura 2 B.), donde se comparan las medias y si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95.0% de las veces. Al aplicar la prueba a los resultados obtenidos de los ensayos de viabilidad, se determinó que sólo la concentración más alta (100  $\mu\text{M}$ ) es estadísticamente significativa. Si observamos la Fig. 2 B los intervalos de 0 y 100  $\mu\text{M}$  no se traslapan. Mientras que las demás concentraciones (12.5, 31.2, y 50  $\mu\text{M}$ ) sí se traslapan con el 0 (no significativas).

Las condiciones que se decidieron utilizar para los siguientes ensayos fueron: 100  $\mu\text{M}$  de apo-Lf bovina durante tres h, pues la mayoría de los trofozoítos se encuentran viables (82.84%) siendo una diferencia estadísticamente significativa y al ser una concentración de Lf relativamente alta, hay una mayor probabilidad de daño a la membrana.

A



B



**Figura 2. A. Porcentaje de viabilidad con diferentes concentraciones de apo-Lf a 3 h de co-incubación. B. Comparación de las medias del porcentaje de Viabilidad.**

Los trofozoítos se colocaron ( $1 \times 10^6$ ) en medio BI-S-33 bajo en hierro, durante 3 h con 0, 12.5, 31.25, 50 o 100  $\mu\text{M}$  de Lf-bovina. Se determinó la viabilidad celular por el ensayo de exclusión de azul de tripano.

## 7.2 Producción y secreción de proteasas

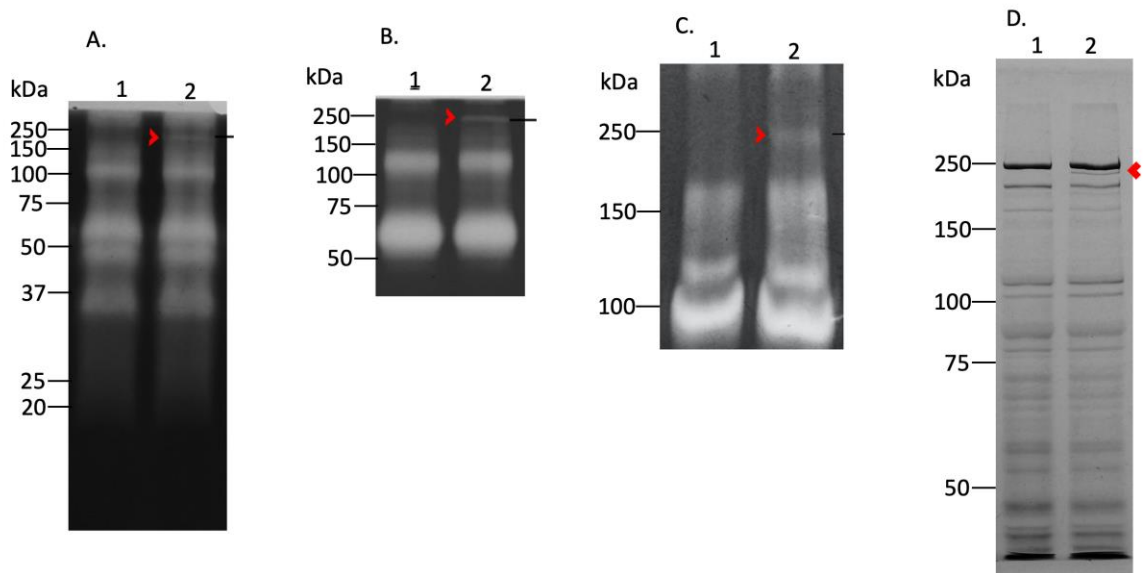
### 7.2.1. Extracto Total

Para determinar si se ve afectada la actividad proteolítica intracelular de *E. histolytica* después de estar en contacto con apo-Lf, se analizó el extracto amibiano total.

Los resultados de la Figura 3 A muestran el perfil de expresión de las proteasas de los trofozoítos de *E. histolytica*, en el carril 1 se aprecian las proteasas en condiciones control, es decir sin apo-Lf en un medio sin hierro y sin suero por 3 h. En el carril 2 se tiene el perfil de proteasas cuando los trofozoítos se incuban 3 h con 100  $\mu$ M de apo-Lf bovina. Comparando los carriles 1 y 2 (Fig 3 A) podemos apreciar que solamente existe una diferencia en una banda de alto peso molecular (>200 kDa) que aparece cuando se expuso a los trofozoítos a Lf (marca roja). En la Fig 3 inciso B se decidió colocar una mayor cantidad de proteína para apreciar mejor la banda de interés.

Para estimar mejor el peso molecular de esta proteasa de alto peso molecular, se volvió a realizar el mismo procedimiento, pero esta vez en un gel al 7% de acrilamida (Fig 3. C) en el carril 1 se corrió el control y en el carril 2 el extracto total de los trofozoítos que estuvieron en contacto con apo-Lf. Podemos observar que la banda de interés (marca roja) esta vez aparece un poco más abajo y tiene un peso aproximado de 225 kDa.

Así mismo, se corrió un SDS-PAGE al 7% (Fig 3. D) en el carril 1 se tiene el control y en el carril 2 se tienen las condiciones con Lf, también se puede apreciar la misma banda de aproximadamente 225 kDa, siendo la única diferencia entre las dos condiciones.



**Figura 3. En los extractos crudos de *E. histolytica* aparece una proteasa de alto peso molecular al estar en contacto con apo-Lf bovina.** Los trofozoítos se colocaron ( $2 \times 10^6$ ) en medio BI-S-33 bajo en hierro, durante 3 h con 0 o 100  $\mu$ M de apo-Lf bovina. Se obtuvieron los extractos totales. **A.** Las proteasas se separaron por medio de una zimografía al 10% copolimerizado con gelatina al 1%. 20  $\mu$ g de proteína cargados en el gel. **B.** 25  $\mu$ g de proteína cargados en el gel. **C.** Zimografía al 7% copolimerizado con gelatina al 1%, 25  $\mu$ g de proteína cargados en el gel. **D.** SDS-PAGE al 7%, 25  $\mu$ g de proteína cargados, revelado con tinción de plata.

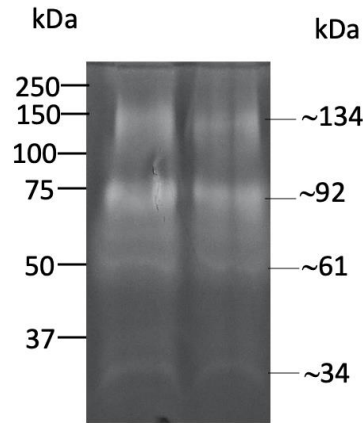
### 7.2.2. Medio Condicionado

La razón de examinar las proteasas contenidas en el medio condicionado fue para observar si pudiera haber un cambio en su secreción, pues ésta es una función directamente ligada a la membrana celular. Si retomamos la hipótesis, la Lf es una proteína que se une a la membrana y por lo tanto podría afectar los mecanismos que están directamente relacionadas con este organelo, como lo es la secreción de proteasas. Si la hipótesis es correcta se observará alguna diferencia entre la condición control y la condición donde se expuso a la *E. histolytica* con la apo-Lf bovina.

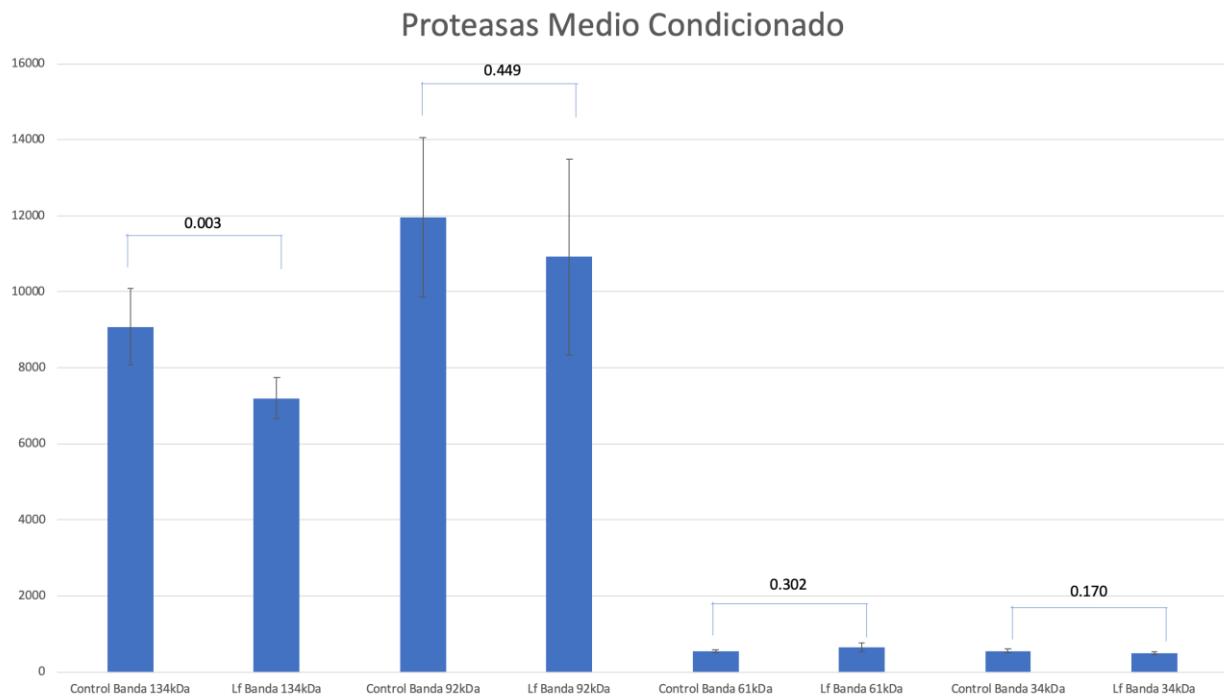
En la Figura 4 inciso A podemos apreciar una zimografía de las proteasas contenidas en el medio condicionado, es decir las proteasas que fueron secretadas. En el carril 1 se corrieron las proteínas precipitadas del medio condicionado en condiciones control (medio bajo en hierro sin suero) y en el carril 2 las proteínas precipitadas del medio condicionado donde los trofozoítos fueron co-incubados previamente con la apo-Lf previamente. Podemos observar cuatro bandas tanto en el carril 1 como en el 2, de aproximadamente 134, 92, 61 y 34 kDa. Sin embargo, en el carril 2 donde los trofozoítos fueron expuestos a apo-Lf, podemos ver una aparente disminución en la actividad en las bandas de más alto peso molecular (134 y 92 kDa), se realizó la densitometría correspondiente. La disminución observada sólo es estadísticamente significativa,  $P < 0.05$  para la banda de 134 kDa, con un 20.70% de disminución. En el resto de las bandas el cambio no fue estadísticamente significativo (Fig 4. B).



A



B



**Figura 4. *E. histolytica* al estar en contacto con Lf-bovina aparentemente secreta una menor cantidad de proteasas. A.** Los trofozoítos se colocaron ( $6 \times 10^6$ ) en medio BI-S-33 bajo en hierro, durante 3 h con 0 o 100  $\mu$ M de apo-Lf-bovina. Se cambió por medio nuevo y se incubó por 12 h. se precipitaron las proteínas del medio condicionado con isopropanol y se realizó una zimografía, gel al 10% copolimerizado con gelatina al 1%. **B.** Se cuantificaron las bandas resultantes de la zimografía con el programa ImageJ y se graficaron.

## 9. Discusión

Se sabe que la apo-Lf se une a la membrana celular de *E. histolytica* (León-Sicarios, et al., 2006). Así mismo, existe evidencia que la apo-Lf afecta las membranas de otros protozoarios, por ejemplo, Frontera y colaboradores (2018) demostraron que la apo-Lf-bovina, además de eliminar al parásito intestinal *Giardia lamblia*, se adhiere a la membrana celular de este y después de unos minutos es endocitada.

El primer paso que se siguió en este trabajo, fue encontrar la concentración subletal a la cual se debía trabajar, por medio de ensayos de viabilidad. Una vez encontrada esta concentración, se continuaron con los estudios sobre los mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica*. Se decidió utilizar una concentración subletal porque bajo estas condiciones se pueden observar de manera detallada los mecanismos celulares, pues los trofozoítos se encuentran vivos, o por lo menos la mayoría de ellos, y por lo tanto reaccionan a su entorno, tienen metabolismo, tienen procesos celulares, etc. Cabe mencionar que, en el trabajo de Frontera y colaboradores (2018) se utilizaron concentraciones subletales y es así como se pudo encontrar que la apo-Lf-bovina es capaz de alterar estructuras endomembranas de *G. lamblia*. En este parásito, posterior a la co-incubación con la apo-Lf, la membrana celular tiene invaginaciones y protrusiones, el retículo endoplásmico (RE) se vesicula, la envoltura nuclear se alarga y las vesículas periféricas se deslocalizan. Este trabajo es un excelente ejemplo de por qué se deben utilizar dosis subletales de apo-Lf. En este caso se pudo estudiar la endocitosis de Lf en *G. lamblia*, y los efectos morfológicos que ya habían sido reportados con anterioridad con mayor detenimiento (Aguilar-Diaz et al., 2016).

Después de realizar los ensayos de viabilidad siguiendo el procedimiento de León-Sicarios y colaboradores (2006), al utilizar las mismas concentraciones, se pudo observar un comportamiento completamente distinto al que había sido publicado. La única diferencia entre los dos procedimientos es la marca de apo-Lf que se utilizó. En el trabajo de León-Sicarios y colaboradores (2006) se utilizó la marca MorinagaMilk y en el actual es NutriScience. A este respecto se investigó sobre las marcas de apo-Lf-bovina disponibles en el mercado, el proceso para obtenerlas y los estándares de calidad para

su comercialización. Esto para encontrar alguna diferencia entre MorinagaMilk y NutriScience, y explicar la eficacia que tiene MorinagaMilk comparada con NutriScience. Por un lado, MorinagaMilk con una concentración de 31.25  $\mu\text{M}$  fue capaz de matar al 60% de la población de las amibas después de 3 h de exposición, mientras que con NutriScience a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  por 3 h, sólo fue capaz de eliminar a aproximadamente al 20% de la población de trofozoítos.

Hablando un poco sobre MorinagaMilk, su proceso industrial consiste en una separación de la Lf por medio de cromatografía de intercambio iónico, posteriormente una pasteurización y por último liofilización (Franco et al., 2018; Rosa et al., 2018; Wakabayashi et al., 2018). Según la ficha técnica de NutriScience siguen el mismo proceso de producción, siendo la única diferencia el secado final de la proteína, se utiliza secado en aerosol (Spray-Dried), que no afecta las propiedades de la proteína (Franco et al., 2018; Rosa et al., 2018), de hecho se sugiere que este tipo de secado mejora la solubilidad de la Lf (Wang et al., 2017).

Una ventaja con la que cuenta MorinagaMilk son las certificaciones internacionales que le han sido otorgadas por su calidad, que está directamente relacionada con su seguridad y eficacia, sobre todo porque es un producto para consumo humano. Hablando específicamente de la Lf, se ha estudiado que las propiedades fisicoquímicas afectan directamente su función y eficacia, por lo que establecer especificaciones para el producto terminado es sumamente importante (Rosa et al., 2018.; Franco et al., 2018). Las certificaciones antes mencionadas son el estatus de “Novel Food” por parte de la Unión Europea y “GRAS” (Generally Recognized As Safe) en EUA. MorinagaMilk cuenta con los dos, mientras que NutriScience no cuenta con ninguno de estos registros (Wakabayashi et al., 2018). Cabe mencionar que aunque NutriScience no es considerado Novel Food o tiene el estatus de GRAS, su apo-Lf bovina ha mostrado ser efectiva contra bacterias, como demostró nuestro grupo de trabajo (Avalos-Gómez et al., 2020; Luna-Castro et al., 2014; Samaniego-Barrón et al., 2016) donde se ha estudiado el efecto de esta marca de apo-Lf bovina sobre bacterias como *Mannheimia haemolytica* A2, *Mannheimia haemolytica* A1 y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, (cepas BC52,

S4074, WF83) y en todos los casos es bactericida con concentraciones mínimas inhibitorias de 4.88 a 16  $\mu\text{M}$ . Como se tenía este antecedente en el laboratorio, se supuso que la apo-Lf de esta marca sería eficiente contra la amiba; cabe aclarar que este fue el primer trabajo en el que se evaluó la Lf bovina de NutriScience contra *E. histolytica*.

Investigando aún más sobre los efectos antiparasitarios de la apo-Lf bovina y las diferencias entre marcas y sus certificaciones, se encontraron varios trabajos los cuales están resumidos en la Tabla 5, hay discrepancia con los efectos antiparasitarios de la apo-Lf bovina. Aparentemente, el tener una calidad validada por autoridades internacionales juega un papel importante en la eficacia de la apo-Lf contra parásitos. Para demostrar que la marca de Lf-bovina utilizada y sus certificaciones es una variable importante en la efectividad contra los parásitos, hace falta encontrar también publicaciones con resultados negativos. Sin embargo, se encontró una publicación de un estudio en promastigotes de *Leishmania major* (Baroogh et al., 2019), el parásito causante de la leishmaniasis. En este estudio se utilizó apo-Lf-bovina de Sigma-Aldrich, a 2.5, 5, 10, 20, 40, y 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 24, 48, y 72 h; ningún tiempo ni concentración fueron efectivos contra *L. major*.

Es posible que la magnitud de esta situación como es la marca-calidad-efectividad se encuentra subestimada, pues el efecto de la Lf no es muy estudiado en parásitos ni en otros microorganismos. Aunado a esto, como la efectividad está directamente relacionada con la calidad, tal vez algunos laboratorios que no utilicen la mejor calidad de Lf y no tienen resultados positivos nunca publicarán dichos datos.

Por otro lado, se propone que la Lf se utilice como coadyuvante administrado en conjunto con antibióticos o drogas antiparasitarias, por lo que el efecto sinérgico podría no verse afectado en gran medida por la marca de Lf utilizada. Cabe aclarar que la Lf bovina podría ser utilizada sola, pero sería más efectiva como adyuvante con drogas antiparasitarias y antibióticos para el tratamiento, sobre todo contra cepas multiresistentes de origen nosocomial. También puede ser utilizada como suplemento alimenticio para la prevención de infecciones bacterianas, virales, parasitarias e incluso fúngicas.

Tabla 5.

Efecto Lf-bovina sobre parásitos humanos in vitro según marca

Protozoario	Efecto	Condiciones	Marca	GRAS	Novel Food	Referencia
	<b>Antiparasitario</b>					
<i>Entamoeba histolytica</i>	✓ Disminución viabilidad <50 %	31.25 µM 3 h	MorinagaMilk	✓	✓	(León-Sicairos, et al., 2006)
<i>Acanthamoeba sp.</i>	✓ Disminución viabilidad 7.7 %	10 µM 1 h	MorinagaMilk	✓	✓	(Tomita et al., 2017)
<i>Naegleria fowleri</i>	✗	100 µg/ml 0.5, 1, 3, 6 y 12 h	China Peptides	✗	✗	(Tiewcharoen et al., 2014)
<i>Giardia intestinalis</i>	✓ Inhibición crecimiento 50%	40 µM 12 h	MorinagaMilk	✓	✓	(Aguilar-Diaz et al., 2016)

<i>Giardia intestinalis</i>	✓ Inhibición crecimiento 50%	50 µM 24 h	SigmaAldrich	✗	✗	(Frontera et al., 2018)
<i>Cryptosporidium sp.</i>	✓ Reducción infectividad a células HCT-8	10 mg/mL 24 h	TATUA Dairy Company	✗	✓	(Paredes et al., 2017)
<i>Toxoplasma gondii</i>	✓ Reducción infectividad a macrófagos	20 µg/ml 24 h	Marca no especificada País: Australia*	¿?	¿?	(Anand et al., 2015)
<i>Leishmania major</i>	✗	2.5, 5, 10, 20, 40, y 80 µg/mL 24, 48, y 72 h	SigmaAldrich	✗	✗	(Baroogh et al., 2019)

\* Existen dos marcas Australianas con certificado Novel Food (Wakabayashi et al., 2018):

Warrnambool Cheese & Butter Factory Company

Tatura Milk Industries Limited Netherland

Una vez establecidas las condiciones a trabajar, (100  $\mu$ M, 3 h) se analizaron las alteraciones en la producción y secreción de proteasas. Hay que tener presente que las proteasas son un factor de virulencia de gran importancia en *E. histolytica*.

Existe evidencia que sustancias antimicrobianas que forman parte del sistema inmune, disminuyen la actividad proteolítica de *E. histolytica*, por ejemplo, inmunoglobulinas y óxido nítrico; este último forma parte del sistema de defensa de macrófagos y neutrófilos (Lin et al., 1994; Wheeler et al., 1997).

En cuanto a inmunoglobulinas, se logró aislar sIgA de la saliva de voluntarios de una población en Guanajuato, donde la incidencia de amibiasis se esperaba fuera elevada, esta inmunoglobulina fue capaz de inhibir la actividad proteolítica del extracto obtenido de cultivos de *E. histolytica* (Guerrero-Manríquez et al., 1998). Por otro lado, el óxido nítrico es un compuesto que forma parte del mecanismo de defensa de las células del sistema inmunológico, como neutrófilos y macrófagos, para eliminar microorganismos patógenos. Especies de óxido nítrico (NOs: nitroprusiato de sodio, nitrito de sodio y nitrato de sodio) también han demostrado inducir apoptosis en *E. histolytica in vitro*, demostrado por YOPRO-1, TUNEL y fragmentación del DNA después de exponer a la amiba a 1 h de incubación con las especies de NOs (Ramos et al., 2007), pero se ha demostrado el efecto sobre proteasas, el s-nitroso glutatión, un donador de óxido nítrico, es capaz de disminuir la actividad de cisteín-proteasas de los lisados crudos de *E. histolytica* (Siman-Tov & Ankri, 2003). Sin embargo, esta molécula al ser un oxidante muchas veces contribuye al daño al tejido del hospedero lo cual resulta contraproducente, en modelos *in vivo* se ha relacionado la producción de NO (medido en suero) con el tamaño de la lesión en AHA en hámsteres (Pacheco-Yépez et al., 2001). Además, inhibidores de NOs causaban lesiones menores en el hígado de los hámsteres (Pacheco-Yépez et al., 2001). Sin embargo, Seydel y colaboradores (2000) investigando sobre el rol que juega NO en la defensa contra amibiasis hepática, estudiaron la susceptibilidad de ratones que tenían una alteración en el gen que codificaba para la NO sintasa inducible, y los ratones con esta deficiencia tenían lesiones mucho más grandes.

Resulta interesante que la sIgA y el óxido nítrico disminuyan la actividad proteolítica de la amiba, es una buena estrategia contra la infección, (aunque el óxido nítrico puede

contribuir al daño) pues las proteasas de *E. histolytica* son factores de virulencia clave, incluso en los primeros pasos de la infección degradando la mucina del moco intestinal, y en pasos posteriores como en la degradación de las uniones intercelulares o de elementos de la MEC.

Por otro lado, sustancias que han demostrado ser amebicidas *in vitro* también afectan las proteasas de *E. histolytica*. La cúrcuma, el componente mayoritario del rizoma de *Curcuma longa*, una raíz similar al jengibre, en concentraciones subletales (50  $\mu\text{M}$ ) es capaz de disminuir la expresión relativa (RNAm) de EhCP1 y EhCP5 (Rangel-Castañeda et al., 2019), proteasas que forman parte de la actividad proteolítica general de la ameba.

Desafortunadamente, en el caso de la producción de proteasas de *E. histolytica* después de haber estado en contacto con 100  $\mu\text{M}$  de apo-Lf-bovina por 3 h, se observa el mismo patrón. Por lo que la afectación a la producción de proteasas no es uno de los mecanismos por el cual la Lf logra resolver la amibiasis intestinal y el AHA (León-Sicairos et al., 2012; Ordaz-Pichardo et al., 2012). Sin embargo, el efecto que tiene la apo-Lf bovina sobre *E. histolytica* es el de producir una proteasa de alto peso molecular, aproximadamente de 225 kDa que en la condición control no se produce.

Recordemos que *E. histolytica* tiene 86 genes putativos para proteasas, pero bajo condiciones normales de cultivo axénico sólo se expresan significativamente 21 (Bruchhaus et al., 2003; Tillack et al., 2007); aún quedan 59 proteasas que no se expresan o lo hacen en cantidades demasiado bajas. Lo anterior podría significar que este número restante de proteasas requiere de algún estímulo para que sean expresadas, lo que podría estar ocurriendo con la proteasa de aproximadamente 225 kDa encontrada.

Existe evidencia de que algunas cisteín-proteasas aumentan su expresión como una respuesta a estrés por ejemplo, la cisteín-proteasa 6 de *E. histolytica* (EhCP6) es una proteasa clasificada como de respuesta a choque térmico, donde bajo condiciones normales su expresión es baja y en condiciones de estrés térmico incrementa su expresión considerablemente, demostrado por Weber y colaboradores (2006) por medio de microarreglos donde determinaron la expresión de genes a 42°C por 4 h. La temperatura a la que tiene una actividad óptima es de 40°C (A. Ghosh & Raha, 2015)



estos autores sugieren que la EhCP6 está relacionada con la degradación de proteínas, cumpliendo un rol específico bajo condiciones de choque térmico.

La adaptación es clave para la supervivencia de cualquier ser vivo, la proteasa de aproximadamente 225 kDa encontrada, podría estar operando en respuesta al medio ambiente, es la ameba tratando de adaptarse a las condiciones del presente estudio. Una posibilidad es que sea una enzima para degradar a la apoLf-bovina, pues existe evidencia que *E. histolytica* posee cisteín-proteasas capaces de degradar holo-Lf humana de 250, 100, 40 y 22 kDa (León-Sicairos et al., 2005) y también para degradar holo-Lf bovina de 100, 75 y 60 kDa (Ortíz-Estrada et al., 2015). Sin embargo, estas enzimas son para degradar la Lf, aprovechando la molécula para su metabolismo y al mismo tiempo quitarle el Fe para usarlo como fuente de este elemento, el cual es esencial para su crecimiento.

Para probar la hipótesis que la proteasa de aproximadamente 225 kDa es una enzima que produce *E. histolytica* para tratar de degradar apo-Lf bovina, habría que realizar una zimografía con un gel copolimerizado con apo-Lf bovina, y al observar las bandas debería estar presente la correspondiente a la banda de aproximadamente 225 kDa. Adicionalmente, habría que caracterizar la proteasa encontrada con inhibidores, para determinar de qué tipo de proteasa se trata: cisteín, serin, aspártico o metaloproteasa. Si la proteasa de aproximadamente 225 kDa tiene la función de degradar apo-Lf bovina, podría resultar contraproducente para el parásito, pues al degradar Lf se podrían estar produciendo, como productos de esta degradación, péptidos microbicidas derivados del amino terminal de la Lf como la lactoferricina (Lfcin) o lactoferrampina (Lfampin), pero esto es sólo una hipótesis que debe investigarse más a fondo.

El siguiente resultado obtenido fue la secreción de proteasas. Una vez más se esperaba alguna alteración pues, como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que sustancias amebicidas son capaces de disminuir la actividad proteolítica de *E. histolytica*. Otra razón, es que existe evidencia de que la apo-Lf, además de afectar la membrana plasmática, puede afectar estructuras endomembranas en el citoplasma de protozoarios. En el artículo de Frontera y colaboradores (2018) se encontró que a

concentraciones subletales de apo-Lf se afectan estructuras como el RE, envoltura nuclear y vesículas intracelulares de *G. lamblia*. Por lo que se pensó que la apo-Lf podría afectar el sistema de estructuras endomembranas de la amiba y por lo tanto afectaría la secreción de proteasas de *E. histolytica*. Sin embargo, de las 4 proteasas encontradas en el medio condicionado del cultivo de *E. histolytica*, solamente la secreción de la proteasa de aproximadamente 134 kDa se ve afectada por la apo-Lf, por lo menos en las condiciones probadas. Adicionalmente, se puede observar que la proteasa de aproximadamente 225 kDa encontrada en los extractos totales no se secreta al medio. Este resultado podría deberse a la metodología empleada, ya que se retira la apo-Lf del medio después de 3 h, y se incuba con medio nuevo por 12 h. Puede suceder que al retirar el estímulo (Lf), se deja de producir y por lo tanto también se deja de secretar la proteasa de aproximadamente 225 kDa que se encontró en los extractos totales.

*E. histolytica* resulta un organismo interesante, pues no cuenta con un RE y Golgi “clásicos”. Pero, existen una gran cantidad de vesículas en su interior, un sistema endomembranoso en el cual existe el tráfico de moléculas que deben ser transportados hacia el exterior o membrana de la célula, moléculas como las proteasas. Se cree que debe ocurrir un tráfico vesicular dinámico de las proteasas para su movilización dentro de la célula y su secreción y que está regulado por las Rabs de *E. histolytica*, entre otras moléculas (Orozco, et al., 2020).

En el trabajo de Manning-Cela y colaboradores (2003), donde se estudió la actividad secretora de *E. histolytica* resultante de estimulación externa, se encontró que la brefeldina A (BFA), una droga que altera el transporte anterógrado (RE → AP) en otros organismos, hace que se disminuya el transporte de las proteínas a la membrana en *E. histolytica*, pero no logra inhibir la secreción de tiol-proteasas o el tráfico de proteasas sintetizadas *de novo*.

Mitra y colaboradores (2007) demostraron que la GTPasa Rab11 de *E. histolytica* juega un papel central en la secreción de cisteín-proteasas, la Rab11 colocaliza con lo que parece endosomas de reciclaje. Por otro lado, sobre expresar la Rab11 resulta en un incremento en la actividad proteolítica de los lisados de *E. histolytica* y del medio condicionado, demostrado por zimografías con gel copolimerizado con gelatina al 1%,

así mismo, este incremento no fue sensible a BFA. Por lo tanto, el transporte de proteasas es independiente del transporte anterógrado (RE-AP) de *E. histolytica*, así que su alteración (si es que existe) no es la razón por la que la secreción de la proteasa de aproximadamente 134 kDa se ve afectada. Cabe mencionar que las proteasas no son el único factor de virulencia que es independiente del transporte anterógrado, un ejemplo es la KERP1 que su transporte no logra ser bloqueado por BFA, pero sí depende del citoesqueleto (Perdomo et al., 2016).

Pero entonces, por qué la alteración en la proteasa de aproximadamente 134 kDa. Manning-Cela y colaboradores (2003) demostraron que la 2,3-butadiona monoxima (BDM), un químico que inhibe la interacción actina-miosina, sí es capaz de inhibir la secreción de proteasas. Adicionalmente, la contractilidad del sistema actina-miosina del citoesqueleto aparentemente es necesaria para la liberación final de proteasas, esto en concordancia con lo reportado por Serrano y colaboradores (1996). Por lo tanto, el sistema actina-miosina es necesario para la secreción de proteasas en *E. histolytica*, y la apo-Lf bovina ha demostrado alterar el citoesqueleto de protozoarios, por ejemplo de *G. lamblia* (Aguilar-Diaz et al., 2016; Frontera et al., 2018; Turchany et al., 1997). Adicionalmente, si se comparan las zimografías del extracto total y el medio condicionado, podríamos especular que la proteasa de aproximadamente 139 kDa encontrada en el extracto puede ser la misma que la de aproximadamente 134 kDa del medio condicionado, pues el peso molecular calculado por este método es sólo una aproximación. Si esto es cierto, la producción de esta proteasa no se afecta pero la secreción sí.

A partir de estos resultados, se puede decir que aunque la apo-Lf sea capaz de alterar el sistema endomembranoso (RE-AG) de *E. histolytica*, finalmente no afecta la secreción de proteasas, pues este sistema no es utilizado para esto. Pero la apo-Lf puede estar afectando el citoesqueleto de *E. histolytica* y por eso se afecta la secreción de proteasas, para demostrar una alteración en el citoesqueleto, se sugiere una observación mucho más metódica de microscopía confocal, inmunotiñendo elementos del citoesqueleto

como la actina. Adicionalmente, para observar alteraciones ultraestructurales, como el sistema de endomembranas se utilizaría microscopía electrónica.

Queda aún pendiente caracterizar esta proteasa de aproximadamente 134 kDa. Se realizó una búsqueda en la literatura para tratar de elucidar de qué proteasa se podría tratar, se encontró que el peso molecular no coincide con ninguna de las cisteín-proteasas que son responsables del 90% de la actividad proteolítica, es decir, EhCP1, EhCP2 y EhCP5, y que además son parte indispensable de la virulencia. Sólo se encontró una cisteín-proteasa de un peso molecular similar (130 kDa) que es capaz de degradar transferrina (Reyes-Lopez Serrano-Luna et al., 2013). Habría que determinar específicamente de qué proteasa se trata (aproximadamente 134 kDa), y sobre todo determinar la función que cumple en la amiba. Pues, aunque no sea de las cisteín-proteasas consideradas importantes, no se debe descartar que esta proteasa cumpla alguna función esencial en *E. histolytica*, por ejemplo, si resulta ser la misma proteasa que degrada transferrina y se disminuye la secreción, podría estar alterando la obtención de hierro de moléculas del hospedero y, por tanto, afectando la sobrevivencia del microorganismo. Para probar que es la misma proteasa que degrada transferrina, se deben aislar y caracterizar ambas proteasas, primero caracterizar el tipo de proteasa de la que se trata, pero idealmente secuenciar ambas y hacer una comparación. Finalmente se requiere de más información acerca de la proteasa de aproximadamente 134 kDa, para poder elucidar la magnitud de la alteración que podría estar sufriendo *E. histolytica* al entrar en contacto con la apo-Lf.

## 11. Conclusiones

Existe una variabilidad en la eficacia de la apo-Lf bovina que depende de la calidad y el microorganismo contra el cual se esté probando. Marcas con certificaciones de calidad para consumo humano como GRAS y Novel Food son las más eficientes.

Se encontró que la apo-Lf bovina modifica el patrón de proteasas del extracto total, produciendo una proteasa de aproximadamente 225 kDa que no se produce en la

condición control y que pudiera deberse a la condición de estrés causada por la apo-Lf bovina.

La apo-Lf bovina modifica la actividad proteolítica de una proteasa de aproximadamente 134 kDa en el medio condicionado, reduciendo la actividad en un 20.70%.

## 12. Perspectivas

1. Es importante regresar a la marca MorinagaMilk pues ha demostrado ser más efectiva que NutriScience contra *E. histolytica*, otra opción sería continuar la investigación con apo-Lf humana o con los péptidos de Lf que han resultado ser efectivos como Lfcin, Lfampin o la quimera de Lf (Lfcin17-30/Lfampin) (Díaz-Godínez et al., 2019; León-Sicairos, et al., 2006; López-Soto et al., 2010) siempre tomando en cuenta las condiciones de los trabajos anteriores para disminuir la variabilidad, y asegurar reproducibilidad.
2. Trabajar con trofozoítos que recién hayan pasado por hígado de hámster para asegurar su virulencia y caracterizar la alteración en una cepa virulenta para una mejor aproximación.
3. Caracterizar y secuenciar la proteasa de 225 kDa encontrada en los extractos y la de 134 kDa encontrada en el medio condicionado para poder estimar el impacto que tiene la apo-Lf bovina sobre la producción y secreción de proteasas de *E. histolytica*.
4. Buscar diferencias en el patrón de proteínas, pues se logran observar ligeros cambios en proteínas de peso molecular alto, evidenciado en el SDS-PAGE con tinción de plata. Se recomienda un método de separación en 2D.
5. Para corroborar un daño a la membrana hacer un ensayo de permeabilidad con Dextran marcado con isocianato de fluoresceína (FITC), a diferentes concentraciones de apo-Lf bovina. El dextran normalmente no es capaz de

penetrar las células cuando la membrana se encuentra intacta, si la apo-Lf es capaz de permeabilizar la membrana, el dextran será capaz de penetrar la célula y por su marcaje fluorescente se podrá observar al microscopio.

6. Buscar daño al sistema de endomembranas de *E. histolytica* con dosis subletales de apo-Lf bovina por microscopía electrónica.
7. Buscar daño en el citoesqueleto de *E. histolytica* por microscopía confocal, inmunotiñendo elementos del citoesqueleto.
8. Seguir investigando el efecto que tiene la apo-Lf sobre otros mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica* que se encuentran relacionados con la membrana celular y sus moléculas de superficie, por ejemplo: adhesión, citotoxicidad y eritrofagocitosis.

### 13. Bibliografía

- Abd-Alla, J., Rogers, Reddy, & Ravdin, J. I. (2006). Mucosal immunity to asymptomatic *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection is associated with a peak intestinal anti-lectin immunoglobulin A antibody response. *Infection and Immunity*, 74(7), 3897–3903. <https://doi.org/10.1128/IAI.02018-05>
- Adlerova, Bartoskova, & Faldyna. (2008). Lactoferrin: a review. *Veterinarni Medicina*, 53(9), 457-468
- Aguilar-Diaz, H., Canizalez-Roman, A., Nepomuceno-Mejia, T., Gallardo-Vera, F., Hornelas-Orozco, Y., Nazmi, K., ... & Leon-Sicairos, N. (2017). Parasiticidal effect of synthetic bovine lactoferrin peptides on the enteric parasite *Giardia intestinalis*. *Biochemistry and Cell Biology*, 95(1), 82-90.
- Aisen, P., & Leibman, A. (1972). Lactoferrin and transferrin: a comparative study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 257(2), 314-323.
- Alvarado-Esquivel, C., Hernandez-Tinoco, J., & Sanchez-Anguiano, L. F. (2015). Seroepidemiology of *Entamoeba histolytica* infection in general population in

- rural Durango, Mexico. *Journal of clinical medicine research*, 7(6), 435.
- Anand, N., Sehgal, R., Kanwar, R. K., Dubey, M. L., Vasishta, R. K., & Kanwar, J. R. (2015). Oral administration of encapsulated bovine lactoferrin protein nanocapsules against intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *International journal of nanomedicine*, 10, 6355.
- Ankri, S., Padilla-Vaca, F., Stolarsky, T., Koole, L., Katz, U., & Mirelman, D. (1999). Antisense inhibition of expression of the light subunit (35 kDa) of the Gal/GalNac lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. *Molecular Microbiology*, 33(2), 327–337. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01476.x>
- Asgharpour, A., Gilchrist, C., Baba, D., Hamano, S., & Houpt, E. (2005). Resistance to intestinal *Entamoeba histolytica* infection is conferred by innate immunity and Gr-1+ cells. *Infection and Immunity*, 73(8), 4522–4529. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4522-4529.2005>
- Avalos-Gómez, C., Reyes-López, M., Ramírez-Rico, G., Díaz-Aparicio, E., Zenteno, E., González-Ruiz, C., & De La Garza, M. (2020). Effect of apo-lactoferrin on leukotoxin and outer membrane vesicles of *Mannheimia haemolytica* A2. *Veterinary Research*, 51(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00759-z>
- Azam, A., Peerzada, M. N., & Ahmad, K. (2015). Parasitic diarrheal disease: Drug development and targets. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1183. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01183>
- Bansal, D., Ave, P., Kerneis, S., Frileux, P., Boché, O., Baglin, A. C., Dubost, G., Leguern, A. S., Prevost, M. C., Bracha, R., Mirelman, D., Guillén, N., & Labruyère, E. (2009). An ex-vivo human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(11), e551. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000551>
- Baroogh, Y. G., Khanaliha, K., Maleki, F., Torkashvand, H., & Tabatabaie, F. (2019). Assessment of the effect of lactoferrin on promastigote and amastigote forms of *Leishmania major* In Vitro. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 12(9), 1-8. <https://doi.org/10.5812/jjm.95865>
- Baxt, L. A., Rastew, E., Bracha, R., Mirelman, D., & Singh, U. (2010). Downregulation of an *Entamoeba histolytica* rhomboid protease reveals roles in regulating parasite

- adhesion and phagocytosis. *Eukaryotic Cell*, 9(8), 1283–1293.  
<https://doi.org/10.1128/EC.00015-10>
- Betanzos, A., Javier-Reyna, R., García.Rivera, G., Buñuelos, C., González-Mariscal, L., Schnoor, M., & Orozco, E. (2013). The EhCPADH112 Complex of *Entamoeba histolytica* interacts with tight junction proteins occludin and claudin-1 to produce epithelial damage. *PLoS One*, 8(6), e65100..  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065100>
- Bhattacharya, A., Arya, R., Clark, C. G., & Ackers, J. P. (2000). Absence of lipophosphoglycan-like glycoconjugates in *Entamoeba dispar*. *Parasitology*, 120(1), 31–35. <https://doi.org/10.1017/S0031182099005259>
- Blazquez, S., Rigotherier, M. C., Huerre, M., & Guillén, N. (2007). Initiation of inflammation and cell death during liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* depends on activity of the galactose/N-acetyl-d-galactosamine lectin. *International Journal for Parasitology*, 37(3–4), 425–433.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.10.008>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Bruchhaus, I., Jacobs, T., Leippe, M., & Tannich, E. (1996). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: Differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Molecular Microbiology*, 22(2), 255–263. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.00111.x>
- Bruchhaus, I., Loftus, B. J., Hall, N., & Tannich, E. (2003). The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryotic Cell*, 2(3), 501–509. <https://doi.org/10.1128/EC.2.3.501-509.2003>
- Bruni, N., Capucchio, M. T., Biasibetti, E., Pessione, E., Cirrincione, S., Giraud, L., Corona, A., & Dosio, F. (2016). Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. *Molecules*, 21(6), 752. <https://doi.org/10.3390/molecules21060752>
- Ceruelos, A. H., Romero-Quezada, L. C., Ledezma, J. R., & Contreras, L. L. (2019).



- Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 23(1), 397-401.
- Chadee, K., Petri, W. A., Innes, D. J., & Ravdin, J. I. (1987). Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Investigation*, 80(5), 1245–1254. <https://doi.org/10.1172/JCI113199>
- Conesa, C., Sánchez, L., Rota, C., Pérez, M., Calvo, M., Farnaud, S., & Evans, R. W. (2008). Isolation of lactoferrin from milk of different species : Calorimetric and antimicrobial studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(1), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.02.005>
- Cornick, S., & Chadee, K. (2017). *Entamoeba histolytica*: Host parasite interactions at the colonic epithelium. *Tissue Barriers*, 5(1), e1283386. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1283386>
- Cornish, J., Callon, K. E., Naot, D., Palmano, K. P., Banovic, T., Bava, U., Watson, M., Lin, J., Tong, P. C., Chen, Q. I., Chan, V. A., Reid, H. E., Fazzalari, N., Baker, H. M., Baker, E. N., Haggarty, N. W., Grey, A. B., & Reid, I. R. (2004). Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology*, 145(9), 4366–4374. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1307>
- Denis, M., & Chadee, K. (1989). Human neutrophils activated by interferon- $\gamma$  and tumour necrosis factor- $\alpha$  kill *Entamoeba histolytica* trophozoites in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*, 46(3), 270–274. <https://doi.org/10.1002/jlb.46.3.270>
- Díaz-Godínez, C., González-Galindo, X., Meza-Menchaca, T., Bobes, R. J., de la Garza, M., León-Sicairos, N., Laclette, J. P., & Carrero, J. C. (2019). Synthetic bovine lactoferrin peptide Lfampin kills *Entamoeba histolytica* trophozoites by necrosis and resolves amoebic intracecal infection in mice. *Bioscience Reports*, 39(1), BSR20180850. <https://doi.org/10.1042/bsr20180850>
- Dickson-Gonzalez, S. M., De Uribe, M. L., & Rodriguez-Morales, A. J. (2009). Polymorphonuclear neutrophil infiltration intensity as consequence of *Entamoeba histolytica* density in amebic colitis. *Surgical Infections*, 10(2), 91–97. <https://doi.org/10.1089/sur.2008.011>
- Dodson, J. M., Lenkowski, Jr., P. W., Eubanks, A. C., Jackson, T. F. G. H., Napodano, J.,

- Lyerly, D. M., Lockhart, L. A., Mann, B. J., & Petri, Jr., W. A. (1999). Infection and Immunity Mediated by the Carbohydrate Recognition Domain of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc Lectin . *The Journal of Infectious Diseases*, 179(2), 460–466.  
<https://doi.org/10.1086/314610>
- Franco, I., Pérez, M. D., Conesa, C., Calvo, M., & Sánchez, L. (2018). Effect of technological treatments on bovine lactoferrin: An overview. *Food Research International*, 106(December 2017), 173–182.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.016>
- Fritsch, G., Sawatzki, G., Treumer, J., Jung, A., & Spira, D. T. (1987). *Plasmodium falciparum*: Inhibition in Vitro with Lactoferrin , Desferriferriothiocin, and Desferricrocin. *Experimental Parasitology*, 63 (1), 1–9.
- Frontera, L. S., Moyano, S., Quassollo, G., Lanfredi-Rangel, A., Rópolo, A. S., & Touz, M. C. (2018). Lactoferrin and lactoferricin endocytosis halt *Giardia* cell growth and prevent infective cyst production. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36563-1>
- Gadasi, H., & Kessler, E. (1983). Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*, 39(2), 528–531.  
<https://doi.org/10.1128/iai.39.2.528-531.1983>
- Gadasi, Hana, & Kobiler, D. (1983). *Entamoeba histolytica*: Correlation of proteolytic between virulence enzymes. *Experimental Parasitology*, 55(1), 105–110.
- Galván-Moroyoqui, J. M., del Carmen Domínguez-Robles, M., & Meza, I. (2011). Pathogenic bacteria prime the induction of Toll-like receptor signalling in human colonic cells by the Gal/GalNAc lectin Carbohydrate Recognition Domain of *Entamoeba histolytica*. *International Journal for Parasitology*, 41(10), 1101–1112.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.06.003>
- García-Nieto, R. M., Rico-Mata, R., Arias-Negrete, S., & Avila, E. E. (2008). Degradation of human secretory IgA1 and IgA2 by *Entamoeba histolytica* surface-associated proteolytic activity. *Parasitology International*, 57(1), 417–423.  
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.04.013>
- García-Rivera, G., Rodríguez, M. A., Ocádiz, R., Martínez-López, M. C., Arroyo, R., González-Robles, A., & Orozco, E. (1999). *Entamoeba histolytica*: A novel cysteine

- protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular Microbiology*, 33(3), 556–568. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01500.x>
- García, M. A., Gutiérrez-Kobeh, L., & Vancell, R. L. (2015). *Entamoeba histolytica*: adhesins and lectins in the trophozoite surface. *Molecules*, 20(2), 2802–2815. <https://doi.org/10.3390/molecules20022802>
- Ghosh, A., & Raha, S. (2015). Molecular and functional characterisation of a stress responsive cysteine protease, EhCP6 from *Entamoeba histolytica*. *Protein Expression and Purification*, 109, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.02.005>
- Ghosh, P. K., Ventura, J., Gupta, S., Serrano, J., Tsutsumi, V., & Ortiz-Ortiz, L. (2000). Experimental amebiasis: Immunohistochemical study of immune cell populations. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(4), 395–399. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00066.x>
- Ghosh, S., Padalia, J., & Moonah, S. (2019). Tissue Destruction Caused by *Entamoeba histolytica* Parasite: Cell Death, Inflammation, Invasion, and the Gut Microbiome. *Current Clinical Microbiology Reports*, 6(1), 51–57. <https://doi.org/10.1007/s40588-019-0113-6>
- González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(4), 301.e1-301.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020>
- Gonzalez-Ruiz, A., Haque, R., Aguirre, A., Castanon, G., Hall, A., Guhl, F., Ruiz-Palacios, G., Miles, M. A., & Warhurst, D. C. (1994). Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Pathology*, 47(3), 236–239. <https://doi.org/10.1136/jcp.47.3.236>
- Guerrant, R. L., Brush, J., Ravdin, J. I., Sullivan, J. A., & Mandell, G. L. (1981). Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of Infectious Diseases*, 143(1), 83–93. <https://doi.org/10.1093/infdis/143.1.83>
- Guerrero-Manríquez, G., Sánchez-Ibarra, F., & Avila, E. E. (1998). Inhibition of *Entamoeba histolytica* proteolytic activity of by human salivary IgA antibodies.

- APMIS, 106 (7-12), 1088-1094.
- Gutiérrez-Jiménez, J., Luna-Cazáres, L. M., & Vidal, J. E. (2017). Handbook of Famine, Starvation, and Nutrient Deprivation. *Handbook of Famine, Starvation, and Nutrient Deprivation*, 1–18. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-40007-5>
- Hellberg, A., Nowak, N., Leippe, M., Tannich, E., & Bruchhaus, I. (2002). Recombinant expression and purification of an enzymatically active cysteine proteinase of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Protein Expression and Purification*, 24(1), 131–137. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1548>
- Hou, Y., Mortimer, L., & Chadee, K. (2010). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 5 binds integrin on colonic cells and stimulates NFκB-mediated pro-inflammatory responses. *Journal of Biological Chemistry*, 285(46), 35497–35504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.066035>
- Huston, C. D., Boettner, D. R., Miller-Sims, V., & Petri, W. A. (2003). Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*, 71(2), 964–972. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.964-972.2003>
- Huston, C. D., Houpt, E. R., Mann, B. J., Hahn, C. S., & Petri, W. A. (2000). Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology*, 2(6), 617–625. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2000.00085.x>
- Ishikawa, H., Awano, N., Fukui, T., Sasaki, H., & Kyuwa, S. (2013). The protective effects of lactoferrin against murine norovirus infection through inhibition of both viral attachment and replication. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 434(4), 791–796. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.013>
- Iyer, L. R., Verma, A. K., Paul, J., & Bhattacharya, A. (2019). Phagocytosis of Gut Bacteria by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 34. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00034>
- Kaur, U., Sharma, A. K., Sharma, M., & Vohra, H. (2004). Distribution of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin-specific antibody response in an endemic area. *Scandinavian Journal of Immunology*, 60(5), 524–528. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01512.x>
- Keene, W. E., Petitt, M. G., Allen, S., & McKerrow, J. H. (1986). The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Experimental Medicine*, 163(3),

536–549. <https://doi.org/10.1084/jem.163.3.536>

- Kelsall, B. L., & Ravdin, J. I. (1993). Degradation of Human IgA by *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Infectious Diseases*, *168*(5), 1319–1322.
- Khomkhum, N., Leetachewa, S., Pawestri, A. R., & Moonsom, S. (2019). Host-antibody inductivity of virulent *Entamoeba histolytica* and non-virulent *Entamoeba moshkovskii* in a mouse model. *Parasites and Vectors*, *12*(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3363-5>
- Kilian, M., Mestecky, J., & Russell, M. W. (1988). Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiological Reviews*, *52*(2), 296–303.  
<https://doi.org/10.1128/membr.52.2.296-303.1988>
- Lauwaet, T., Oliveira, M. J., Callewaert, B., Bruyne, G. De, Mareel, M., & Leroy, A. (2004). Proteinase inhibitors TPCK and TLCK prevent *Entamoeba histolytica* induced disturbance of tight junctions and microvilli in enteric cell layers in vitro. *International Journal for Parasitology*, *34*(7), 785–794.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.03.007>
- Lauwaet, T., Oliveira, M. J., Callewaert, B., De Bruyne, G., Saelens, X., Ankri, S., Vandenabeele, P., Mirelman, D., Mareel, M., & Leroy, A. (2003). Proteolysis of enteric cell villin by *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(25), 22650–22656.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M300142200>
- Leitch, E. C., & Willcox, M. D. P. (1999). Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme. *Journal Medical Microbiology*, *48*(9), 867–871.
- León-Sicairos, N., López-Soto, F., Reyes-López, M., Godínez-Vargas, D., Ordaz-Pichardo, C., & de la Garza, M. (2006). Amoebicidal Activity of Milk , Apo-lactoferrin, sIgA and Lysozyme. *Clinical medicine & research*, *4*(2), 106-113.
- León-Sicairos, N., Martínez-Pardo, L., Sánchez-Hernández, B., de la Garza, M., & Carrero, J. C. (2012). Oral lactoferrin treatment resolves amoebic intracecal infection in C3H/HeJ mice. *Biochemistry and Cell Biology*, *90*(3), 435–441.  
<https://doi.org/10.1139/o2012-008>
- León-Sicairos, N., Reyes-López, M., Canizalez-Román, A., Bermúdez-Cruz, R. M.,

- Serrano-Luna, J., Arroyo, R., & de la Garza, M. (2005). Human hololactoferrin: Endocytosis and use as an iron source by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Microbiology*, *151*(12), 3859–3871. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28121-0>
- León-Sicairos, N., Reyes-López, M., Ordaz-Pichardo, C., & de la Garza, M. (2006). Microbicidal action of lactoferrin and lactoferricin and their synergistic effect with metronidazole in *Entamoeba histolytica*. *Biochemistry and Cell Biology*, *84*(3), 327–336. <https://doi.org/10.1139/o06-060>
- Leroy, A., Lauwaet, T., De Bruyne, G., Cornelissen, M., & Mareel, M. (2000). *Entamoeba histolytica* disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers. *The FASEB Journal*, *14*(9), 1139–1146. <https://doi.org/10.1096/fasebj.14.9.1139>
- Leroy, A., Lauwaet, T., Oliveira, M. J., De Bruyne, G., Bracha, R., Ankri, S., Katz, U., Mirelman, D., & Mareel, M. (2000). Disturbance of tight junctions by *Entamoeba histolytica*: Resistant vertebrate cell types and incompetent trophozoites. *Archives of Medical Research*, *31*(4), S218–S220. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(00\)00145-4](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(00)00145-4)
- Levay, P. F., & Viljoen, M. (1995). Lactoferrin: a general review. *Haematologica*, *80*(3), 252–267.
- Li, E., Becker, A., & Stanley, S. L., Jr (1989). Chinese hamster ovary cells deficient in N-acetylglucosaminyltransferase I activity are resistant to *Entamoeba histolytica*-mediated cytotoxicity. *Infection and Immunity*, *57*(1), 8–12. <https://doi.org/10.1128/iai.57.1.8-12.1989>
- Lin, J. Y., Seguin, R., Keller, K., & Chadee, K. (1994). Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. *Infection and Immunity*, *62*(5), 1534–1541. <https://doi.org/10.1128/iai.62.5.1534-1541.1994>
- Lidell, M. E., Moncada, D. M., Chadee, K., & Hansson, G. C. (2006). *Entamoeba histolytica* cysteine protease cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(24), 9298–9303. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600623103>
- López-Soto, F., León-Sicairos, N., Nazmi, K., Bolscher, J. G., & De La Garza, M. (2010).

- Microbicidal effect of the lactoferrin peptides Lactoferricin17-30, Lactoferrampin265-284, and Lactoferrin chimera on the parasite *Entamoeba histolytica*. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 23(3), 563–568. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9295-3>
- López-Soto, F., León-Sicairos, N., Reyes-López, M., Serrano-Luna, J., Ordaz-Pichardo, C., Piña-Vázquez, C., Ortiz-Estrada, G., & de la Garza, M. (2009). Use and endocytosis of iron-containing proteins by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infection, Genetics and Evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 9(6), 1038–1050. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.05.018>
- Luna-Castro, S., Aguilar-Romero, F., Samaniego-Barrón, L., Godínez-Vargas, D., & de la Garza, M. (2014). Effect of bovine apo-lactoferrin on the growth and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 27(5), 891–903. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9752-5>
- Maldonado-Bernal, C., Kirschning, C. J., Rosenstein, Y., Rocha, L. M., Rios-Sarabia, N., Espinosa-Cantellano, M., Becker, I., Estrada, I., Salazar-González, R. M., López-Macías, C., Wagner, H., Sánchez, J., & Isibasi, A. (2005). The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. *Parasite Immunology*, 27(4), 127–137. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00754.x>
- Mann, B. J., Chung, C. Y., Dodson, J. M., Ashley, L. S., Braga, L. L., & Snodgrass, T. L. (1993). Neutralizing monoclonal antibody epitopes of the *Entamoeba histolytica* galactose adhesin map to the cysteine-rich extracellular domain of the 170-kilodalton subunit. *Infection and Immunity*, 61(5), 1772–1778. <https://doi.org/10.1128/iai.61.5.1772-1778.1993>
- Manning-Cela, R., Marquez, C., Franco, E., Talamas-Rohana, P., & Meza, I. (2003). BFA-sensitive and insensitive exocytic pathways in *Entamoeba histolytica* trophozoites: Their relationship to pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 5(12), 921–932. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00332.x>



- Marie, C., & Petri, W. A. (2014). Regulation of Virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annual Review of Microbiology*, 68(1), 493–520.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103550>
- Mariller, C., Hardivillé, S., Hoedt, E., Huvent, I., Pina-Canseco, S., & Pierce, A. (2012). Delta-lactoferrin, an intracellular lactoferrin isoform that acts as a transcription factor. *Biochemistry and Cell Biology*, 90(3), 307–319.  
<https://doi.org/10.1139/o11-070>
- Martínez-Castillo, M., Pacheco-Yepez, J., Flores-Huerta, N., Guzmán-Téllez, P., Jarillo-Luna, R. A., Cárdenas-Jaramillo, L. M., Campos-Rodríguez, R., & Shibayama, M. (2018). Flavonoids as a natural treatment against *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(JUN), 1–14.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00209>
- Masson, P. L., Heremans, J. F., & Dive, C. (1966). An Iron-Binding Protein Common to Many External Secretions. *Clinica Chimica Acta*, 14, 735–739.
- Matthiesen, J., Bär, A. K., Bartels, A. K., 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), 1–11.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.00072-13>
- Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A., & Ebert, M. H. (1981). Ultrasensitive Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels Shows Regional Variation in Cerebrospinal Fluid Proteins. *Science*, 211, 1437–1438.
- Mirelman, D., & Bracha, R. (1982). Adherence and ingestion of bacteria by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Archivos de Investigacion Medica*, 13(Suppl. 3), 109–122.
- Mitra, B. N., Saito-Nakano, Y., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., & Nozaki, T. (2007). Rab11B small GTPase regulates secretion of cysteine proteases in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology*, 9(9), 2112–2125.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00941.x>
- Mohammad, F. I. (2019). A general review on the amoebiasis. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 479–483.  
<https://doi.org/10.26452/ijrps.v10i1.1872>



- Moncada, Darcy, Keller, K., & Chadee, K. (2003). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. *Infection and Immunity*, *71*(2), 838–844.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.838-844.2003>
- Moncada, Darcy, Yu, Y., Keller, K., & Chadee, K. (2000). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases degrade human colonic mucin and alter its function. *Archives of Medical Research*, *31*, S224–S225. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.838-844.2003>
- Moncada, Darcy, Keller, K., Ankri, S., Mirelman, D., & Chadee, K. (2006). Antisense inhibition of *Entamoeba histolytica* cysteine proteases inhibits colonic mucus degradation. *Gastroenterology*, *130*(3), 721–730.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.11.012>
- Moody-Haupt, S., Patterson, J. H., Mirelman, D., & McConville, M. J. (2000). The major surface antigens of *Entamoeba histolytica* trophozoites are GPI-anchored proteophosphoglycans. *Journal of Molecular Biology*, *297*(2), 409–420.  
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3577>
- Moody, S., Becker, S., Nuchamowitz, Y., & Mirelman, D. (1997). Virulent and avirulent *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* differ in their cell surface phosphorylated glycolipids. *Parasitology*, *114*, 95–104.
- Nozaki, T., & Bhattacharya, A. (2014). *Amebiasis Biology and Pathogenesis of Entamoeba*. Springer.
- Ordaz-Pichardo, C., León-Sicairos, N., Hernández-Ramírez, V. I., Talamás-Rohana, P., & de la Garza, M. (2012). Effect of bovine lactoferrin in a therapeutic hamster model of hepatic amoebiasis. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et biologie cellulaire*, *90*(3), 425–434. <https://doi.org/10.1139/o11-084>
- Orozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo, A., & Sánchez, T. (1983). *Entamoeba histolytica*: Phagocytosis as a virulence factor. *Journal of Experimental Medicine*, *158*(5), 1511–1521. <https://doi.org/10.1084/jem.158.5.1511>
- Ortíz-Estrada, G., Calderón-Salinas, V., Shibayama-Salas, M., León-Sicairos, N., & De La Garza, M. (2015). Binding and endocytosis of bovine hololactoferrin by the parasite *Entamoeba histolytica*. *BioMed Research International*, *2015*.

<https://doi.org/10.1155/2015/375836>

- Pacheco-Yépez, J., Campos-Rodríguez, R., Shibayama, M., Ventura-Juárez, J., Serrano-Luna, J., & Tsutsumi, V. (2001). *Entamoeba histolytica*: Production of nitric oxide and in situ activity of NADPH diaphorase in amebic liver abscess of hamsters. *Parasitology Research*, 87(1), 49–56. <https://doi.org/10.1007/s004360000287>
- Paredes, J. L., Sparks, H., White, A. C., Martinez-Traverso, G., Ochoa, T., & Castellanos-González, A. (2017). Killing of *Cryptosporidium* sporozoites by lactoferrin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(3), 774–776. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0804>
- Perdomo, D., Manich, M., Syan, S., Olivo-Marin, J. C., Dufour, A. C., & Guillén, N. (2016). Intracellular traffic of the lysine and glutamic acid rich protein KERP1 reveals features of endomembrane organization in *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology*, 18(8), 1134–1152. <https://doi.org/10.1111/cmi.12576>
- Petri, W. A., Smith, R. D., Schlesinger, P. H., Murphy, C. F., & Ravdin, J. I. (1987). Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Investigation*, 80(5), 1238–1244. <https://doi.org/10.1172/JCI113198>
- Petri, William A., Haque, R., & Mann, B. J. (2002). The Bittersweet Interface of Parasite and Host: Lectin-Carbohydrate Interactions During Human Invasion by the Parasite *Entamoeba histolytica*. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 39–64. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160959>
- Ragland, B. D., Ashley, L. S., Vaux, D. L., & Petri, W. A. (1994). *Entamoeba histolytica*: Target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2. In *Experimental Parasitology* (Vol. 79, Issue 3, pp. 460–467). <https://doi.org/10.1006/expr.1994.1107>
- Ralston, S. K., Solga, D. M., Mackey-Lawrence, M. N., Somlata, Bhattacharya, A., & Petri, W. A. J. (2014). Trophocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion. *Nature*, 526–530. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Ramos, E., Olivos-García, A., Nequiz, M., Saavedra, E., Tello, E., Saralegui, A., Montfort, I., & Pérez Tamayo, R. (2007). *Entamoeba histolytica*: Apoptosis induced in vitro by

- nitric oxide species. *Experimental Parasitology*, 116(3), 257–265.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.01.011>
- Rangel-Castañeda, I. A., Carranza-Rosales, P., Guzmán-Delgado, N. E., Hernández-Hernández, J. M., González-Pozos, S., Pérez-Rangel, A., & Castillo-Romero, A. (2019). Curcumin Attenuates the Pathogenicity of *Entamoeba histolytica* by Regulating the Expression of Virulence Factors in an Ex-Vivo Model Infection. *Pathogens*, 8(3), 127. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030127>
- Ravdin, J. I., & Guerrant, R. L. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 68(5), 1305–1313.  
<https://doi.org/10.1172/JCI110377>
- Ravdin, J. I., Moreau, F., Sullivan, J. A., Petri, W. A., & Mandell, G. L. (1988). Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*, 56(6), 1505–1512.
- Ravdin, J. I., Stanley, P., Murphy, C. F., & Petri, W. A. (1989). Characterization of cell surface carbohydrate receptors for *Entamoeba histolytica* adherence lectin. *Infection and Immunity*, 57(7), 2179–2186.  
<https://doi.org/10.1128/iai.57.7.2179-2186.1989>
- Reed, S. L., Keene, W. E., & McKerrow, J. H. (1989). Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(12), 2772–2777. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.12.2772-2777.1989>
- Rivera, W. L., Santos, H. J., Ong, V. A., & Murao, L. J. G. (2012). Profiles of *Entamoeba histolytica*-specific immunoglobulins in human sera. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(3), 234–238. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60031-5](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60031-5)
- Rodríguez, M. A., & Orozco, E. (1986). Isolation and Characterization of Phagocytosis- and Virulence-Deficient Mutants of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Infectious Diseases*, 154(1), 27–32. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79744-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79744-1)
- Rosa, L., Cutone, A., Lepanto, M. S., Paesano, R., & Valenti, P. (2017). Lactoferrin: a Natural Glycoprotein Involved in Iron and Inflammatory Homeostasis.

*International Journal of Molecular Sciences*, 18.

- Rosa, L., Cutone, A., Lepanto, M. S., Scotti, M. J., Conte, M. P., Paesano, R., & Valenti, P. (2018). Physico-chemical properties influence the functions and efficacy of commercial bovine lactoferrins. *BioMetals*, 31(3), 301–312.  
<https://doi.org/10.1007/s10534-018-0092-8>
- Saffer, L. D., & Petri, W. A. (1991). Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. *Infection and Immunity*, 59(12), 4681–4683.
- Samaniego-Barrón, L., Luna-Castro, S., Piña-Vázquez, C., Suárez-Güemes, F., & De La Garza, M. (2016). Two outer membrane proteins are bovine lactoferrin-binding proteins in *Mannheimia haemolytica* A1. *Veterinary Research*, 47(1), 1–15.  
<https://doi.org/10.1186/s13567-016-0378-1>
- Sateriale, A., & Huston, C. D. (2011). A Sequential Model of Host Cell Killing and Phagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *Journal of Parasitology Research*, 2011.  
<https://doi.org/10.1155/2011/926706>
- Schulte, W., & Scholze, H. (1989). Action of the Major Protease from *Entamoeba histolytica* on Proteins of the Extracellular Matrix. *The Journal of Protozoology*, 36(6), 538–543. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1989.tb01092.x>
- Serrano-Luna, J., Piña-Vázquez, C., Reyes-López, M., Ortiz-Estrada, G., & De La Garza, M. (2013). Proteases from *Entamoeba spp.* and Pathogenic Free-Living Amoebae as Virulence Factors. *Journal of Tropical Medicine*, 2013.  
<https://doi.org/10.1155/2013/890603>
- Serrano, J. D. J., De La Garza, M., Reyes, M., León, G., Tovar, R., & De Lourdes Muñoz, M. (1996). *Entamoeba histolytica*: Proteinase secretion induced by collagen type I is dependent on cytoskeleton integrity. *Parasitology Research*, 82(3), 200–205.  
<https://doi.org/10.1007/s004360050095>
- Seydel, K. B., Smith, S. J., & Stanley, S. L. (2000). Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infection and Immunity*, 68(1), 400–402.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.68.1.400-402.2000>
- Siman-Tov, R., & Ankri, S. (2003). Nitric oxide inhibits cysteine proteinases and

- alcohol dehydrogenase 2 of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Research*, 89(2), 146–149. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0716-2>
- Stanley, S. L., Zhang, T., Rubin, D., & Li, E. (1995). Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infection and Immunity*, 63(4), 1587–1590. <https://doi.org/10.1128/iai.63.4.1587-1590.1995>
- Stanley, Samuel L., Huizenga, H., & Li, E. (1992). Isolation and partial characterization of a surface glycoconjugate of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 50(1), 127–138. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90250-N](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90250-N)
- Teixeira, J. E., Sateriale, A., Bessoff, K. E., & Huston, C. D. (2012). Control of *Entamoeba histolytica* adherence involves metallosurface protease 1, an M8 family surface metalloprotease with homology to leishmanolysin. *Infection and Immunity*, 80(6), 2165–2176. <https://doi.org/10.1128/IAI.06389-11>
- Thibeaux, R., Ave, P., Bernier, M., Morcelet, M., Frileux, P., Guille, N., & Labruyere, E. (2014). The parasite *Entamoeba histolytica* exploits the activities of human matrix metalloproteinases to invade colonic tissue. *Nature communications*, 5, 5142.. <https://doi.org/10.1038/ncomms6142>
- Thibeaux, R., Dufour, A., Roux, P., Bernier, M., Baglin, A. C., Frileux, P., Olivo-Marin, J. C., Guillén, N., & Labruyère, E. (2012). Newly visualized fibrillar collagen scaffolds dictate *Entamoeba histolytica* invasion route in the human colon. *Cellular Microbiology*, 14(5), 609–621. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01752.x>
- Tiewcharoen, S., Phurttikul, W., Rabablert, J., Auewarakul, P., Roytrakul, S., Chetanachan, P., Atithev, T., & Junnu, V. (2014). Effect of synthetic antimicrobial peptides on *Naegleria fowleri* trophozoites. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 45(3), 537–546.
- Tillack, M., Biller, L., Irmer, H., Freitas, M., Gomes, M. A., Tannich, E., & Bruchhaus, I. (2007). The *Entamoeba histolytica* genome : primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC genomics*, 8, 170. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-170>
- Tomita, S., Suzuki, C., Wada, H., Nomachi, M., Imayasu, M., & Araki-Sasaki, K. (2017).

- Effects of lactoferrin on the viability and the encystment of *Acanthamoeba* trophozoites. *Biochemistry and Cell Biology*, 95(1), 48–52.  
<https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0054>
- Tran, V. Q., Herdman, D. S., Torian, B. E., & Reed, S. L. (1998). The Neutral Cysteine Proteinase of *Entamoeba histolytica* Degrades IgG and Prevents Its Binding. *The Journal of infectious diseases*, 177(2), 508–511.
- Trissl, D., Martínez-Palomo, A., De La Torre, M., De La Hoz, R., & De Suárez, E. P. (1978). Surface properties of *Entamoeba*: Increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *Journal of Experimental Medicine*, 148(5), 1137–1145. <https://doi.org/10.1084/jem.148.5.1137>
- Tsutsumi, V., & Martinez-Palomo, A. (1988). Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *American Journal of Pathology*, 130(1), 112–119.
- Tsutsumi, V., Mena-Lopez, R., Anaya-Velazquez, F., & Martinez-Palomo, A. (1984). Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *American Journal of Pathology*, 117(1), 81–91.
- Turchany, J. M., Mccaffery, J. M., Aley, S. B., & Gillin, F. D. (1997). Ultrastructural effects of lactoferrin binding on *Giardia lamblia* trophozoites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44(1), 68–72. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1997.tb05694.x>
- Vaithilingam, A., Teixeira, J. E., Miller, P. J., Heron, B. T., & Huston, C. D. (2012). *Entamoeba histolytica* cell surface calreticulin binds human C1q and functions in amebic phagocytosis of host cells. *Infection and Immunity*, 80(6), 2008–2018.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.06287-11>
- Varadhachary, A., Wolf, J. S., Petrak, K., O'Malley, B. W., Spadaro, M., Curcio, C., Forni, G., & Pericle, F. (2004). Oral lactoferrin inhibits growth of established tumors and potentiates conventional chemotherapy. *International Journal of Cancer*, 398–403. <https://doi.org/10.1002/ijc.20271>
- Wakabayashi, H., Uchida, K., Yamauchi, K., & Teraguchi, S. (2000). Lactoferrin given in food facilitates dermatophytosis cure in guinea pig models. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 595–601.

- Wakabayashi, H., Yamauchi, K., & Abe, F. (2018). Quality control of commercial bovine lactoferrin. *BioMetals, February*. <https://doi.org/10.1007/s10534-018-0098-2>
- Wang, B., Timilsena, Y. P., Blanch, E., & Adhikari, B. (2017). Characteristics of bovine lactoferrin powders produced through spray and freeze drying processes. *International Journal of Biological Macromolecules, 95*, 985–994. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.087>
- Weber, C., Guigon, G., Bouchier, C., Frangeul, L., Moreira, S., Sismeiro, O., Gouyette, C., Mirelman, D., Coppee, J. Y., & Guillén, N. (2006). Stress by heat shock induces massive down regulation of genes and allows differential allelic expression of the Gal/GalNAc lectin in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic Cell, 5*(5), 871–875. <https://doi.org/10.1128/EC.5.5.871-875.2006>
- Wheeler, M. A., Smith, S. D., García-Cardena, G., Nathan, C. F., Weiss, R. M., & Sessa, W. C. (1997). Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation, 99*(1), 110–116. <https://doi.org/10.1172/JCI119121>
- Woof, J. M., & Ken, M. A. (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. *Journal of Pathology, 208*(2), 270–282. <https://doi.org/10.1002/path.1877>
- Yu, Y., & Chade, K. (1997). *Entamoeba histolytica* Stimulates Interleukin 8 From Human Colonic Epithelial Cells Without Parasite-Enterocyte Contact. *Nursing Mirror, 112*, 1536–1547. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-08636-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-662-08636-0_6)
- Zhang, Z., Duchêne, M., & Stanley, S. L. (2002). A monoclonal antibody to the amebic lipophosphoglycan-proteophosphoglycan antigens can prevent disease in human intestinal xenografts infected with *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity, 70*(10), 5873–5876. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5873-5876.2002>