



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**Absceso hepático amibiano: caracterización de la
vía de señalización Hedgehog en el proceso de
regeneración.**

Tesis que presenta

M. en C. Karla Jocelyn Ortega Carballo

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

en Infectómica y Patogénesis Molecular

Directores de Tesis

Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi

Dr. José Luis Rosales Encina

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

Este proyecto se realizó bajo la dirección del Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi y del Dr. José Luis Rosales Encina, ambos del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (DIPM) y con la asesoría del Dr. Adolfo Martínez Palomo del DIPM, Dra. Patricia Talamás Rohana del DIPM, Dr. Pablo Muriel de la Torre del Departamento de Farmacología de esta institución y la Dra. Cecilia Ximénez García de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CVU 767773) y apoyado por proyecto de Ciencias Básicas de CONAHCYT No. A1-S-27705.

AGRADECIMIENTOS

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

En primer lugar, agradezco infinitamente al Dr. Víctor Tsutsumi por todo su apoyo, la orientación y la sabiduría que me ha brindado a lo largo de estos 9 años, su generosidad al compartir sus conocimientos y experiencias ha tenido un impacto significativo en mi desarrollo personal y profesional. Gracias por guiarme, hoy he podido superar retos y desafíos que nunca habría podido abordar sin sus acertados consejos y apoyo incondicional. Su paciencia y disposición para escucharme y responder a mis preguntas han hecho que este viaje de aprendizaje sea excepcionalmente valioso. Para usted todo mi cariño, admiración y respeto.

Agradezco al Dr. José Luis Rosales Encina por su tiempo y apoyo con reactivos, ideas, recomendaciones y análisis de resultados.

Agradezco de manera especial al Dr. Pablo Muriel de la Torre por todo el apoyo brindado, por compartirme sus conocimientos y por su gran colaboración con material necesario, por su tiempo, comentarios y consejos acertados para la realización de este proyecto.

Agradezco a la Dra. Patricia Talamás Rohana, Dra. Cecilia Ximénez García y al Dr. Adolfo Martínez Palomo por su asesoría y recomendaciones para el proyecto.

Agradezco a la M. en C. Karla Montserrat Gil Becerril, por su apoyo técnico en biología molecular, procesamiento de muestras para microscopía electrónica, histología, cirugía de animales de experimentación y por sus recomendaciones para la realización de este proyecto; a la Q.F.B Silvia Galindo Gómez, por su apoyo técnico, en cultivo celular e histología; a la Bióloga Lidia Baylón Pacheco, por su apoyo brindado en la asesoría de técnicas en biología molecular; a la M. en C. Patricia Espíritu Gordillo, por su apoyo técnico en biología molecular., a la Bióloga Carmen Ramírez-Estudillo por su apoyo técnico en biología molecular y recomendaciones para este proyecto; a la Q.F.B Claudia Márquez Dueñas por su amable colaboración en el uso de equipos de biología molecular y su apoyo técnico en biología molecular; a la Dra. Karla Acosta por su apoyo técnico en biología molecular; al Dr. Daniel Talamás Lara por su apoyo técnico en la obtención de micrografías electrónicas de transmisión, trabajo realizado en la Unidad de microscopía

electrónica LaNSE; a la Dra. Irina Cardoso Lezama por su importante apoyo técnico en la elaboración de western blot y análisis de proteína; a la Lic. Jessica Márquez Dueñas por su apoyo secretarial y al Señor Víctor Pinales por su apoyo técnico en la manipulación de animales de experimentación y por su apoyo en el mantenimiento adecuado del material del laboratorio.

Gracias a mis queridos amigos Karla Acosta, Alan, Melisa y Karla Gil por todo su apoyo, consejos y cariño, por siempre darme ánimos y fuerzas para continuar, por las pláticas amenas y regaños, los llevo siempre en mi mente y corazón.

Finalmente, agradezco infinitamente a mis amados padres Sara y Carlos por todo su apoyo, amor, comprensión y por cuidar y educar a mi pequeño mientras yo estaba en el laboratorio, sin ustedes yo no habría podido continuar. Gracias por todo su esfuerzo, por cambiar su rutina diaria con tal de cuidar y amar a su nieto. A mi hermana Itzel por su amor, paciencia y apoyo. A mi amado esposo Omar; por darme la fuerza necesaria para culminar este sueño, por todo el apoyo incondicional, por cuidar de nuestro hijo mientras yo seguía mi sueño, por su paciencia, apoyo incondicional y el inmenso amor.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi pequeño hijo Santiago, la bendición más grande de mi vida y por quien lucho cada día para superarme. A mis padres por todo su apoyo en el cuidado y educación de Santi, por su inmenso amor y apoyo emocional y económico que me han brindado todo este tiempo. A mi querido sensei Víctor Tsutsumi por guiarme durante todo este tiempo, por alentarme a superarme, por compartirme sus grandes conocimientos, por darme consejos y sobre todo por ser un gran amigo para mí.

Con agradecimiento, amor y cariño: Karla

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I.- INTRODUCCIÓN.	3
1.1 Amibiasis y epidemiología.....	3
1.2 Ciclo de vida.....	4
1.3 Patogenicidad.	6
1.4 Diagnóstico y Tratamiento de la amibiasis.	6
1.4.1 Mecanismo de acción del metronidazol.	7
1.5 Patología.....	7
1.5.1 Amibiasis intestinal.	8
1.5.2 Amibiasis hepática.....	9
1.6 Hígado.....	10
1.6.1 Anatomía.	11
1.6.3 Unidad hepática funcional y estructural.....	12
1.6.4 Histología.	13
1.7 Regeneración hepática.	16
1.7.1 Modelos de regeneración hepática.....	17
1.7.2 Proceso de regeneración hepática.	18
1.8 Vía de señalización Hedgehog.	21
1.8.2 Síntesis y procesamiento de Hedgehog.	23
1.8.3 Recepción y transducción de señal.	23
1.8.4 Ciclopamina.....	25
II.- ANTECEDENTES	27
III.- JUSTIFICACIÓN	29

IV.-HIPÓTESIS.....	30
V.- OBJETIVOS.....	30
5.1 General.	30
5.2 Específicos.	30
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
6.1 Estrategia experimental general	31
6.2 Esquema de tratamiento.....	32
6.3 Cultivo amibiano.	33
6.4 Animales de experimentación.....	33
6.5 Administración de ciclopamina.	33
6.6 Administración de metronidazol.....	33
6.7 Procedimiento quirúrgico.	33
6.8 Obtención de muestras.....	34
6.9 Análisis histológico.	34
6.10 Tinción Tricrómica de Masson.	34
6.11 Microscopia electrónica de transmisión (MET).....	34
6.12 Análisis bioinformático.	35
6.13 Extracción de proteínas.	35
6.14 Análisis de proteínas por Western blot.	36
6.15 Inmunohistoquímica.....	36
6.16 Análisis estadístico.	37
VII.-RESULTADOS.	39
7.1 Estandarización de lesión.....	39
7.2 Análisis macroscópico.	40
7.3 Análisis macroscópico de los grupos tratados con ciclopamina y metronidazol. ..	41
7.4 Análisis histológico.	45

7.5 Producción de colágeno de tipo 1.....	47
7.6 Cambios ultraestructurales.	48
7.7 Análisis bioinformático.	50
7.8 Análisis de proteína.	54
7.8.1 Patrones de proteína.....	54
7.8.2 Western blot.	54
7.9 Inmunohistoquímica.....	59
VIII.- DISCUSIÓN.....	63
IX.- CONCLUSIONES.....	71
X.- PERSPECTIVAS.....	72
XI.- REFERENCIAS.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Distribución global de las formas clínicas de la amibiasis.	3
Figura 2. Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i>	5
Figura 3. Amibiasis intestinal humana.	8
Figura 4. Absceso hepático amibiano (AHA).....	9
Figura 5. Cinética de evolución del AHA.	10
Figura 6. Anatomía del hígado humano.	11
Figura 7. Representación esquemática del lobulillo clásico, lobulillo portal y acino hepático.....	13
Figura 8. Diagrama representativo de la organización celular del hígado.	14
Figura 9. Vía de señalización Hedgehog.....	24
Figura 10. Estrategia experimental general.....	31
Figura 11. Esquema de tratamiento.	32
Figura 12. Prueba de virulencia.....	39
Figura 13. Desarrollo del AHA.....	40
Figura 14. Datos macroscópicos D3.....	42
Figura 15. Datos macroscópicos D6.....	43

Figura 16. Análisis histológico de animales control D3 y D6.	45
Figura 17. Cambios histológicos durante el proceso regenerativo D3 y D6.	46
Figura 18. Identificación de fibras de colágeno tipo I, D3 y D6.	47
Figura 19. Análisis ultraestructural de controles.	48
Figura 20. Análisis ultraestructural de tratamientos.	49
Figura 21. Alineamientos entre inmunógenos y proteínas de interés analizadas por Clustal Omega.	52
Figura 22. Patrón de proteína.	54
Figura 23. Análisis de western blot.	55
Figura 24. Análisis estadístico D3 de DOR.	56
Figura 25. Análisis estadístico D6 de DOR.	57
Figura 26. Controles de inmunohistoquímica.	59
Figura 27. Análisis inmunohistoquímico D3.	60
Figura 28. Análisis inmunohistoquímico D6.	62

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1. Porcentaje de lesión de D3.	43
Gráfica 2. Porcentaje de lesión de D6.	44

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Números de acceso registrado en UniPROT para <i>M. auratus</i> y <i>H. sapiens</i> correspondiente a las proteínas de interés.	50
Tabla 2. Anticuerpos comerciales e inmunógenos de Santa Cruz Biotechnology.	51
Tabla 3. Valor expect y porcentajes de términos de BLAST para los alineamientos de inmunógenos y proteínas de interés en <i>M. auratus</i>	51
Tabla 4. Valores expect de alineamientos entre inmunógenos de las proteínas de interés y proteínas candidatas de <i>E. histolytica</i> HM-1 IMSS en AmoebaDB.	53

RESUMEN

La amebiasis es la enfermedad infecciosa causada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica*. Este parásito daña principalmente el intestino grueso, sin embargo, puede invadir órganos extraintestinales como el hígado en donde se produce el absceso hepático amibiano (AHA), siendo éste, la manifestación extraintestinal más común de la amibiasis invasiva, su desarrollo conlleva a una extensa necrosis del órgano acompañada por una respuesta inflamatoria exacerbada. Afortunadamente el manejo adecuado de la infección mediante la administración de tratamiento y la respuesta oportuna del órgano ante el daño da paso a la curación de la lesión con una óptima regeneración sin dejar tejido de cicatrización lo que no ocurre en otros tipos de daño generados por agentes infecciosos, como las hepatitis virales.

La vía de señalización Hedgehog (Hh) es un regulador crítico de la reparación de lesiones y curación de heridas en el humano. Específicamente, en el tejido hepático, esta vía de señalización se ha relacionado con la regeneración post- hepatectomía parcial, fibrosis y remodelación vascular; así como en la patogénesis de la cirrosis y el cáncer hepático. Sin embargo, la participación de esta vía de señalización en el proceso de regeneración hepática, derivada del tratamiento ante la presencia de un agente infeccioso no ha sido reportada.

Así, en este proyecto se analizó esta vía de señalización durante el tratamiento antimibiano con el fin de conocer el papel que desempeña durante el proceso de infección y su importancia en la recuperación hepática *ad integrum*.

Los resultados obtenidos a partir de la implementación del modelo de AHA incluyen: animales tratados con un inhibidor de la vía de señalización Hedgehog (ciclopamina) que presentaron un incremento en el porcentaje de las lesiones obtenidas, disminución en la presencia de hepatocitos de neoformación, una respuesta inflamatoria generalizada, distribución irregular de colágeno tipo I acompañada por la presencia de células de tipo fibroblástico y una disminución de células efectoras de dicha vía, así como una diferencia en la expresión de proteínas constituyentes de la vía de señalización.

Estos resultados constituyen la primera evidencia de asociación de la activación de la vía de señalización Hedgehog con el proceso de regeneración hepática en la amibiasis experimental.

ABSTRACT

Amebiasis is an infectious disease caused by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. This parasite mainly damages the large intestine; however, it can invade extraintestinal organs such as the liver where the amebic liver abscess (AHA) occurs, this being the most common extraintestinal manifestation of invasive amebiasis, its development leads to extensive necrosis of the organ accompanied by an exacerbated inflammatory response. Fortunately, the adequate management of the infection through the administration of treatment and the timely response of the organ to the damage leads to the healing of the lesion with optimal regeneration without leaving scar tissue, which does not occur in other types of damage generated by infectious agents, such as viral hepatitis.

The Hedgehog (Hh) signaling pathway is a critical regulator of injury repair and wound healing in humans. Specifically, in liver tissue, this signaling pathway has been implicated in post-partial hepatectomy regeneration, fibrosis, and vascular remodeling, as well as in the pathogenesis of cirrhosis and liver cancer. However, the participation of this signaling pathway in the process of hepatic regeneration, derived from treatment in the presence of an infectious agent, has not been reported.

Thus, in this project we analyzed this signaling pathway during anti-amebic treatment to know the role it plays during the infection process and its importance in *ad integrum* hepatic recovery.

The results obtained from the implementation of the AHA model, included: animals administered with an inhibitor of the mentioned pathway (cyclopamine) presented an increase in the percentage of lesions obtained, a decrease in the presence of neoforming hepatocytes, a generalized inflammatory response, irregular distribution of type I collagen accompanied by the presence of fibroblast-like cells and a decrease of effector cells of the pathway, as well as a difference in the expression of proteins constituting the signaling pathway.

These results constitute the first evidence of association of the activation of the Hedgehog signaling pathway with the process of liver regeneration in experimental amebiasis.

I.- INTRODUCCIÓN.

1.1 Amibiasis y epidemiología.

La amibiasis es la infección del humano causada por *Entamoeba histolytica*. Aunque hay una disminución importante de casos nuevos, esta patología representa un problema de salud pública importante en áreas comprometidas o de bajo desarrollo socioeconómico^{1,2}. Se presenta frecuentemente en regiones tropicales y subtropicales de América Central y América del Sur, África y Asia, mientras que India, Brasil, Colombia y México representan los países más afectados^{3,4}. En México con base en los datos proporcionados por la Dirección General de Epidemiología, en 2021, se registraron 113,195 casos nuevos de amibiasis intestinal y 468 casos de amibiasis hepática. La distribución global de las diferentes formas clínicas ha sido bien descrita; en nuestro país prevalece la amibiasis intestinal, hepática y pulmonar² (Figura 1).

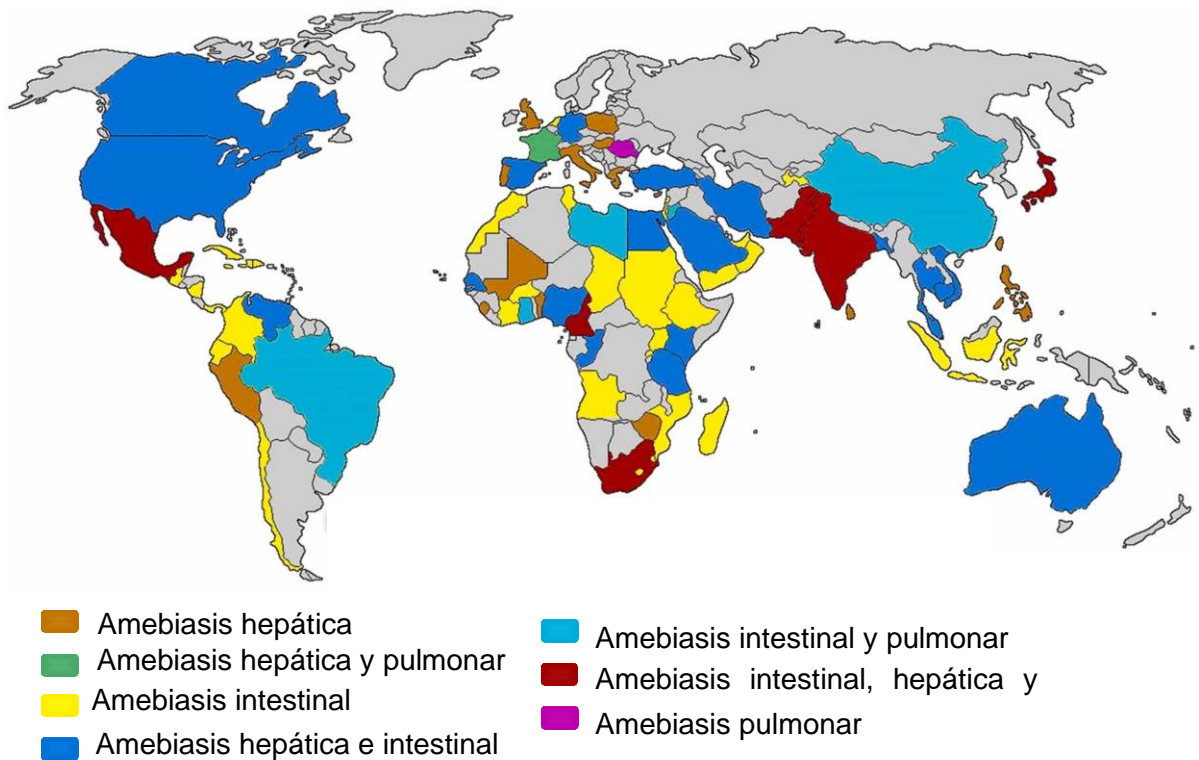


Figura 1. Distribución global de las formas clínicas de la amibiasis. En México prevalece la amibiasis hepática, intestinal y pulmonar. Mientras que en países como Perú y Mali prevalece únicamente la amibiasis hepática. Figura tomada y traducida al español de Nasrallah et al., 2022.
2

1.2 Ciclo de vida.

Los quistes infecciosos llegan al humano mediante la ingesta de agua o alimentos contaminados con heces provenientes de personas infectadas ⁵. Los quistes viajan por el tubo digestivo en donde son sometidos a la acción de diversas enzimas intestinales, ácidos biliares y gástricos que favorecen el reblandecimiento de su pared ^{6,7}, posteriormente pasan al íleon terminal en donde se realiza el desenquistamiento y producción de los trofozoítos en donde se establecen sin dañar la mucosa intestinal ⁷. En algunos casos el trofozoíto invade la mucosa intestinal produciendo colitis amebiana, caracterizada por la aparición de úlceras con restos de trofozoítos y bacterias en su contenido ^{8,9}. Esta infección puede evolucionar y causar lesiones más profundas que involucran los vasos sanguíneos, por lo que los trofozoítos presentes viajan a través de la sangre logrando su diseminación a órganos extraintestinales como cerebro, pulmón o hígado ^{7,10} (Figura 2). El hígado es el órgano extraintestinal más afectado por el parásito en donde se produce el absceso hepático amebiano (AHA) ¹¹.

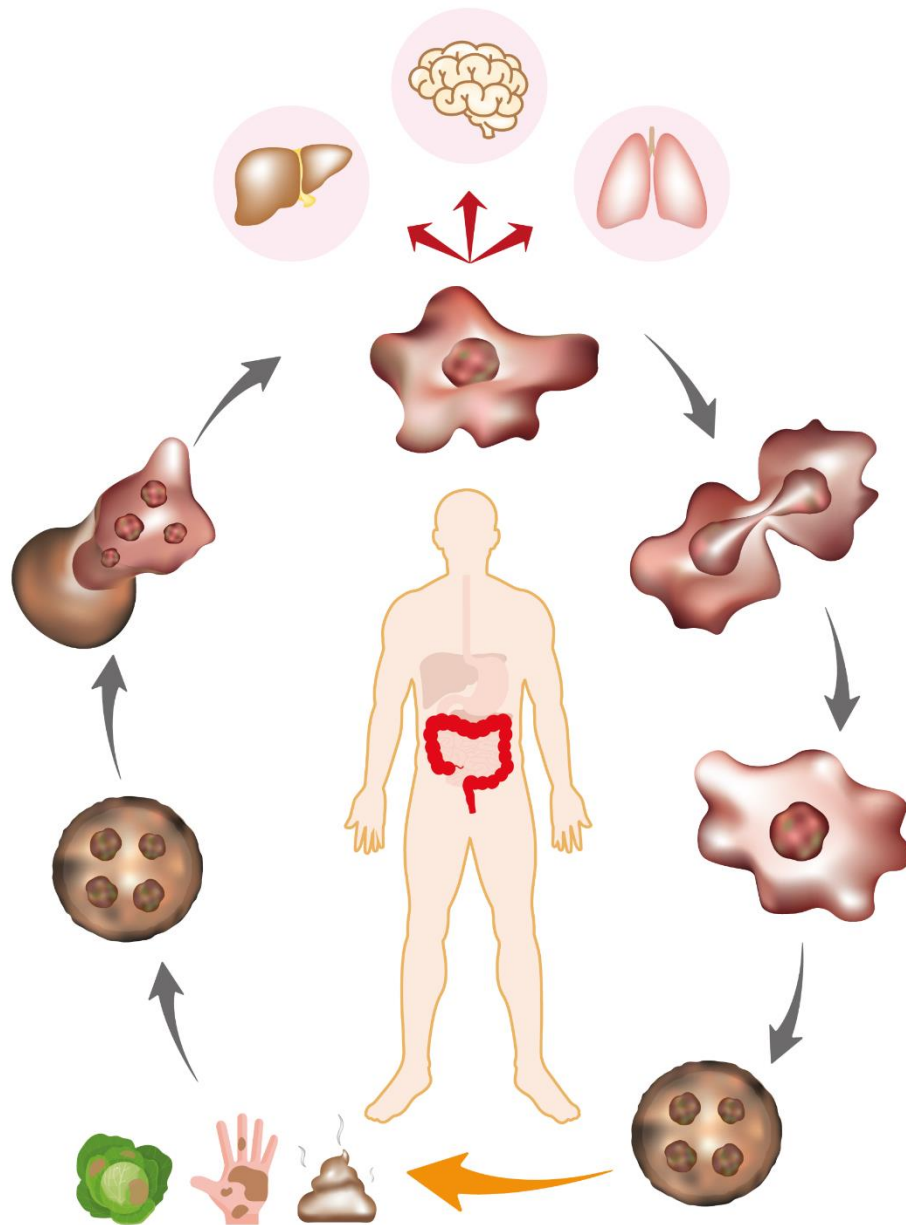


Figura 2. Ciclo biológico de *E. histolytica*. El ciclo comienza mediante ingesta de alimentos o agua contaminados con quistes provenientes de personas infectadas. En condiciones desfavorables los trofozoítos se redondean y se revisten con una membrana gruesa lo que le confiere resistencia al ser expulsado al medio externo. Conforme pasa el tiempo su núcleo se divide en dos y luego en cuatro y se recubre de una pared quística de quitina resistente para convertirse en un quiste maduro, estadio de resistencia e infección. Una vez en el intestino eclosiona la forma invasiva del parásito, los cuales se dividen por fisión binaria.

1.3 Patogenicidad.

La patogenicidad de este parásito ha sido descrita mediante análisis experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*, que aportan datos relevantes sobre moléculas involucradas en la capacidad del parásito de invadir a los tejidos del huésped. Entre estas moléculas se encuentran las adhesinas, proteasas y amebaporos que le confieren al trofozoíto una buena capacidad para invadir el epitelio, degradar la matriz extracelular y finalmente penetrar la mucosa intestinal ^{7,9,12}.

Una vez invadida la mucosa, los trofozoítos logran destruir la capa de mucina que cubre el epitelio intestinal mediante proteólisis, lo que implica la interacción o el contacto directo del parásito con la célula blanco ¹³.

La colonización del intestino se lleva a cabo mediante la adhesión de la lectina de unión a galactosa (lectina Gal/GalNac) ^{14,15} a las glicoproteínas presentes en la mucosa intestinal ¹⁶. Una vez adherido, el trofozoíto comienza a fagocitar generando cambios y reorganización del citoesqueleto, y la formación de pseudópodos encargados de la formación de un fagosoma ¹⁷.

Las proteasas de cisteína (enzimas proteolíticas de secreción) llevan a cabo la disrupción de la barrera epitelial y la degradación de componentes de la matriz extracelular, además de interferir en la respuesta inmune e inducir la apoptosis facilitando la invasión celular ^{18,19}. Las principales proteasas de cisteína presentes en *E. histolytica* son EhCP1, EhCP2 y EhCP5 exclusiva de este parásito ²⁰⁻²².

Otras enzimas proteolíticas importantes para la lisis celular son los amebaporos, pequeños péptidos localizados dentro de vesículas en el citoplasma ²³ que logran insertarse en la bicapa lipídica de la membrana celular formando uniones con fosfolípidos aniónicos. Este proceso da paso a la generación de oligómeros que se expanden y forman canales iónicos o microporos causando lisis celular ^{13,24,25}.

1.4 Diagnóstico y Tratamiento de la amibiasis.

Para el diagnóstico de la amibiasis intestinal se utilizan técnicas de microscopía en heces que permiten la identificación del parásito. El uso de técnicas de biología molecular ha sido muy útil para identificar antígenos específicos de la amiba ^{8,26,27}.

El diagnóstico para pacientes con AHA ha sido más complejo debido a la ausencia de síntomas al inicio de la infección ²⁷. Hasta ahora, los estudios de imagen como radiografía, ecografía y la tomografía axial computarizada TAC han sido muy útiles para aquellos pacientes con AHA avanzado ²⁶.

Hasta el momento no se cuenta con una vacuna eficaz para la amibiasis y no se cuenta con un fármaco que logre actuar contra las dos formas del parásito (quiste y trofozoíto). El fármaco de elección es el metronidazol, un antiparasitario del grupo de los nitroimidazoles. El esquema terapéutico se basa en la severidad de la infección, la dosis indicada en niños es de 5 mg/Kg cada 8 h por 7 días y en adultos de 7.5 mg/Kg cada 8 h por 7 días vía oral o por vía intravenosa cuando se trata de AHA ^{26,28,29}.

1.4.1 Mecanismo de acción del metronidazol.

El metronidazol posee la capacidad de penetrar membranas celulares, la molécula se activa en condiciones con baja tensión de oxígeno transformándose en un radical libre con alto nivel citotóxico, por lo que al interactuar con el DNA del parásito da como resultado la inhibición de su síntesis y su posterior degradación ³⁰.

En la infección con *E. histolytica* el grupo nitro del metronidazol se reduce mediante la acción de la ferredoxina producida en la degradación descarboxilación del piruvato, reacción catalizada por la enzima piruvato ferredoxina oxidorreductasa (PFO) ³¹. El portador de electrones ferredoxina se reduce y a su vez reduce el grupo 5-nitro del metronidazol produciendo nitrosoimidazol encargado de actuar de manera directa en la cadena de DNA del parásito desestabilizándola ^{32,33}, lo que causa la pérdida de la estructura helicoidal y la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos induciendo la muerte celular ³⁴⁻³⁶.

1.5 Patología.

Cuando el parásito logra invadir la pared del intestino, da origen a la colitis ulcerativa amibiana, en donde se producen lesiones ulcerosas que al evolucionar pueden llegar a ser muy profundas involucrando a los vasos sanguíneos mesentéricos que anatómicamente dan lugar a la circulación portal lo que permite al parásito diseminarse primero al hígado y de ahí alcanzar otros órganos extraintestinales como el cerebro y pulmón ³⁷.

1.5.1 Amibiasis intestinal.

La presencia de diarrea en la infección con este parásito es un factor importante debido a que los trofozoítos son expulsados en el contenido fecal; sin embargo, ante la ausencia de diarrea estos suelen enquistarse antes de abandonar el intestino. La amibiasis sintomática suele manifestarse en diferentes alteraciones como la colitis ulcerativa amibiana ⁷.

Muchas personas infectadas son portadoras asintomáticas del parásito; sin embargo, pueden seguir eliminando quistes en sus heces, contribuyendo así a la propagación de la infección. En aquellos que desarrollan síntomas, éstos pueden incluir diarrea, dolor abdominal, cólicos, flatulencia y malestar general. La diarrea puede contener sangre o moco en casos graves ^{2,38}

La colitis ulcerativa amibiana afecta el intestino grueso (ciego y colon sigmoides), causando lesiones en el revestimiento del colon y la formación de úlceras nodulares con borde edematoso y centros necróticos ^{12,39} (Figura 3). En su contenido hay presencia de trofozoítos y otros tipos celulares ^{9,40}. El progreso de la infección se acompaña de la producción de úlceras que pueden llegar a cubrir la mucosa del colon ³⁷.



Figura 3. Amibiasis intestinal humana. Se observan múltiples lesiones ulcerativas (flechas). Cortesía del Dr. Jesús Aguirre.

1.5.2 Amibiasis hepática.

El AHA es el resultado de la migración de trofozoítos desde el colon hasta el hígado, a través de la circulación portal ^{11,41}, los cuales atraviesan la barrera endotelial sinusoidal hasta alcanzar el parénquima hepático. Los principales síntomas en fase aguda incluyen fiebre, dolor en el hipocondrio derecho y sensibilidad hepática, mientras que en la fase crónica puede presentarse fiebre y hepatomegalia ⁴²⁻⁴⁴.

El típico AHA en el humano, se caracteriza por la sustitución del parénquima sano por material necrótico que se encuentra limitado por tejido hepático congestivo. El área necrótica se localiza en el centro del absceso y la superficie interna de la cavidad se compone de material sólido (Figura 4A), esta lesión se localiza comúnmente en el lóbulo derecho y su tamaño va de los 5 a los 15 cm de diámetro ⁴⁵, su rompimiento casusa su extensión al peritoneo y cavidad pleural ⁷ originando complicaciones que pueden llevar al paciente a la muerte.

Su estudio en el laboratorio se ha realizado en modelos animales (hámsteres). Esta lesión se caracteriza por presentarse en el lóbulo izquierdo y medio del órgano (daño avanzado), las lesiones son granulomatosas de color blanquecino y de consistencia cremosa (Figura 4B). El estudio en este modelo animal ha permitido determinar además de los cambios macroscópicos e histopatológicos los diversos mecanismos involucrados en la patogenicidad de este parásito en este importante órgano ^{11,46}.

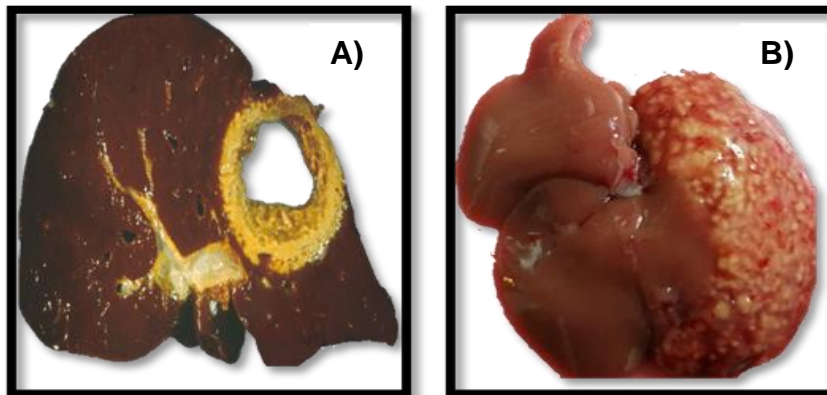


Figura 4. Absceso hepático amibiano (AHA). **A)** Humano. Se observa un AHA cavitario. Cortesía del Dr. Jesús Aguirre. **B)** Hámster. Se observa una lesión grumosa blanquecina en el lóbulo izquierdo resultado de una inoculación intrahepática con trofozoítos virulentos. Imagen obtenida en el laboratorio 2 del Dr. Víctor Tsutsumi.

El análisis microscópico sobre la evolución de la lesión hepática durante la formación del AHA experimental, ha sido clave para dilucidar algunos de los mecanismos involucrados, desde la etapa aguda, hasta el desarrollo de la necrosis hepática extensa. El estudio de esta cinética ha permitido identificar la llegada de los trofozoítos a los sinusoides hepáticos en tiempos muy cortos, hasta la aparición de focos inflamatorios y la formación de granulomas que van extendiéndose a lo largo del parénquima hepático conforme pasa el tiempo ¹¹ (Figura 5).

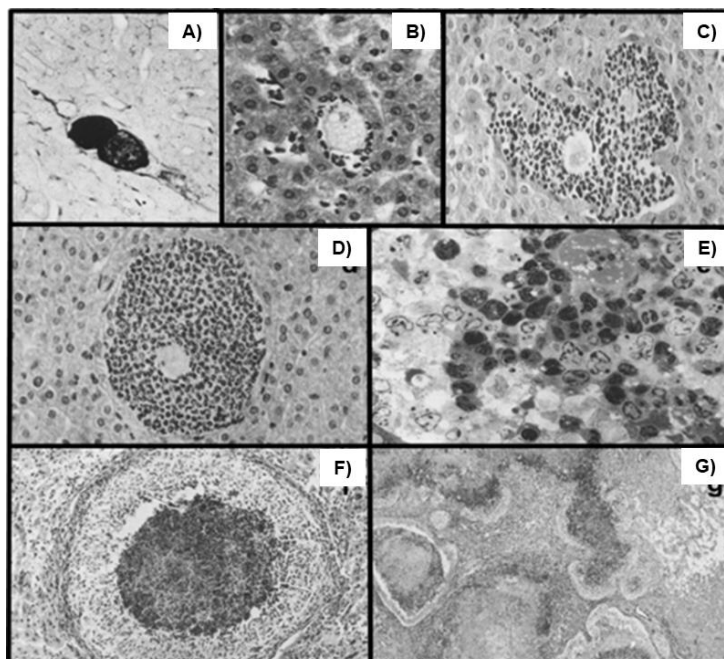


Figura 5. Cinética de evolución del AHA. **A)** 30 min post inoculación (pi): sinusoides dilatados con presencia de trofozoítos, **B)** 1 h pi: amibas dentro de los sinusoides rodeadas por PMN, **C)** 3 h pi: presencia de focos inflamatorios rodeando a los trofozoítos, **D y E)** 6 h pi: aumento en el infiltrado inflamatorio y lisis leucocitaria, **F)** 96 h pi: formación de granulomas que delimitan la lesión, **G)** 7 días pi: áreas necróticas asociadas con múltiples granulomas fusionados, formando bordes lobulados irregulares. Tsutsumi et al 1984¹¹.

1.6 Hígado.

El hígado representa el segundo órgano más grande del cuerpo humano, en el adulto constituye aproximadamente del 2 al 3% de su peso ⁴⁷. Entre sus funciones principales se encuentra el metabolismo de fármacos y xenobióticos, procesamiento de nutrientes, detoxificación y eliminación de diversos compuestos exógenos y endógenos ^{48,49}. Presenta una extraordinaria capacidad de regeneración cuando existe algún tipo de daño, ya sea por daño mecánico o por agentes químicos o patológicos ^{49,50}.

1.6.1 Anatomía.

En el humano, el hígado se ubica en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal, debajo del diafragma donde lo protege la caja torácica. Se encuentra cubierto por la capsula de Glisson (membrana epitelial con tejido conjuntivo) ^{47,48,51} se divide en lóbulos (derecho, caudado e izquierdo) por el ligamento falciforme ⁴⁷. El lóbulo derecho supone al 70% de la masa hepática, mientras que el lóbulo izquierdo y el caudado conforman el 30% restante ⁵². Estos lóbulos se dividen en ocho segmentos (Figura 6): lóbulo izquierdo (II, III y IV), lóbulo derecho (V, VIII, VI y VII) y lóbulo caudado (I) ^{52,53}.

Este órgano, recibe doble aporte sanguíneo, sangre arterial con elevada presión y composición de oxígeno y sangre venosa proveniente de la vena porta reducida en oxígeno/presión, enriquecida con nutrientes y factores de crecimiento ⁵⁴. Una vez dentro de los sinusoides esta sangre se mezcla y drena hacia el sistema venoso hepático y de ahí al sistema circulatorio ^{47,55}.

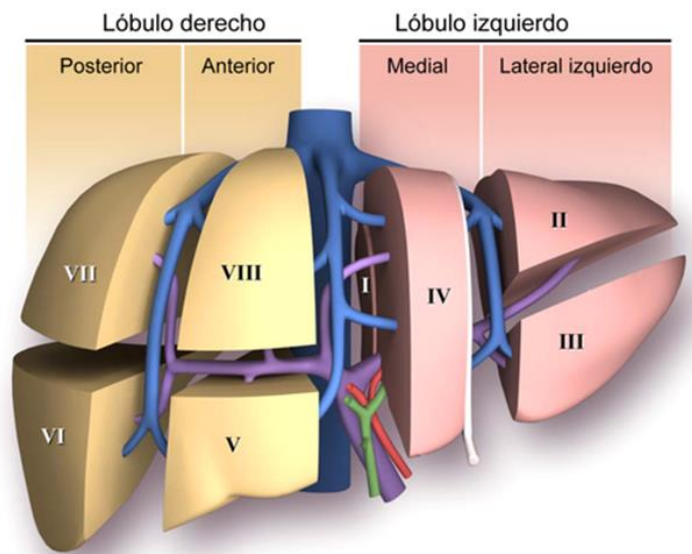


Figura 6. Anatomía del hígado humano. Lóbulos hepáticos constituidos por segmentos. Tomada de Lena Sibulesky 2013 ⁵³.

1.6.3 Unidad hepática funcional y estructural.

Este órgano anatómicamente lo forman millones de unidades repetidas llamadas lobulillos, clasificados por varias estructuras: lobulillo clásico y sus unidades funcionales, lobulillo portal y acino hepático ⁵⁶ (Figura 7).

El lobulillo hepático o clásico, representa la unidad estructural del hígado ⁵⁷. Tiene una forma hexagonal con una medida aproximada de 2 mm de longitud y 0.7 mm de diámetro ⁵⁸. En su centro se localiza la vena centrolobulillar, mientras que en sus seis ángulos se localizan las triadas portales conformadas por un conducto biliar, una rama de la arteria hepática y otra de la vena porta ⁵⁹. La rama de la vena porta de cada tríada se ramifica en venas de distribución en la periferia de cada lobulillo, su función principal es el transporte de sangre proveniente de las venas mesentéricas (superior e inferior); la arteria hepática se ramifica en los sinusoides proporcionando sangre arterial del tronco celiaco proveniente de la arteria aorta abdominal ^{51,60}.

El lobulillo se delimita por tejido conectivo interlobulillar y se compone por placas de 15 a 25 hepatocitos que se extienden desde la triada portal hasta la vena centrolobulillar, se encuentran revestidos por los sinusoides en donde la mezcla de sangre administrada tiene acceso a las células epiteliales del parénquima hepático ⁶¹⁻⁶³.

El acino hepático representa la unidad funcional del hígado y se encarga de la irrigación sanguínea hepática. Se representa por un área romboidal de hepatocitos, su centro lo constituye una triada portal y sus extremos dos venas centrales ⁵⁷. Esta estructura está clasificada en tres zonas contiguas correspondientes a la distancia del suministro de la sangre arterial; zona periportal (zona 1), zona media (zona 2) y zona pericentral (zona 3) ⁵⁸, que reciben un aporte de oxígeno y nutrientes de forma diferencial ⁶⁴.

A estas zonas las constituyen hepatocitos de dos poblaciones distintas, aunque morfológicamente esta diferencia no es evidente, su diferencia radica en la expresión de genes y función metabólica ⁶². En la zona 1 se encuentran hepatocitos involucrados en la gluconeogénesis, producción de urea y la β -oxidación de los ácidos grasos; en la zona 3 los hepatocitos residentes participan en procesos como la glucólisis, eliminación de nitrógeno y lipogénesis ⁶⁵.

Finalmente, en el lobulillo portal se lleva a cabo la secreción de bilis. Esta estructura ha sido representada por un área hipotética de forma triangular, su eje corresponde a una

triada portal y sus bordes externos se encuentran representados por líneas imaginarias trazadas entre tres venas centrolobulillares más cercanas a la triada portal, por lo que toda la bilis sintetizada por los hepatocitos dentro del lobulillo portal es drenada a través del conducto biliar común ⁶⁶.

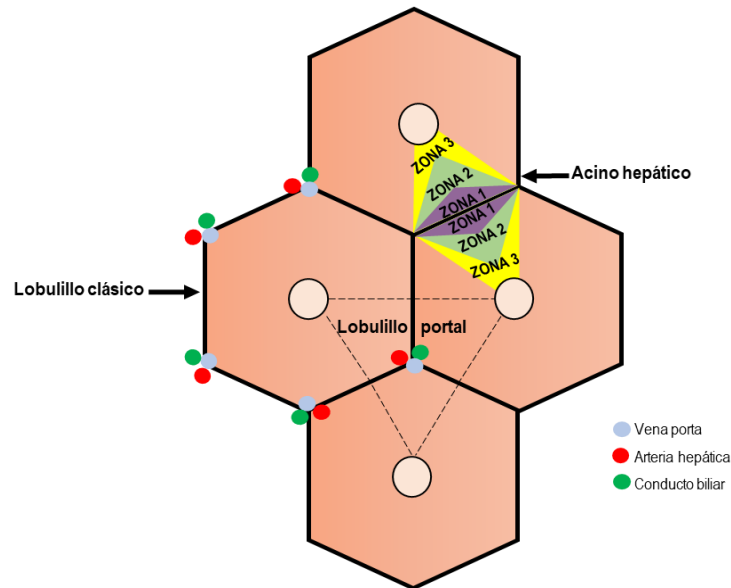


Figura 7. Representación esquemática del lobulillo clásico, lobulillo portal y acino hepático.

1.6.4 Histología.

El hígado se compone de diversas poblaciones celulares, incluyendo células parenquimatosas (hepatocitos) las cuales representan la base estructural del órgano, así como una variedad de células residentes no parenquimatosas (colangiocitos, células estelares, células de Kupffer, células endoteliales sinusoidales y células del sistema inmune) indispensables en diversas funciones, así como para el mantenimiento de la homeostasis del órgano ^{51,67-69} (Figura 8).

Todos estos tipos celulares se localizan en diferentes áreas del hígado, las células de Kupffer se ubican en los sinusoides mientras que las estelares se localizan en el espacio de Disse ⁵¹. Los sinusoides hepáticos están encargados de separar la placa de células que conforman el lobulillo hepático. El revestimiento de los hepatocitos con los sinusoides, se compone de una capa discontinua de células endoteliales fenestradas permitiendo el intercambio de materiales ^{51,60}.

Entre las células endoteliales y hepáticas existen espacios tisulares denominados perisinusoidales o de Disse correspondientes a áreas en donde los hepatocitos mantienen contacto con el espacio sinusoidal, mientras actúan como barrera entre células endoteliales y hepatocitos; además permiten el intercambio metabólico entre hepatocitos y plasma ⁵¹.

Este órgano alberga un grupo de células progenitoras residentes en los conductos y canales de Hering que intervienen en el proceso de regeneración como respuesta ante algún tipo de daño ^{70,71}.

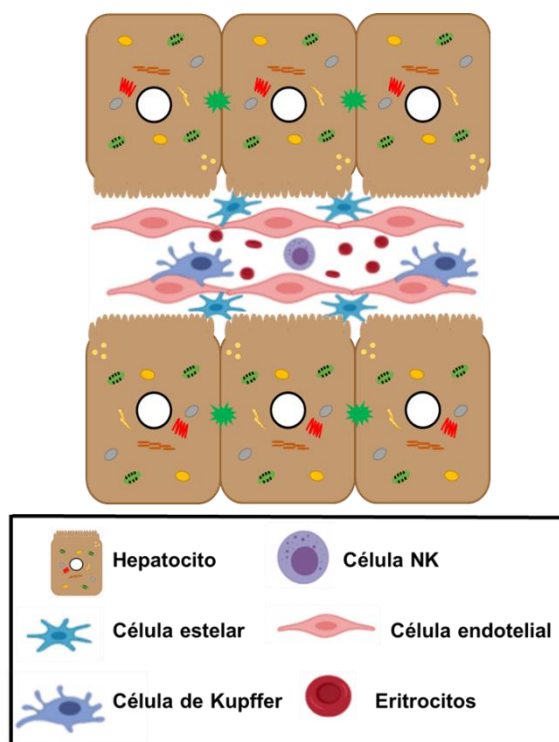


Figura 8. Diagrama representativo de la organización celular del hígado.

1.6.4.1 Hepatocitos.

Los hepatocitos representan el mayor porcentaje de la población celular total y volumen total del órgano. Poseen un tamaño entre 15 y 25 μm ⁵⁸, participan en el metabolismo de macromoléculas; así como en la síntesis del factor de coagulación y secreción biliar ⁵⁷.

Poseen una forma poligonal, forman series de láminas irregulares, sus superficies expuestas se encuentran recubiertas de microvellosidades cortas ⁶⁵, contienen un núcleo esférico y en su citoplasma se localizan organelos como retículo endoplásmico liso y

rugoso, mitocondrias, peroxisomas, lisosomas, complejo de Golgi, microtúbulos y microfilamentos, así como múltiples gránulos densos de glucógeno ^{51,69}.

Entre sus funciones se encuentra la organización del intercambio de macromoléculas del interior al exterior ⁶³, lo que se logra gracias a su polarización estructural y funcional clasificado en tres dominios de membrana distintos; sinusoidal (basal), lateral y canalicular (apical) ⁶⁹ separados por uniones estrechas presentes en los dominios laterales encargadas de la adhesión celular y los dominios basales que llevan a cabo la interacción con la matriz extracelular ^{63,69,72}.

1.6.4.2 Colangiocitos.

Los colangiocitos o células epiteliales biliares, comprenden un pequeño porcentaje de la masa hepática, son esenciales para la formación de componentes biliares y transporte de bilis dentro del duodeno ⁷³. Llevan a cabo la secreción de agua, bicarbonato y cationes por medio de la bilis, además de participar en la respuesta inmune como presentadores de antígeno ⁵⁷. Estas células recubren una compleja red tridimensional de conductos (tracto biliar) que comienza en los canaliculos, seguido de los conductos biliares, y termina en el conducto biliar común ^{57,73}.

1.6.4.3 Sinusoides.

Los sinusoides hepáticos son capilares especializados en donde se realiza el intercambio transvascular entre la sangre y los hepatocitos ⁷⁴. Su estructura es única, sus paredes se componen de células endoteliales y perisinusoidales entre las que se encuentran células de Kupffer, células estelares y células de Pit ⁷⁵. Las células endoteliales que tapizan la superficie del sinusoides poseen poros llamados fenestras que permiten la selección estérica de la transferencia de moléculas grandes, plasma y proteínas desde el espacio sinusoidal al parénquima hepático ⁷⁶. Las células sinusoidales participan en un sistema de defensa coordinado en el que las células de Kupffer son las que tienen la misión de fagocitar y presentar antígenos. Las células estelares son importantes en el metabolismo del colágeno, mientras que las células de Pit muestran actividad de células asesinas naturales (NK) ^{57,77}.

1.6.4.4 Células de Kupffer.

Las células de Kupffer o macrófagos residentes del hígado representan del 2 al 5% de la masa celular del hígado, y se encuentran adheridas al endotelio en la superficie dirigida

a la luz intestinal ^{57,77}. Tienen prolongaciones que se extienden hacia el espacio de Disse con la finalidad de remover cuerpos o moléculas extrañas segundos después de que la partícula se ha puesto en contacto con la superficie celular ^{78,79}.

Una vez activadas, estas células logran producir una cantidad importante de quimiocinas y citocinas fundamentales en la reacción de fase aguda del hígado coordinando las respuestas moleculares de todas las células del parénquima ante una lesión ⁵¹.

1.6.4.5 Células estelares.

Las células estelares se localizan en el espacio de Disse, presentan contacto físico con los hepatocitos. Representan alrededor del 1.5% del total del volumen celular y entre el 5 al 8% del número de células ^{57,80}.

En condiciones fisiológicas estas células producen mediadores reguladores del crecimiento, citocinas pro y antiapoptóticas así como quimiocinas encargadas de reclutar células inflamatorias e inmunes ⁸⁰, almacenan del 50-80% de vitamina A en forma de palmitato de retinol en las gotas de lípidos presentes en su citoplasma; mientras que en condiciones patológicas éstas se activan en respuesta a la reparación del tejido, su transdiferenciación a miofibroblastos incluye la pérdida progresiva de vitamina A, síntesis de α -SMA (actina de músculo liso alfa) ⁸⁰, mayor contractilidad y una mayor producción de componentes de matriz extracelular como colágeno, proteoglicano, glucosaminoglicano y glucoproteínas adhesivas ⁸¹.

1.6.4.6 Células de Pit.

Las células de Pit también conocidas como células asesinas naturales (NK) o linfocitos granulares, representan el 1% de la masa celular del hígado, y forman parte del mecanismo de vigilancia inmunitaria en los sinusoides hepáticos ⁵⁷. Usan el ligando FasL Fas (FasL) y la vía de perforina/granzima para matar las células objetivo mediante la activación de la caspasa 8 la cual juega un papel importante en la ejecución de la apoptosis, mientras que la perforina y la granzima B son liberadas por exocitosis ⁶⁹.

1.7 Regeneración hepática.

El hígado es un órgano con una importante e interesante capacidad regenerativa, que permite la recuperación de la masa y función normal de este órgano ⁸². Esta característica se describió como una adaptación evolutiva por sus funciones, como la desintoxicación, por lo que, en respuesta a cualquier lesión que involucre la pérdida de sus células, se

activa inmediatamente toda la maquinaria necesaria para proliferar y con ello recuperar el tejido dañado ⁸²⁻⁸⁵.

Este órgano modula su masa respecto a sus necesidades funcionales, prolifera en escasez funcional o sufre apoptosis en casos de exceso; en ambas situaciones se remodela para preservar su arquitectura y organización histológica ^{83,85} con la única finalidad de restaurar cualquier masa perdida y ajustar su tamaño óptimo, al tiempo que proporciona un apoyo total para la homeostasis del cuerpo durante todo el proceso regenerativo ⁸³.

Se ha descrito que el proceso de regeneración en respuesta a una lesión o pérdida de una parte del órgano involucra únicamente la replicación de hepatocitos maduros ^{83,84}. Sin embargo, la expresión de algunos marcadores de progenitores hepáticos durante el proceso de regeneración en lesiones hepáticas crónicas sugiere su posible participación como respuesta a este tipo de daño ⁸⁶.

1.7.1 Modelos de regeneración hepática.

Para describir e investigar la regeneración del hígado se han utilizado distintos modelos animales. La hepatectomía parcial (HP) se considera el modelo más estudiado de este proceso, que implica la extirpación quirúrgica de 2/3 partes del órgano ^{50,87}. Después de la resección, se inicia una respuesta única, en donde los hepatocitos ingresan al ciclo celular para proliferar y compensar la pérdida de tejido hepático ⁸⁸.

Además del modelo quirúrgico de HP, el hígado ha mostrado tener una alta capacidad regenerativa después de una lesión inducida por sustancias químicas. En este modelo se producen lesiones necróticas que simulan ciertas enfermedades hepáticas ^{49,52}. Entre algunos compuestos hepatotóxicos empleados en el proceso de regeneración se encuentran: tetracloruro de carbono, empleado para inducir lesiones hepáticas agudas, al descomponerse este químico conduce a la formación de radicales reactivos y tóxicos, desencadenando daño al DNA, proteínas, lípidos y carbohidratos en los hepatocitos causando su necrosis ^{49,52,89}. La D-galactosamina causa insuficiencia hepática aguda, alterando el sistema metabólico del hígado conduciendo a la inhibición de la síntesis de RNA y proteínas ^{52,89}. El acetaminofeno o paracetamol, es un medicamento antipirético y analgésico, su sobredosis presenta un efecto tóxico manifestado como insuficiencia

hepática aguda fulminante, lleva a la formación de radicales libres y citocinas en conjunto con la activación de células estelares ^{52,89,90}.

1.7.2 Proceso de regeneración hepática.

Los mecanismos moleculares asociados a la regeneración hepática se han estudiado principalmente en modelos animales principalmente en roedores tras una hepatectomía parcial. El mecanismo molecular de este proceso de regeneración se desarrolla en tres etapas (iniciación, proliferación y término) ^{88,91} reguladas y unidas entre sí por diversas vías de señalización que aseguran la regeneración hepática óptima después de una HP ^{52,88}.

1.7.2.1 Inicio del proceso de regeneración.

Esta fase comienza temprano después de la HP y la median citocinas y factores de crecimiento, que modifican la expresión de genes para preparar a los hepatocitos para su entrada al ciclo celular ^{52,83}.

En los primeros minutos la presión arterial portal aumenta provocando estrés mecánico sobre las células endoteliales mediante el flujo sanguíneo, lo que ocasiona un aumento del activador de plasminógeno serina proteasa, encargado de la catálisis del plasminógeno a plasmina, cuya función es descomponer el fibrinógeno en productos de degradación ⁵². Además, participa en la transformación de metaloproteinasas pro-matriz (pro-MMPs) en metaloproteinasas activas ⁹² lo que favorece la remodelación de la matriz extracelular (MEC) y en consecuencia la liberación de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) ^{89,93}.

La respuesta inmune innata juega un papel importante en este proceso con la producción de componentes como proteínas del complemento (C3a y C5a), que una vez unidos a sus receptores localizados en las células de Kupffer estimulan la vía del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) para su posterior activación que concluye con la transcripción del factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) y ciclina D1 ^{83,88,89,94}.

Por su parte el TNF- α estimula la activación de la proteína cinasa activada por estrés (SAPK o JNK) en hepatocitos, que induce la transcripción de genes diana como la proteína ciclina dependiente de cinasa 1 (CDK1) encargada de inducir la proliferación de los hepatocitos dentro de las primeras horas post-HP ^{52,84} y activa algunas vías de

señalización que regulan el proceso de regeneración como Wnt/ β catenina encargada de la transcripción de genes que promueven la proliferación de hepatocitos ⁹⁵.

Otro componente importante para la preparación de la entrada de los hepatocitos al proceso de proliferación es la IL-6, encargada de mediar la respuesta aguda e inducir funciones citoprotectoras y mitogénicas ⁹⁶. Al unirse a su receptor se activa la cascada de señalización lo que da lugar a la expresión de múltiples genes importantes para la proliferación como ciclina D1 ^{52,83}.

Adicionalmente, en el proceso de regeneración se han caracterizado otras vías de señalización que participan en esta primera etapa, entre las que se encuentran: vía Notch, encargada de la transcripción de genes involucrados en proliferación, diferenciación y revascularización ^{52,97}, vía Hippo encargada de la transcripción de genes involucrados en procesos de proliferación ^{52,87} y vía Hedgehog, crítica para la recuperación normal del tejido después de una Hp, induciendo la transcripción de genes involucrados en proliferación, supervivencia y diferenciación ⁸⁷ lo que se discutirá más adelante.

1.7.2.2 Proliferación celular.

Durante la regeneración hepática, la red de citocinas y factores de crecimiento median la entrada de los hepatocitos inactivos al ciclo celular ⁵². Las células se someten a hipertrofia celular seguida de proliferación celular, en donde el ciclo celular representa el mecanismo clave de la proliferación ⁹⁸.

El ciclo celular se considera como una serie de fenómenos en los que se sintetiza el material genético que luego se distribuirá a las células hijas ⁸⁸. Este se encuentra clasificado en dos procesos básicos, la mitosis y la interfase.

La interfase se encuentra constituida por tres fases organizadas: G1, S, G2. En la fase G1, se activa la síntesis de RNA y proteínas, la célula aumenta su tamaño y el número de organelos, durante la fase G2 se lleva a cabo la síntesis de proteínas requeridas para la división celular; en la fase S el DNA se replica y los cromosomas se duplican ^{99,100}.

Al término de la interfase la célula entra en mitosis dando origen a la división de las células somáticas, en donde se producirán dos células hijas cromosómicamente idénticas a la original. Este proceso comprende seis etapas, profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis ⁹⁹.

El ciclo celular se encuentra regulado por tres puntos de control diferentes encargados de asegurar que las fases se completen correctamente sin errores: punto de control G1-S, G2-M y M. Las células inactivas como los hepatocitos maduros residen en una fase no replicativa reversible denominada G0 o quiescente ¹⁰⁰.

Cuando la célula hepática pasa de la fase G1 a la S, la ciclina A reemplaza a la ciclina E y se asocia con el complejo A-CDK2 que produce CDK2, encargada de controlar los eventos que ocurren durante la fase S. En la fase S tardía, CDK1 se combina con la ciclina A, formando el complejo A-CDK1 que contribuye al transporte de la célula a la fase G2 ^{52,100}. Después de la transición celular de la fase S a la fase G2, la ciclina A permanece en asociación con CDK1 controlando el crecimiento y la transcripción genética durante G2. En la fase G2 tardía, la ciclina A se sustituye por la ciclina B para formar el complejo B-CDK1, además de participar en la estimulación y formación del complejo B-CDK1 ^{52,101}, este complejo juega un papel crucial en el movimiento del hepatocito a través del punto de control G2-M hacia la fase M, induciendo la expresión del gen de supervivencia llamado survivina que regula las diferentes etapas de la mitosis y la citocinesis ^{52,89,100}.

El aumento de la regeneración hepática se rige por numerosos factores de crecimiento los cuales poseen efectos mitógenos, tróficos y antiapoptóticos encargados de preparar las células hepáticas y permitir su acceso al ciclo celular para proliferar y restaurar el órgano. Entre estos factores se encuentra HGF producido por células estelares y actúa de forma paracrina y endocrina en los hepatocitos, la señalización de HGF/c-met da como resultado la activación de ERK1/2 conduciendo a la proliferación de hepatocitos, además de regular cinasas involucradas en supervivencia celular, específicamente PI3K y AKT ¹⁰²; EGF es importante para la curación de heridas encargado de regular la inflamación y estimular el crecimiento de las células epiteliales, además de activar respuestas genéticas secundarias o retardadas para estimular la síntesis de DNA y proliferación celular ^{88,103} y VEGF es un regulador clave de la angiogénesis, al unirse a su receptor específico presente en la superficie de las células endoteliales de los vasos sanguíneos estimula a las células para liberar la enzima proteolítica MMP la cual degrada fibras de colágeno de la membrana basal y por lo tanto, permitirá a las células endoteliales escapar de los vasos sanguíneos ^{52,88}.

La proliferación del parénquima hepático inicia en las zonas periportales para posteriormente desplazarse a las áreas perivenosas, a partir de los cinco días posteriores a la resección quirúrgica, el hígado ha alcanzado más de la mitad de las células perdidas, incluyendo células parenquimatosas y no parenquimatosas ^{52,104}. De esta manera, el proceso regenerativo finaliza a los 7 días post-Hp en donde el segmento hepático remanente recupera tanto el número de células como el peso original del hígado ^{49,84}.

1.7.2.3 Terminación de la regeneración.

La regeneración cesa con la restauración de la masa hepática inicial necesaria para realizar las funciones hepáticas normales ⁸³. Esta fase se encuentra mediada por citocinas antiinflamatorias, y proapoptóticas, proteínas supresoras de la señalización de citocinas (SOCS-3) y especialmente el TGF- β ^{84,88}.

Los factores antiproliferativos mejor conocidos en el hígado son el TGF- β y otros miembros como la activina. El TGF- β es producido principalmente por las células estelares y la activación de su expresión conduce a la fibrosis hepática y a la apoptosis ¹⁰⁵, esta proteína se induce durante la regeneración, activando mediante fosforilación a reguladores de la transcripción conocidos como proteínas SMAD ¹⁰⁶.

La activina A participa como inductor de citocinas proinflamatorias, además de participar en la activación intracelular de SMAD de forma similar que TGF- β , interviene en la diferenciación celular, induce la detención del crecimiento, la apoptosis y participa en la cicatrización de heridas durante el proceso de regeneración ^{107,108}.

1.8 Vía de señalización Hedgehog.

La vía de señalización Hedgehog (Hh) regula diversas decisiones del destino celular, incluida la proliferación, apoptosis, migración y diferenciación, además participa en la morfogénesis de los tejidos durante el desarrollo fetal; en el adulto juega un papel importante en la cicatrización y la regeneración en diversos órganos por lesiones mecánicas y patológicas ¹⁰⁹. En el hígado adulto los efectos de su activación incluyen la regeneración, fibrosis y remodelación vascular, mientras que su activación aberrante se ha relacionado principalmente en la patogénesis de la cirrosis y el cáncer hepático ¹¹⁰, su inhibición en la etapa embrionaria da origen a malformaciones craneofaciales ¹¹¹.

La participación de esta vía en procesos neoplásicos ha sido demostrada mediante estudios sobre el desarrollo de carcinomas de células basales, meduloblastomas, cáncer

de páncreas y cáncer de ovario, ya que al utilizar inhibidores específicos de Hh estos procesos pueden revertirse en modelos *in vivo*, mientras que en modelos *in vitro* actúa disminuyendo su proliferación e induciendo apoptosis ¹¹².

1.8.1 Señalización Hedgehog en la regeneración hepática.

La lesión hepática crónica en adultos aumenta la producción de ligandos Hh, encargados de orquestar diversos aspectos de la construcción de tejidos durante la embriogénesis. Su reactivación se produce en diversos tipos de lesiones hepáticas crónicas, dando como resultado la expansión de poblaciones progenitoras, acumulación de células inflamatorias, fibrogénesis y remodelación vascular ^{113,114}.

Diversos factores de crecimiento, citocinas y ciertos tipos de estrés celular estimulan a las células productoras de ligandos Hh que en el caso de la regeneración representa un efecto regulador de proliferación. La capacidad del hígado adulto para regenerar permite recuperar funciones y la masa normal específica del tejido en semanas tras una Hp, mientras que esta regeneración en modelos animales el parénquima hepático logra reconstruirse en masa dentro de los 7 a 10 días post-Hp ¹¹⁵.

Una vez presentes los ligandos Hh, promueven la expresión de quimiocinas en las células epiteliales biliares, estimulan la activación de células estelares y la producción de factores como IGF-1, PDGF, VEGF, HGF y TGF- β , fundamentales en el proceso de regeneración, estimulación de linfocitos productores de factores fibrogénicos (IL-4 e IL-3) y finalmente estabilizan la actividad del factor de transcripción Gli encargado de dar paso a la transcripción de genes diana involucrados en la proliferación, apoptosis, supresión inmune y diferenciación ^{82,113,116}.

Se ha demostrado que al inhibir la vía de señalización en ratones después de una Hp, se reduce significativamente la acumulación de progenitores hepáticos, se inhibe la proliferación de hepatocitos y colangiocitos, así como la remodelación de la matriz extracelular, dando como resultado el bloqueo de la regeneración del órgano y como consecuencia la muerte de los animales 72 h después de la cirugía ⁸².

En general, los ligandos Hh funcionan como factores tróficos y promueven la viabilidad de las células, lo cual mejora el crecimiento de poblaciones de progenitores hepáticos, desencadena la remodelación del tejido y promueve la regeneración del hígado. Además, estimulan diversos tipos celulares para adquirir un estado menos epitelial y más

mesenquimatoso en el que dichas células generan mediadores inflamatorios y tejido cicatricial. Por lo tanto, la actividad excesiva o persistente de la vía Hh afecta la regeneración exitosa del tejido hepático dañado contribuyendo a la patogénesis de la fibrosis hepática por lo que puede derivar en su progresión a cirrosis y en algunos casos a cáncer hepatocelular ^{82,113,116,117}.

1.8.2 Síntesis y procesamiento de Hedgehog.

El ligando Hedgehog (hh) fue identificado inicialmente en el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*, y gran parte del conocimiento acerca del funcionamiento de la vía ha surgido de los estudios en este organismo ¹¹³. Hasta la fecha se ha logrado identificar que los mamíferos poseen tres proteínas homólogas, entre las cuales se encuentran Sonic (Shh), Desert (Dhh) e Indian (Ihh) que forman parte del grupo de ligandos extracelulares producidos por diferentes células durante la formación de órganos en el desarrollo embrionario y en el adulto durante la regeneración y curación de heridas ¹¹⁸. La proteína Hh se sintetiza como un precursor de 45 kDa, sufre una hidrólisis intramolecular catalizada por su porción C-terminal lo que origina dos fragmentos peptídicos. El péptido C-terminal de 26 kDa carente de actividad biológica y el fragmento N-terminal de 19 kDa que posee toda la actividad biológica ¹¹⁹. Posteriormente se originan dos uniones covalentes, una al extremo C-terminal con una molécula de colesterol y una al extremo N-terminal con una molécula de ácido palmítico lo cual permite la secreción de las proteínas Hh al medio extracelular ¹⁰⁹. Se sabe que tanto en *Drosophila* como en mamíferos, la secreción de ligandos maduros requiere de una proteína integral de membrana con doce dominios transmembranales denominado Dispatched (Disp) para facilitar su salida al medio extracelular.

1.8.3 Recepción y transducción de señal.

El receptor de Hh es Patched (Ptc), el cual es una proteína integral de membrana con doce dominios transmembranales por lo que el primer paso en el proceso de señalización es la unión física de Hh con Ptc lo que además de activar la vía, causa la internalización por endocitosis del complejo Hh-Ptc y su posterior degradación lisosomal ^{120,121}. En los vertebrados se han identificado reguladores positivos y negativos de la vía de señalización, un modulador negativo de la señal corresponde a Hip, el cual posee la capacidad de unirse a Hh. Un modulador positivo de la señal es Gas1, una proteína de

superficie con anclaje glicosilfosfatidilinositol, lo que aumenta la afinidad de Hh por Ptc 122.

Este sistema de transducción de señales involucra a Smoothened (Smo), una proteína con siete dominios transmembranales, que en ausencia del ligando es reprimida por Ptc de manera catalítica ^{123,124}. La unión de Hh a Ptc inicia su internalización y libera a Smo mediante vesículas intracelulares que se desplazan acumulando a este receptor en la superficie celular activando la cascada de señalización ^{118,125,126}. El efecto río abajo de esta vía de señalización está mediado por el factor de transcripción Gli (190 kDa) que, en ausencia de la señal, es fosforilado por tres proteínas serina-treonina cinasa PKA, GSK3 y CK1. Este procesamiento ocurre debido a la formación del complejo multiprotéico de unión a microtúbulos que incluye a Fused (Fu) y a la proteína de armazón Costal2 (Co2) la cual se asocia de forma estable con Gli, posteriormente Gli es ubiquitinizado y cortado proteolíticamente en el proteosoma, originando una forma corta de 75-83 kDa que corresponde a su extremo N-terminal, el cual se transloca al núcleo y reprime la transcripción de los genes diana involucrados en apoptosis, diferenciación, proliferación y supervivencia celular (Figura 9A). Por otra parte, la unión de Hh a Ptc inicia su internalización y libera a Smo ¹²⁷ lo que resulta en la inhibición de la proteólisis de Gli, por lo que este se transloca al núcleo donde actúa como activador transcripcional de los genes diana de Hh (Figura 9B).

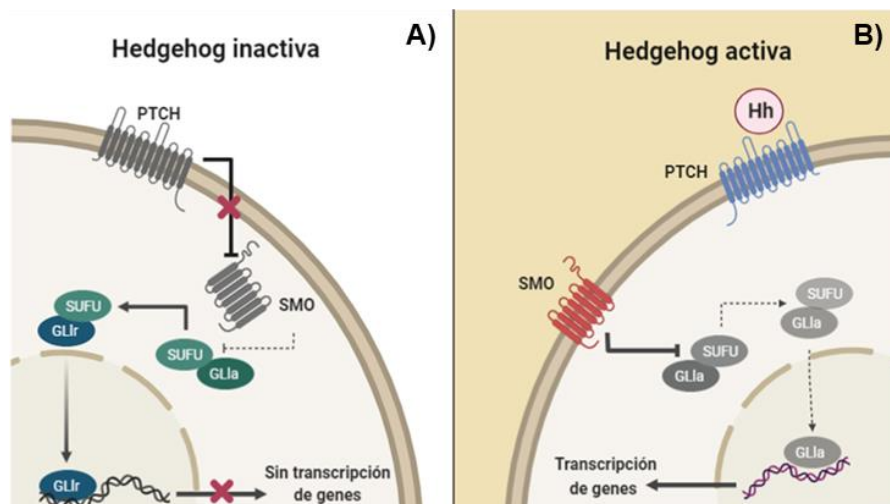


Figura 9. Vía de señalización Hedgehog. a) Vía inactiva; permanece inactiva cuando no hay unión del ligando Hh al receptor Ptc, lo que evita la transcripción de genes diana. b) Vía activa; se activa en presencia de ligandos Hedgehog, lo que permite la translocación del receptor Smo a la superficie celular, permitiendo la activación del factor de transcripción Gli y en consecuencia la transcripción de genes diana. Imagen creada en la plataforma en línea BioRender <https://biorender.com/>.

1.8.4 Ciclopamina.

1.8.4.1 Historia.

Veratrum californicum, lirio de la familia de las Melanthiaceae, es una planta extremadamente venenosa nativa del hemisferio norte, abundante en la zona montañosa del oeste de los Estados Unidos. A mediados del siglo XX en el estado de Idaho nacieron crías de ovejas con graves defectos craneofaciales provenientes de madres que en tiempos de sequía se trasladaban a tierras más altas en las montañas y pastaban *V. californicum*. Debido a la gravedad de la situación los pastores de estas ovejas recurrieron al Departamento de Agricultura en donde Lynn F. James, registró todas y cada una de las condiciones del medio en donde se encontraban estas ovejas y se dio cuenta que el principal alimento era esta planta; al analizarla Richard F. Keeler del laboratorio de Investigación de Plantas Venenosas, descubrió la conexión entre el consumo de esta planta y la aparición de alteraciones craneofaciales en los rebaños, ya que al alimentar ovejas preñadas con preparaciones de *V. californicum* las malformaciones eran evidentes desde los primeros 14 días de gestación ^{128,129}. A partir de estos estudios se logró demostrar que esta planta es una fuente de ciclopamina, un alcaloide natural que al ser ingerido origina fetos ciclopes y holoprosencefálicos en el ganado que ha consumido dicha planta, este efecto se debe a que este metabolito bloquea la vía de señalización Hh mediante su unión al receptor Smo ¹¹¹.

1.8.4.2 Características generales de la ciclopamina.

El alcaloide esteroideo ciclopamina, presenta tanto actividad teratogénica como antitumoral derivada de su capacidad para bloquear las respuestas celulares a la activación de la vía de señalización Hh.

Su extracción y aislamiento se realizó a partir de la planta *V. californicum*, con la finalidad de conocer su capacidad en la inducción de ciclopía en embriones. Su estudio llevó a la identificación de diversos compuestos con capacidad de causar ciclopía, holoprosencefalia y polidactilia; sin embargo, la ciclopamina mostró un mayor efecto en estas alteraciones al inhibir a Hh ^{111,129,130}. Se ha demostrado que este alcaloide presenta un fuerte potencial de unión al dominio transmembranal de Smo, evitando su cambio conformacional lo que inhibe la activación de la cascada de señalización ^{111,125,130,131}.

Su efecto teratogénico y tóxico fue determinado a partir de un estudio en donde se realizaron pruebas *in vitro* e *in vivo*. En los ensayos *in vivo* se determinó que una concentración de 160 mg/kg de ciclopamina provoca defectos faciales graves, labio leporino y paladar hendido en embriones, anomalías que imitan defectos de nacimiento en los humanos, mientras que a una concentración 10-50 mg/kg la vía se inhibe de manera óptima sin causar alteraciones en los animales ¹³² por lo que en diversos análisis realizados con modelos *in vivo* se han utilizado estas dosis ¹³³⁻¹³⁵.

II.- ANTECEDENTES

En 1984 Tsutsumi y cols; llevaron a cabo la caracterización de los cambios histopatológicos secuenciales del daño hepático producido por trofozoítos de *E. histolytica* en un modelo experimental. En las primeras etapas de la infección se detectó infiltrado inflamatorio constituido por polimorfonucleares y macrófagos que rodean a los trofozoítos. Según la lesión avanza, se registró un estado crónico con lesiones granulomatosas y abundantes áreas de tejido necrótico. En este estudio se sugirió que el daño hepático no se relaciona directamente con los mecanismos de patogenicidad del parásito, en contacto físico con las células blanco, sino que la respuesta inflamatoria exacerbada para contener la infección parasitaria tiene un papel importante en el daño indirecto al órgano por las enzimas contenidas en las células inflamatorias, excretadas al medio cuando son lisadas por los trofozoítos ¹¹.

Por otra parte, Martínez-Gigena en 1992, inoculó trofozoítos virulentos de *E. histolytica* en el modelo de hámster por vía intrahepática y permitió lesionar aproximadamente el 25% del peso total del órgano (daño máximo determinado previamente para observar el proceso regenerativo del órgano), con la finalidad de estudiar la secuencia de los cambios histológicos del proceso de curación de la lesión, posterior al tratamiento con metronidazol. Este tratamiento se administró a una dosis de 5 mg/100 g de peso corporal por vía oral durante 10 días lo que permitió realizar el análisis secuencial de los cambios histológicos del proceso de regeneración del órgano. Durante la evolución del proceso de recuperación se observó una respuesta inflamatoria de tipo crónica, además del aumento en la aparición de macrófagos espumosos, disminución gradual de granulomas, aumento en el número de hepatocitos de neoformación, proliferación de conductos biliares y presencia de tejido fibroso, hasta llegar a una curación *ad integrum* del órgano. Este estudio representa uno de los primeros avances en el análisis del proceso de regeneración durante la administración del tratamiento antimibiano ¹³⁶.

En 1998, durante el desarrollo de su trabajo de tesis, León Félix analizó los cambios morfológicos durante la regeneración hepática administrando metronidazol cada 48 h hasta completar un esquema de 10 dosis. En el análisis microscópico logró detectar la presencia de focos inflamatorios cercanos a las áreas necróticas, así como células cebadas, eosinófilos, abundantes macrófagos espumosos, proliferación de conductos biliares y hepatocitos de neoformación ¹³⁷.

Finalmente, en nuestro laboratorio Loza Medrano en 2013, en su tesis de Maestría, dio seguimiento a la secuencia de cambios histológicos del proceso de regeneración en el AHA durante la administración de metronidazol. Evaluó la presencia de citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10, así como factores de crecimiento como HGF, IGF, VEGF y TGF- β y la proliferación celular de los hepatocitos. Este análisis demostró que las citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-10 se expresan en etapas iniciales del proceso de regeneración, mientras que IL-6, estuvo presente tanto en etapas iniciales como en intermedias de la regeneración al igual que los factores de crecimiento HGF e IGF; sin embargo, TGF- β se observó en etapas intermedias del tratamiento y VEGF sólo se presentó en las etapas iniciales. Se determinó que a los 11 días de evolución de la lesión correspondientes a la cuarta dosis de metronidazol los hepatocitos comienzan a proliferar y aumentan hasta los 23 días de evolución de la lesión, correspondientes a la décima dosis de metronidazol, mientras que, a la onceava y doceava dosis, el marcaje de hepatocitos en proliferación disminuyó de manera importante. Además, se demostró abundante colágeno tipo 1 a partir de los 9 días de evolución de la lesión, correspondiente a la tercera dosis de metronidazol, que disminuyó con el tiempo ¹³⁸.

Este último antecedente constituye una de las bases fundamentales para nuestro estudio, ya que sugiere que la vía de señalización Hh participa en el proceso de regeneración hepática post-HP mediante la inducción de diversas moléculas entre ellas factores de crecimiento, citocinas y ciclinas; además de mediar la activación de células estelares, proliferación de hepatocitos e inducción de progenitores hepáticos con la finalidad de reconstruir el tejido dañado.

III.- JUSTIFICACIÓN

El AHA es la manifestación extraintestinal más común de la amibiasis invasiva, su desarrollo conlleva a la necrosis del órgano acompañada por una respuesta inflamatoria exacerbada. Afortunadamente, el tratamiento oportuno con metronidazol da como resultado la curación de la lesión asociada a una óptima regeneración del órgano sin dejar tejido de cicatrización, fenómeno que raramente ocurre en otros tipos de daño.

La vía de señalización Hedgehog tiene actividad morfogénica, controla el destino de células progenitoras y la construcción de tejidos durante la embriogénesis; mientras que en el adulto contribuye a la curación de heridas y recuperación de tejidos dañados.

Específicamente en el tejido hepático, esta vía de señalización ha sido relacionada con la regeneración posterior a una hepatectomía parcial, fibrosis y remodelación vascular; así como en la patogénesis de la cirrosis y el cáncer hepático. Sin embargo, su participación en la regeneración hepática derivada del tratamiento ante la presencia de un agente infeccioso *in vivo* se desconoce. De esta manera, su estudio durante el tratamiento antiamebiano permitirá conocer el papel que esta vía de señalización desempeña y su importancia en el proceso de recuperación hepática.

IV.-HIPÓTESIS

La vía de señalización Hedgehog participa en el proceso de regeneración hepática durante la administración del tratamiento antiamebiano favoreciendo el proceso de regeneración del parénquima hepático dañado.

V.- OBJETIVOS

5.1 General.

Evaluar la participación de la vía de señalización Hedgehog en el proceso de regeneración durante el tratamiento con metronidazol en la amebiasis hepática experimental.

5.2 Específicos.

- ✚ Evaluar los cambios macroscópicos y microscópicos presentes durante el proceso de regeneración hepática con y sin inhibidor de la vía de señalización Hedgehog.
- ✚ Identificar los cambios en los niveles de moléculas efectoras involucrados en el proceso de regeneración hepática con y sin inhibidor de la vía de señalización Hedgehog.
- ✚ Identificar las estirpes celulares involucradas en la inducción y respuesta de la vía de señalización Hedgehog durante el proceso de regeneración hepática.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Estrategia experimental general

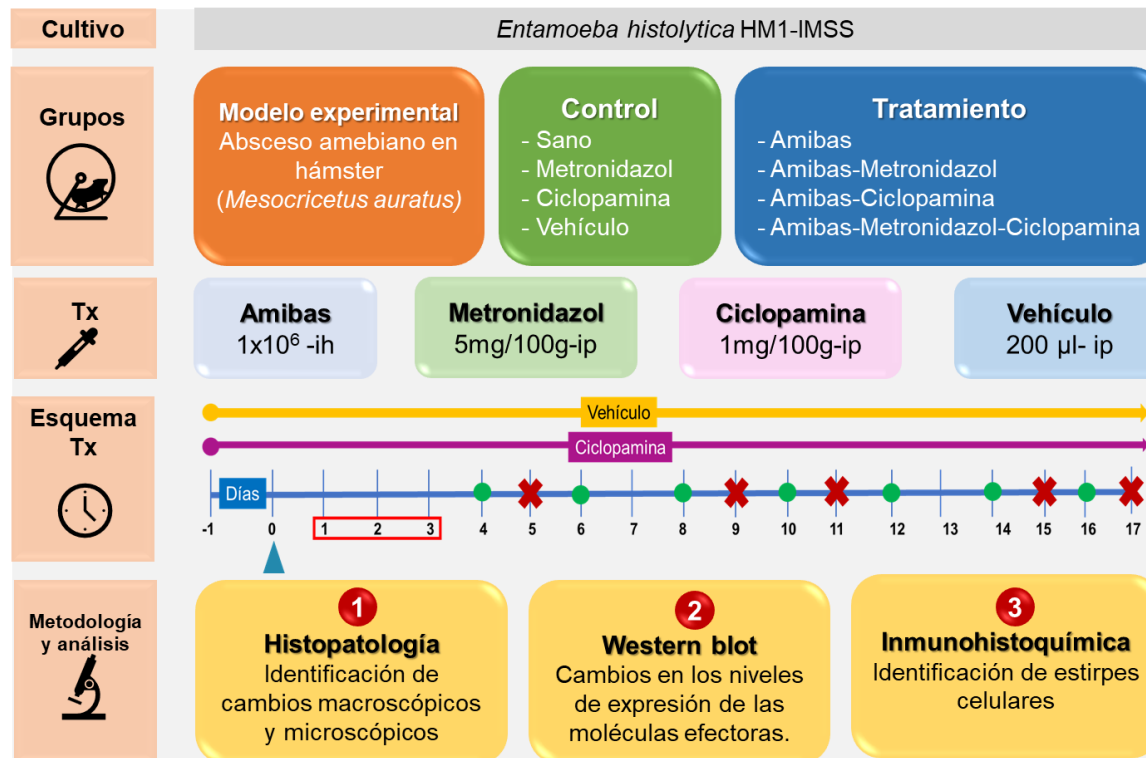


Figura 10. Estrategia experimental general. Se utilizaron trofozoítos de *E. histolytica* de una cepa virulenta, los cuales fueron inoculados en el modelo de hámster con la finalidad de producir el AHA. Se formaron 8 grupos de animales, cuatro grupos control y cuatro grupos tratamiento. Los grupos fueron inoculados con 1x10⁶ trofozoítos por vía intrahepática, mientras que los fármacos y el vehículo se administraron por vía intraperitoneal. Tanto el vehículo como la ciclopamina se administraron desde un día antes de la inoculación de trofozoítos y diariamente hasta su posterior sacrificio. El día 0 fue considerado como el día en que se inocularon las amibas, posteriormente la lesión se dejó evolucionar durante 3 días para obtener un 25% de lesión y a partir de estos días se comenzó a administrar el tratamiento con metronidazol. Una vez obtenidas las muestras estas fueron procesadas para su análisis histopatológico y molecular (Western blot e inmunohistoquímicas).

6.2 Esquema de tratamiento

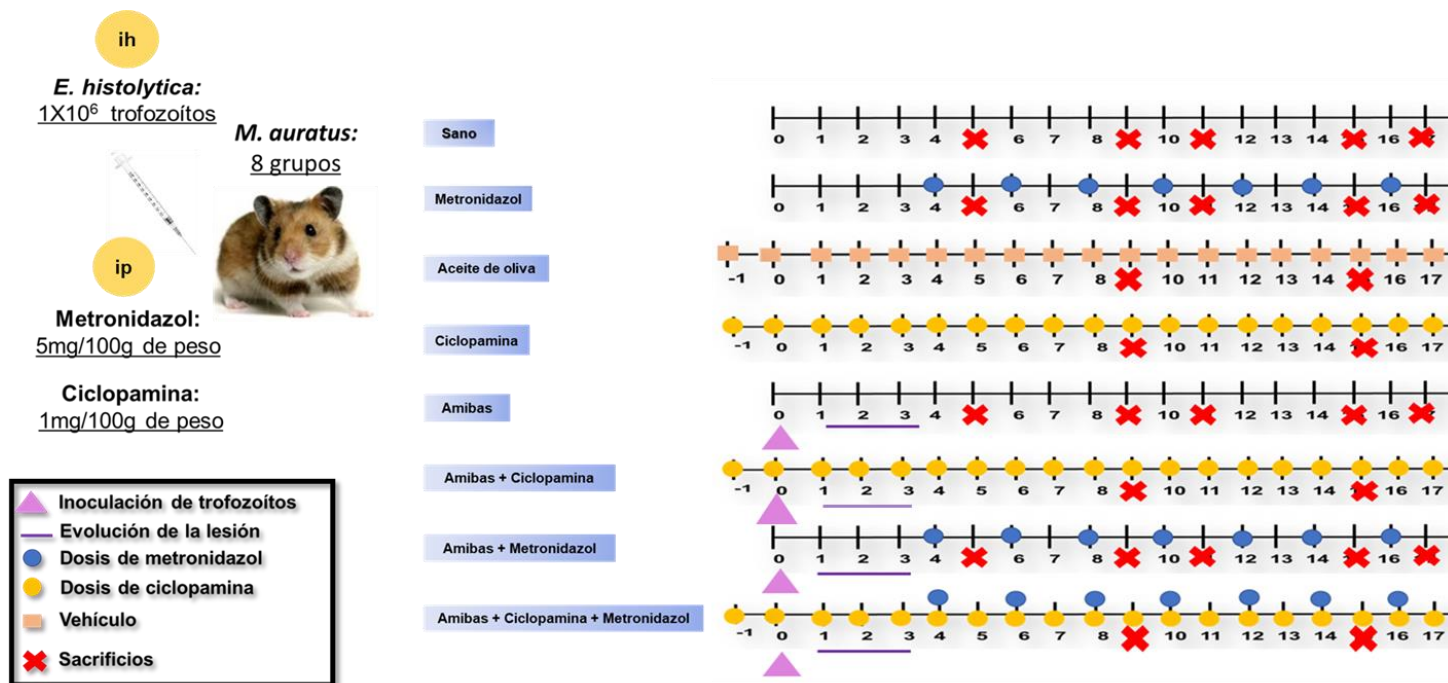


Figura 11. Esquema de tratamiento. Grupos control: Sano, los animales fueron sacrificados en los días 5, 9, 11, 15 y 17 correspondientes a dosis de metronidazol 1,3,4,6 y 7. Metronidazol, el metronidazol comenzó a administrarse en los animales a partir del día 4, 6, 8, 10, 12,14 y 16 para su posterior sacrificio en los días 5, 9, 11, 15 y 17 correspondientes a dosis de metronidazol 1,3,4,6 y 7. Vehículo, el aceite de oliva comenzó a administrarse desde el día -1 correspondiente a un día anterior a la inoculación de amibas y se administró diariamente hasta su posterior sacrificio día 9 y 15 correspondientes a dosis 3 y 6 de metronidazol. Ciclopamina, comenzó a administrarse desde el día -1 correspondiente a un día anterior a la inoculación de amibas y se administró diariamente hasta su posterior sacrificio día 9 y 15 correspondientes a dosis 3 y 6 de metronidazol. Amibas, las amibas se inocularon en el día 0 y la lesión se dejó evolucionar durante 72 h para su posterior sacrificio en los días 5, 9, 11, 15 y 17 correspondientes a dosis de metronidazol 1,3,4,6 y 7. Amibas ciclopamina, la ciclopamina comenzó a administrarse desde 1 día antes de la inoculación de las amibas y diariamente hasta su posterior sacrificio en los días 9 y 15 correspondientes a dosis 3 y 6 de metronidazol. Amibas metronidazol, se inocularon las amibas, se dejó evolucionar la lesión por 72 h para su posterior sacrificio en los días 5, 9, 11, 15 y 17 correspondientes a dosis de metronidazol 1,3,4,6 y 7. Amibas ciclopamina metronidazol, la ciclopamina se comenzó a administrar 1 día antes de la inoculación de las amibas, la lesión se dejó evolucionar durante 72 h y posteriormente se administró el metronidazol a partir del día 4, 6, 8, 10, 12,14 y 16 para su posterior sacrificio en los días 9 y 15 correspondientes a dosis de metronidazol 3 y 6.

6.3 Cultivo amibiano.

Los trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1: IMSS se cultivaron axénicamente a 37 °C en medio TYI-S-33, suplementado con suero bovino adulto al 10% y vitaminas. Para todos los experimentos se utilizaron cultivos de trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento.

6.4 Animales de experimentación.

Se utilizaron hámsteres machos (*Mesocricetus auratus*) de dos meses de edad, en un rango de peso de 80 a 100 g. Se formaron 8 grupos de animales de experimentación: Control (**sano**), Metronidazol (**Me**), Vehículo (**Ve**), Ciclopamina (**Cp**), Amibas (**Am**), Amibas + Metronidazol (**AmMe**), Amibas + Ciclopamina (**AmCp**) y Amibas + Metronidazol + Ciclopamina (**AmMeCp**). El bioterio del CINVESTAV proporcionó los animales, en cumplimiento a la NOM-062-ZOO-1999 con el protocolo de investigación 0192-16.

6.5 Administración de ciclopamina.

La ciclopamina (Sigma Aldrich®, Cat. PHL82510) se administró diariamente a una dosis de 1 mg/100 g de peso vía intraperitoneal, usando como vehículo ciclodextrina® (Sigma Aldrich®, Cat. H5784). En los grupos AmCp y AmMeCp la administración de la ciclopamina se inició un día antes de la inoculación de amibas y se continuó con la administración diaria hasta el sacrificio.

6.6 Administración de metronidazol.

Posterior a la inoculación de amibas, se permitió la evolución de la lesión durante 72 h y posteriormente se inició con la administración de metronidazol (Flagyl®) a una dosis de 5 mg/100 g de peso cada tercer día, por vía intraperitoneal hasta completar un esquema de 7 dosis. Se recuperaron muestras de los días 4, 8, 10, 14 y 16 correspondientes a las dosis (1, 3, 4, 6 y 7) representativas del proceso de regeneración que fueron determinadas previamente en nuestro laboratorio.

6.7 Procedimiento quirúrgico.

Los hámsteres se mantuvieron en ayuno de 12 a 18 h previamente a la cirugía, el acceso al agua fue *ad libitum*. Los animales fueron anestesiados mediante inhalación de isoflurano al 3% de 5 a 10 min antes de comenzar la cirugía y durante el procedimiento se administró una dosis de 1.5% del mismo isoflurano. Se realizó una incisión longitudinal

en el abdomen, se expuso el lóbulo izquierdo del hígado y se inocularon 1×10^6 trofozoítos de una cepa virulenta de *E. histolytica*, finalmente se suturo la incisión.

6.8 Obtención de muestras.

Los animales de las diferentes condiciones recibieron la eutanasia mediante sobredosis de pentobarbital sódico (Anestesal®) a una concentración de 4.72 mg /100 g de peso. Los animales fueron sangrados a blanco y el hígado fue resecado en condiciones de asepsia. Los órganos obtenidos se colocaron en PBS 1X estéril pH 7.2 para eliminar restos de sangre. Después y casi de inmediato se obtuvieron los fragmentos necesarios del sitio de lesión y cercanos a ella. Los fragmentos recuperados fueron distribuidos y preservados dependiendo del análisis al que serían sometidos: histología e inmunohistoquímica en formol y paraformaldehído al 10 y 4% respectivamente. Mientras que los fragmentos obtenidos para análisis de proteína se colocaron en regulador de lisis (Tris 0.05 M, NaCl 0.15 M, Tritón X-1001% en PBS) con inhibidor de proteasas al 4X (Complete®). Estas muestras fueron almacenadas a -70 °C hasta su uso.

6.9 Análisis histológico.

Los fragmentos fijados fueron lavados con agua corriente y procesados en un tren de deshidratación, se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes histológicos de 5 μ m de espesor los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) para su análisis en microscopio óptico Nikon Eclipse 80i® Tokio, Japón.

6.10 Tinción Tricrómica de Masson.

Para el análisis de los cambios en la síntesis de matriz extracelular durante el proceso regenerativo; se realizaron tinciones de tricrómica de Masson, para visualizar las fibras de colágeno tipo I. Cortes en blanco fueron desparafinados durante toda la noche a 58 °C. Se utilizó el kit Hycel® Cat. 64297 siguiendo las instrucciones del proveedor. Las laminillas se montaron con resina sintética para su posterior análisis microscópico en el microscopio óptico Nikon Eclipse 80i® Tokio, Japón.

6.11 Microscopía electrónica de transmisión (MET).

Las muestras de tejido se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio pH 7.2 0.1 M durante 1 h, fueron post-fijados con tetraóxido de osmio al 1% en el mismo amortiguador, en agitación por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se deshidrataron con etanol en concentraciones crecientes (25, 50, 70, 90 y

96%), alcohol absoluto y óxido de propileno. Fueron incluidas en resina epóxica durante 1 h y se polimerizo a 60 °C durante 48 h. Se obtuvieron cortes semifinos que se tiñeron con azul de toluidina y ultrafinos los cuales se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para finalmente ser examinados con el microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM-1011.

6.12 Análisis bioinformático.

El análisis *in silico* de las proteínas de interés que se estudiaron en este trabajo, consistió en identificar las secuencias de las proteínas Shh, Ptc, Smo, Gli, a través del repositorio UniPROT para el modelo experimental de hámster (*Mesocricetus auratus*) y las conocidas en el humano (*Homo sapiens*). Se utilizaron las secuencias de los inmunógenos correspondientes a los anticuerpos de la casa comercial (Santa Cruz Biotechnology®) que fueron utilizados en este trabajo. Posteriormente, se realizó un análisis de alineamiento de secuencias a través de las herramientas BLAST y Clustal Omega de los inmunógenos contra las proteínas identificadas, obteniendo los porcentajes de identidad, gaps y E-Value. Además, en la base de datos AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba/app>), se realizó la búsqueda de posibles proteínas candidatas que pudieran generar una reacción positiva cruzada contra los anticuerpos.

6.13 Extracción de proteínas.

Los fragmentos recuperados fueron disgregados en regulador de lisis (Tris 0.05 M, NaCl 0.15 M, Tritón X-100 1% en PBS) con inhibidor de proteasas. Se recuperaron 20 µl del sobrenadante para cuantificar las muestras por el método del Ácido Bicinconinico (BCA) Thermo Scientific®, el resto de extracto se almacenó en alícuotas de 100 µl a -70 °C.

Para realizar la cuantificación de proteína primero se realizó una curva de calibración con albumina sérica bovina (BSA). La curva de calibración se preparó con agua tridestilada, BSA a diferentes concentraciones (5-45 µg/µl) y reactivo de trabajo (BCA + CuSO₄ al 4%), cada concentración se analizó por triplicado.

Para la lectura de las muestras se colocaron 100 µl de agua, 1 µl de muestra y 100 µl de BCA. Una vez cargada la placa se colocó en agitación por 30 s y posteriormente se almacenó a 37 °C por 30 min. Posteriormente se realizó la lectura a 540 nm en el espectrofotómetro Epoch BioTek Instruments®. Las muestras fueron ajustadas a una concentración de 30 µg de proteína para cada condición.

Las muestras fueron preparadas en el siguiente orden: Agua tridestilada, muestra y buffer de muestra 4X. Una vez preparadas las muestras, éstas se colocaron en agua hirviendo por 5 min, y se separaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% a 100 volts durante 2 h, unos geles se tiñeron con azul de Coomassie para el análisis del patrón de proteínas y otros fueron transferidos a membrana de nitrocelulosa para su análisis mediante la técnica de western blot.

6.14 Análisis de proteínas por Western blot.

Los geles de poliacrilamida no teñidos fueron electrotransferidos a membranas de Nitrocelulosa (Bio-Rad®) a 250 mA durante 2 h en baño de hielo. Las membranas se bloquearon con solución de bloqueo EveryBlot Blocking Buffer (Biorad® cat. 12010020) por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas fueron embebidas en 3 ml de solución de bloqueo con anticuerpo primario en la dilución adecuada para cada uno: (Shh IgG₁ cat. sc-365112 1:100, Ptc IgG_{2a} cat. sc-293416 1:200, Smo IgG_{2a} cat. sc-166685 1:100, Gli IgG₁ cat. sc-515781 1:200, α -SMA IgG₁ cat. sc-53142 1:200 y β -actina IgG₁ cat. sc-517582 1:1000 Santa Cruz Biotechnology®), se incubaron durante toda la noche a 4 °C en agitación constante. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas con TBS-tween20 1X para eliminar el exceso de anticuerpo y posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario peroxidado (m-IgG1 cat. sc-525408 1:1000 y m-IgG2a cat. sc 5427311:1000 Santa Cruz Biotechnology®) durante 2 h a temperatura ambiente, posteriormente las membranas fueron lavadas nuevamente con TBS-tween20 1X. El revelado de las membranas se realizó con Luminol (Santa Cruz® sc-2048) en el equipo Vilber Newton 7.0®. Las bandas obtenidas fueron sometidas a un análisis de densidad óptica utilizando el programa ImageJ® y los datos obtenidos se graficaron empleando GraphPad® 8.0.1 determinando las diferencias con significancia estadística para cada proteína según la condición evaluada.

6.15 Inmunohistoquímica.

A partir del análisis histológico en las tinciones con H&E se seleccionaron las muestras más representativas del proceso de regeneración para la identificación de las moléculas Shh, Ptc y Gli, que forman parte de la vía de señalización.

Los cortes histológicos se desparafinaron a 58 °C durante toda la noche, posteriormente el tejido fue hidratado en un tren de solvente orgánico y alcoholes en concentraciones decrecientes (xilol I, xilol II, xilol III, alcohol 99.5% I, 99.5% II, 99% I, 99% II, 80%).

Para la recuperación antigénica, los cortes fueron sumergidos en amortiguador de citratos al 0.01% pH 6.0 y se colocaron en la autoclave por 20 min a 121 °C y 15 lb de presión. Después se realizaron 3 lavados con PBS 1X cada uno de 5 min. Para evitar fondo en la reacción de revelado se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena colocando los cortes en una mezcla de etanol-peróxido de hidrógeno al 3% durante 1 h, seguido de 3 lavados con PBS 1X por 5 min. Para el bloqueo de sitios inespecíficos de reconocimiento de los anticuerpos se realizó el bloqueo con leche descremada al 10% en PBS 1X durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez bloqueadas las muestras se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS 1X para eliminar el excedente de leche. Se colocó el anticuerpo primario (Shh IgG₁ cat. sc-365112 1:50, Ptc IgG_{2a} cat. sc-293416 1:50 y Gli IgG₁ cat. sc-515781 1:50 Santa Cruz Biotechnology®) para las moléculas de interés: Shh, Ptc y Gli cada uno diluido con PBS-SFB al 3%, se incubaron toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS 1X por 5 min cada uno para eliminar el excedente del anticuerpo primario y se colocó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (m-IgG₁ cat. sc-525408 1:100 y m-IgG_{2a} cat. sc-5427311:100 Santa Cruz Biotechnology®) durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron lavadas nuevamente con PBS 1X, se agregó una mezcla de peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina en dilución 1:10, manteniendo la reacción protegida de la luz hasta observar la marca (color café) sobre el tejido y se contrañeron con hematoxilina. Por último, las laminillas fueron deshidratadas someténdolas a concentraciones crecientes de alcohol (85%, 90%, 99%, 100% I, 100% II, xilol I, xilol II y xilol III) y montadas en resina sintética para su observación en el microscopio óptico, cuantificación de células positivas a la marca en el programa QuPath® y su posterior análisis estadístico en el programa GraphPad Prism® 8.0.1

6.16 Análisis estadístico.

Se realizó utilizando el software GraphPad Prism® 8.0.1 para Windows. Todos los datos se expresan como valores medios \pm error estándar de la media (SEM). La estadística se determinó mediante análisis de ANOVA unidireccional y prueba de comparaciones

múltiples de Bonferroni y Dunett. Se realizó la comparación de los resultados de los tratamientos contra el control sano. Se aceptó significancia al 95%.

VII.-RESULTADOS.

7.1 Estandarización de lesión.

En el presente proyecto la determinación de la capacidad de la amiba para producir daño fue muy importante, así que, se realizaron inicialmente ensayos de virulencia en 10 hámsteres inoculados con 1×10^6 de trofozoítos de *E. histolytica* vía intrahepática en el lóbulo izquierdo del órgano. La lesión se dejó evolucionar 7 días obteniendo lesiones en promedio del 47%, lo que nos indicó una buena capacidad de virulencia del parásito (Figura 12 A y B). Una vez determinada la virulencia de la cepa, se realizó la estandarización de la lesión inoculando un grupo de 10 animales, esta lesión se dejó evolucionar durante 3 días, obteniendo lesiones de 25% de daño hepático en promedio, porcentaje óptimo para su tratamiento con metronidazol (Figura 12 C y D).

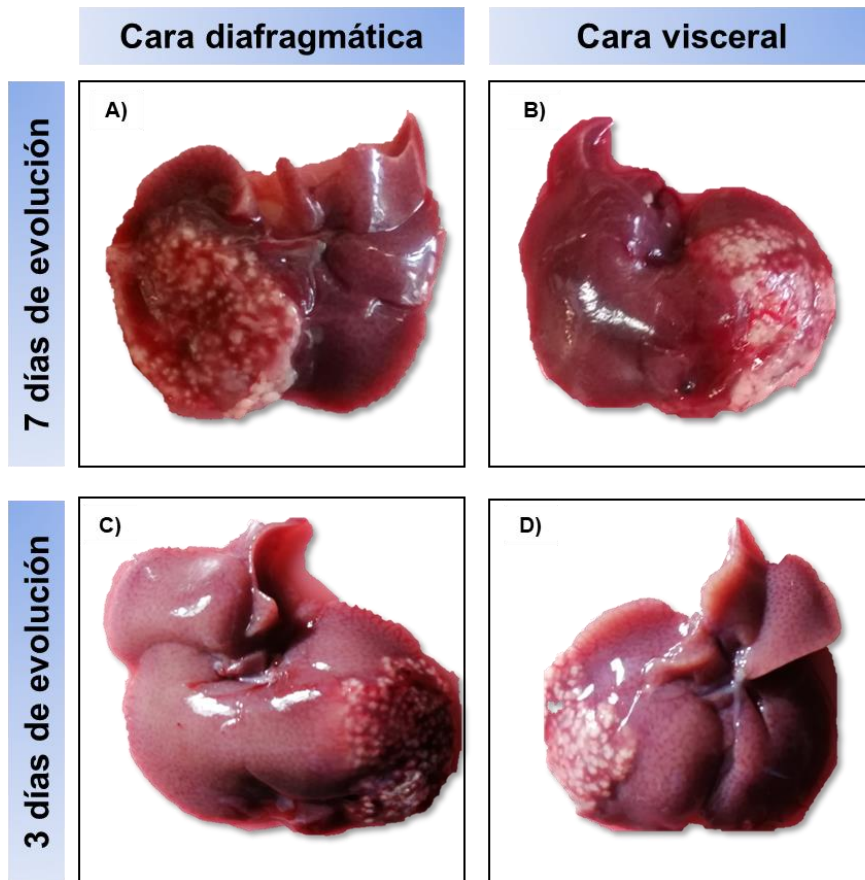


Figura 12. Prueba de virulencia. Lesión blanquecina grumosa, que se visualiza en ambas caras del lóbulo izquierdo panel **A** y **B**, ocupando un 47 % del peso total del órgano. Estandarización de la lesión 3 días de evolución. Lesión blanquecina grumosa que se visualiza por ambas caras del lóbulo izquierdo **C** y **D**, ocupando un 25% del peso total del órgano.

7.2 Análisis macroscópico.

Una vez obtenido el porcentaje ideal de lesión, se conformaron 2 grupos de animales (Metronidazol y Amibas) para evaluar la evolución del daño a diferentes tiempos, correspondientes a dosis 1, 3, 4, 6 y 7 de metronidazol. Cada dosis de estudio estuvo conformada por 6 animales. Se observó una evolución creciente y progresiva de la lesión en el caso del grupo de amibas, todas correspondientes a las características macroscópicas de la formación del AHA (lesión granulomatosa de color blanquecino y consistencia grumosa que se visualiza por ambas caras del órgano) (Figura 13 A). Por otra parte, en el grupo de animales tratados con metronidazol observamos la disminución del porcentaje de lesión hasta su eliminación conforme a las dosis de metronidazol administradas (Figura 13 B). Estos resultados permitieron elegir las dosis más representativas para evaluar la vía de señalización, de las cuales se eligieron D3 y D6 para los subsecuentes estudios.

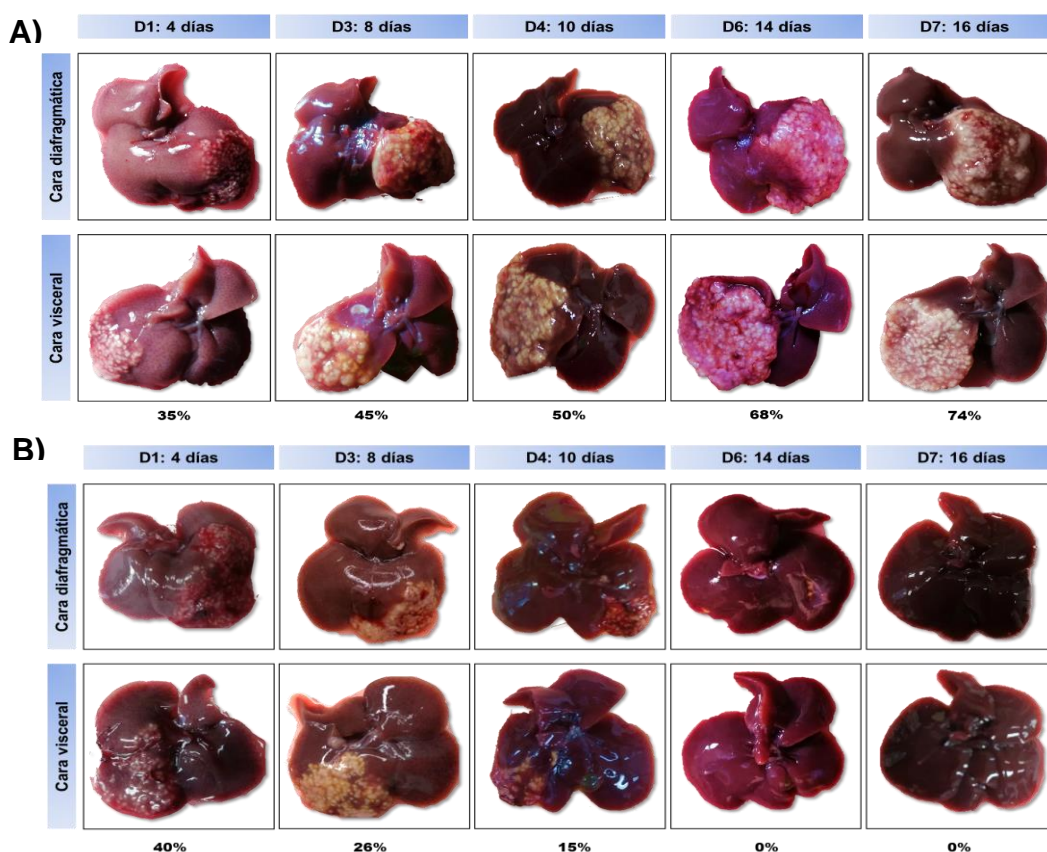


Figura 13. Desarrollo del AHA. A) La lesión se dejó evolucionar hasta los 16 días en donde observamos lesiones características del AHA. **B)** Curación del AHA mediante la administración de metronidazol. Observamos la involución de las lesiones mediante la administración de metronidazol, se observaron lesiones amarillentas características del proceso de regeneración hepática con restos de fibrina hasta la posterior desaparición de estas lesiones.

7.3 Análisis macroscópico de los grupos tratados con ciclopamina y metronidazol.

Para los grupos evaluados con metronidazol y ciclopamina se eligieron únicamente las dosis 3 y 6 como se mencionó anteriormente, ya que en estas dosis se han observado cambios importantes del proceso de regeneración.

Para los grupos con metronidazol (**Me, AmMe, AmMeCp**) el fármaco comenzó a administrarse 4 días posteriores a la inoculación del parásito a una dosis de 5 mg/100 g de peso del animal cada tercer día; mientras que para los grupos con ciclopamina (**AmCp y AmMeCp**), ésta se administró una dosis diaria de 1 mg/100 g de peso del animal. Conforme se cumplía el esquema de tratamiento se realizaron los sacrificios correspondientes, disecando el hígado completamente para observar los cambios macroscópicos de cada tratamiento.

Para el caso de los hígados control, en ambas dosis (**D3 y D6**), observamos un órgano con características normales en todos los lóbulos, tamaño, color y consistencia (Figura 14 y 15). El análisis macroscópico de los hígados obtenidos de **D3**, en el grupo **Am**, se desarrollaron lesiones del 46% en promedio, de consistencia grumosa y color blanquecino, características del proceso de infección activa. Para el grupo de **AmCp** el promedio de las lesiones fue del 62% del peso total del órgano, de consistencia grumosa y color blanquecino. En el grupo **AmMe** se obtuvieron lesiones del 26% en promedio, de consistencia grumosa y color amarillento, característico de la acción del metronidazol, acompañada de pequeñas zonas con fibrina indicio del proceso de regeneración, mientras que en el grupo **AmMeCp** obtuvimos lesiones del 40% del total del órgano (Figura 14). Además, se realizó el análisis estadístico de las lesiones con lo que se determinó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Gráfica 1).

El análisis macroscópico para **D6** mostró resultados similares a los obtenidos en D3. Las lesiones obtenidas para el grupo de **Am** fueron del 67% del peso total órgano; estas lesiones abarcaban el total del lóbulo izquierdo y el lóbulo medio, así como un ligero porcentaje del lóbulo derecho, estas lesiones fueron de color blanquecino y consistencia grumosa. En el grupo de **AmCp** se desarrollaron lesiones del 81% en promedio, de consistencia grumosa y color blanquecino con hepatomegalia, además el órgano presento hepatomegalia. El grupo **AmMe** las lesiones ya no fueron cuantificables,

únicamente se observó un puntillado de color amarillento característico de la acción del metronidazol, así como zonas aledañas con presencia de fibrina, mientras que el grupo **AmMeCp** se desarrollaron lesiones del 7% en promedio, de color blanquecino y consistencia grumosa (Figura 15). Se realizó el análisis estadístico del peso de las lesiones para cada grupo estudiado, y se observaron diferencias estadísticamente significativas (Gráfica 2).

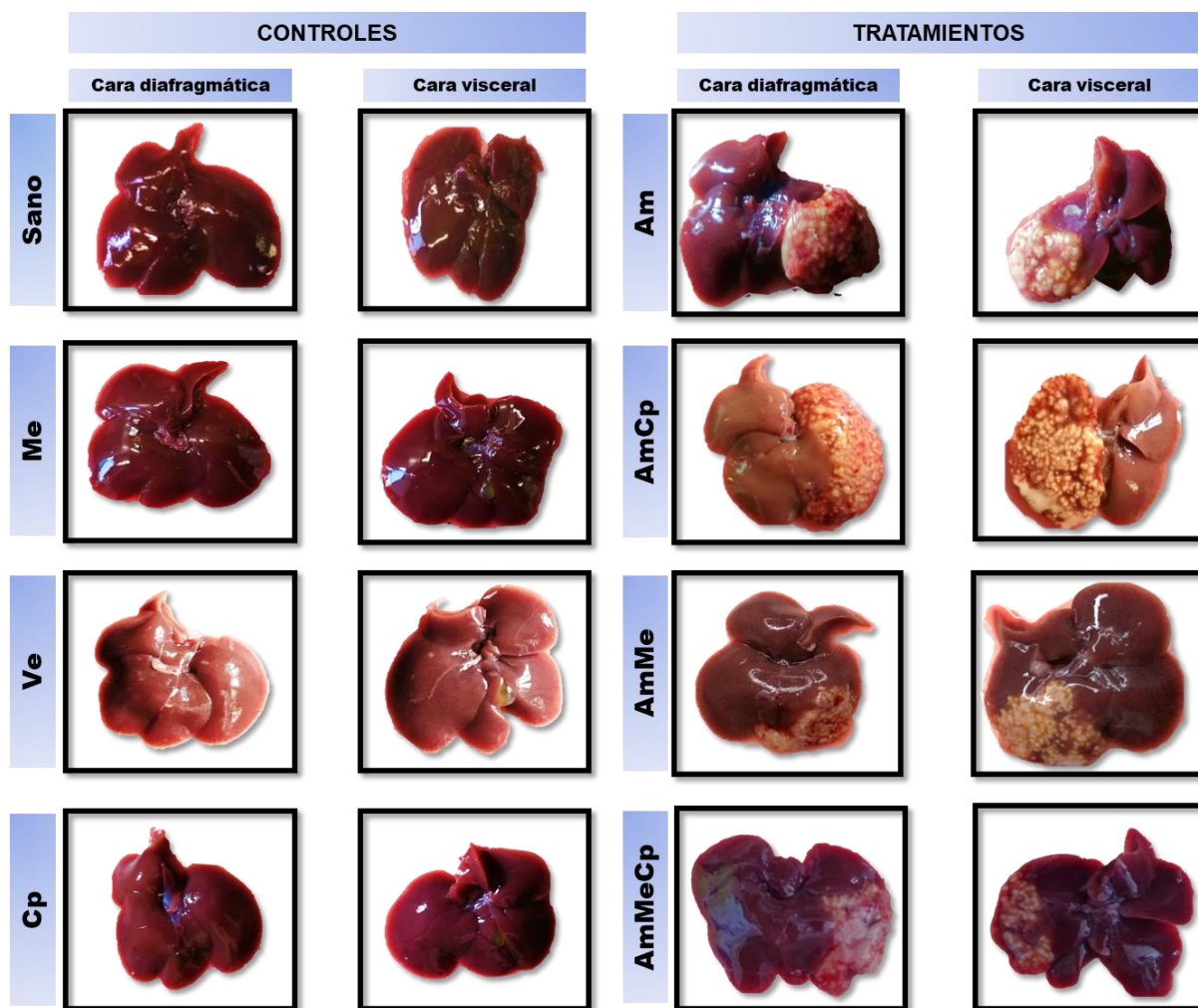
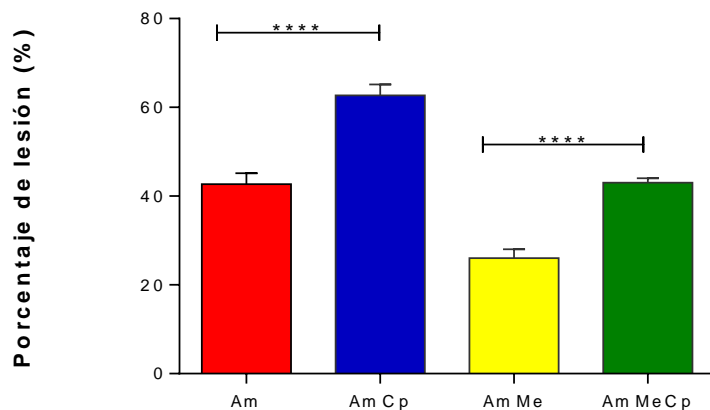


Figura 14. Datos macroscópicos D3. Se presentan todas las condiciones (controles y tratamientos). Los controles mostraron un aspecto normal en todas las condiciones, mientras que los tratamientos mostraron una diferencia macroscópica importante en cuanto al tamaño de la lesión.



$p < 0.05$

Gráfica 1. Porcentaje de lesión de D3. El peso de las lesiones obtenidas se comparó estadísticamente mediante comparación múltiple con prueba de Bonferroni, se aceptó significancia del 95%.

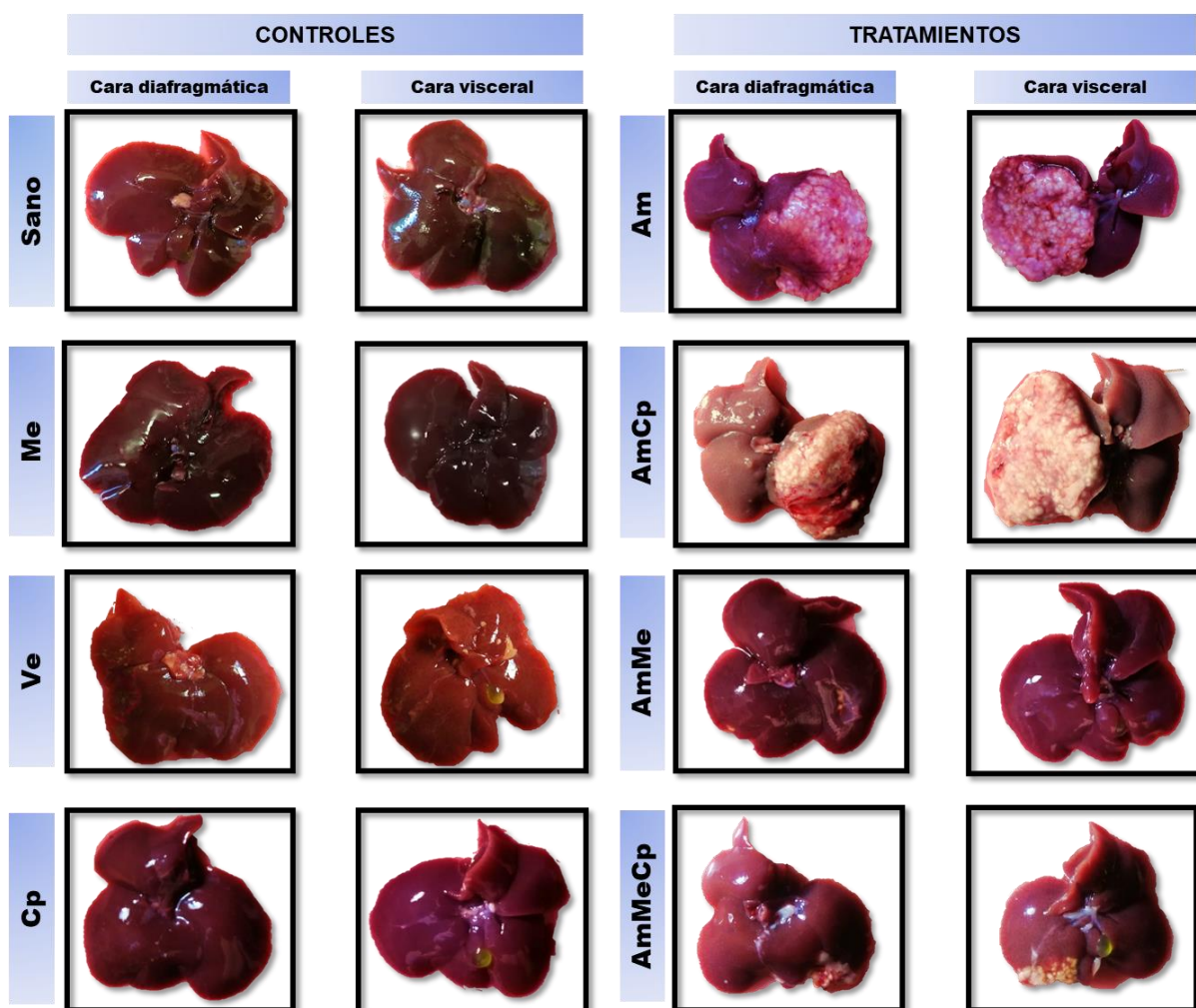
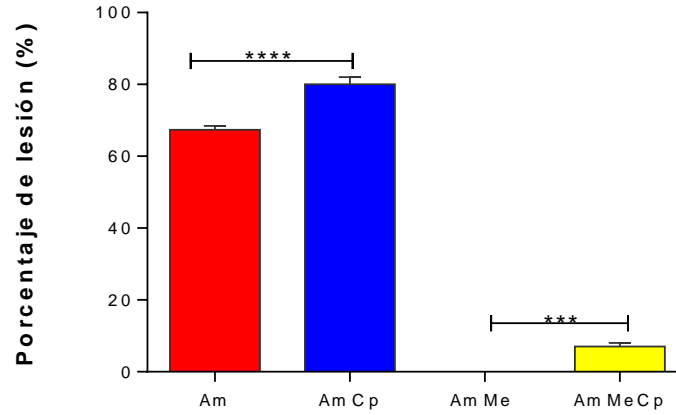


Figura 15. Datos macroscópicos D6. Se presentan todas las condiciones (controles y tratamientos). Los controles mostraron un aspecto normal en todas las condiciones, mientras que los tratamientos mostraron una diferencia macroscópica importante en cuanto al tamaño de la lesión.



p < 0.05

Gráfica 2. Porcentaje de lesión de D6. El peso de las lesiones obtenidas se comparó estadísticamente mediante comparación múltiple con prueba de Bonferroni, se aceptó significancia del 95%.

7.4 Análisis histológico.

Una vez realizado el análisis macroscópico, se seleccionaron las muestras más representativas de todas las condiciones para su procesamiento histológico. En las muestras control, pudimos observar láminas de hepatocitos, venas centrales y triadas portales correspondientes a un parénquima hepático normal (Figura 16).

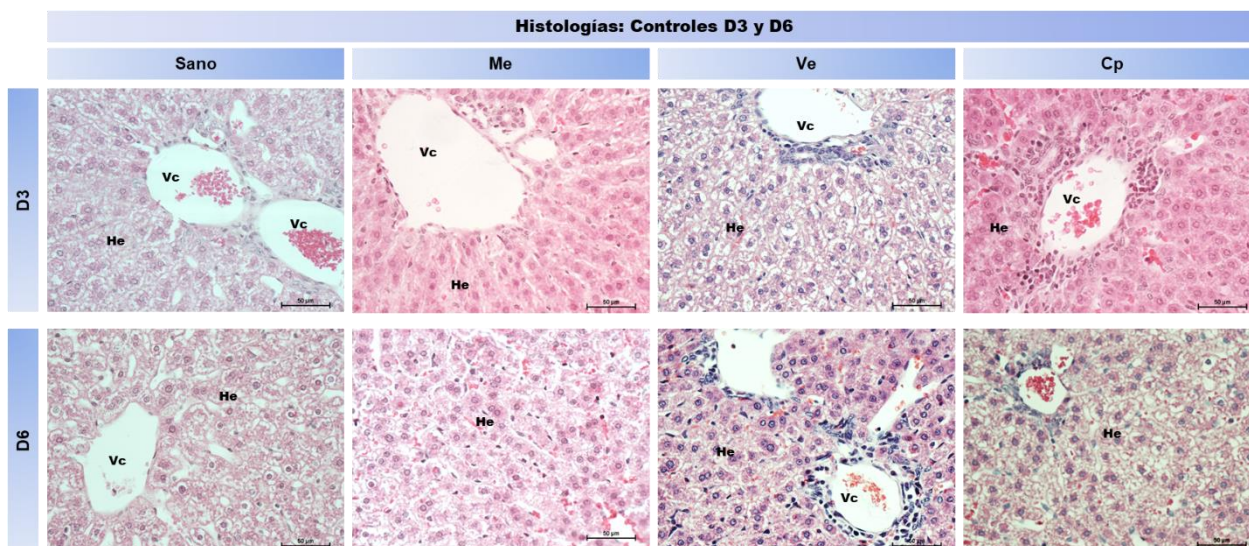


Figura 16. Análisis histológico de animales control D3 y D6. Parénquima hepático de apariencia normal en todas las condiciones evaluadas se observan cordones de hepatocitos sanos (He) alrededor de las venas centrales (Vc).

Para la D3 correspondiente a 8 días de evolución (Figura 17); en el grupo Am A), se observó la formación de granulomas clásicos con centros necróticos y presencia de trofozoítos, rodeados por focos inflamatorios localizados en todo el parénquima hepático. En el grupo AmCp B), observamos granulomas de mayor tamaño (por la fusión de estos), grandes áreas de necrosis, presencia de trofozoítos en el centro de las lesiones y una respuesta inflamatoria más generalizada a lo largo del parénquima hepático. En el grupo de AmMe C) observamos la presencia de hepatocitos de neoformación y algunas células espumosas, evidente disminución en el tamaño de los granulomas, respuesta inflamatoria focalizada y trofozoítos no abundantes. En el grupo AmMeCp D), observamos granulomas de gran tamaño, extensas áreas de necrosis, respuesta inflamatoria generalizada a lo largo del parénquima hepático y la presencia de algunos hepatocitos de neoformación presentes.

En cuanto a la D6 correspondiente a 15 días de evolución (Figura 17); en el grupo de Am E), se observó la fusión de granulomas, lo que genera un área muy extensa de daño con grandes zonas necróticas y presencia de abundantes trofozoítos. En el grupo AmCp F) observamos una respuesta inflamatoria más generalizada en todo el parénquima, fusión de granulomas, áreas extensas de necrosis y presencia de trofozoítos. En el grupo AmMe G) observamos un parénquima hepático aparentemente normal, una pequeña cantidad de hepatocitos de neoformación, sin células espumosas y pequeños focos de inflamación en algunas áreas del parénquima hepático. Mientras que para grupo AmMeCp H) observamos múltiples granulomas, áreas de necrosis, respuesta inflamatoria dispersa a través de todo el parénquima hepático, presencia de trofozoítos y algunas células espumosas y hepatocitos de neoformación.

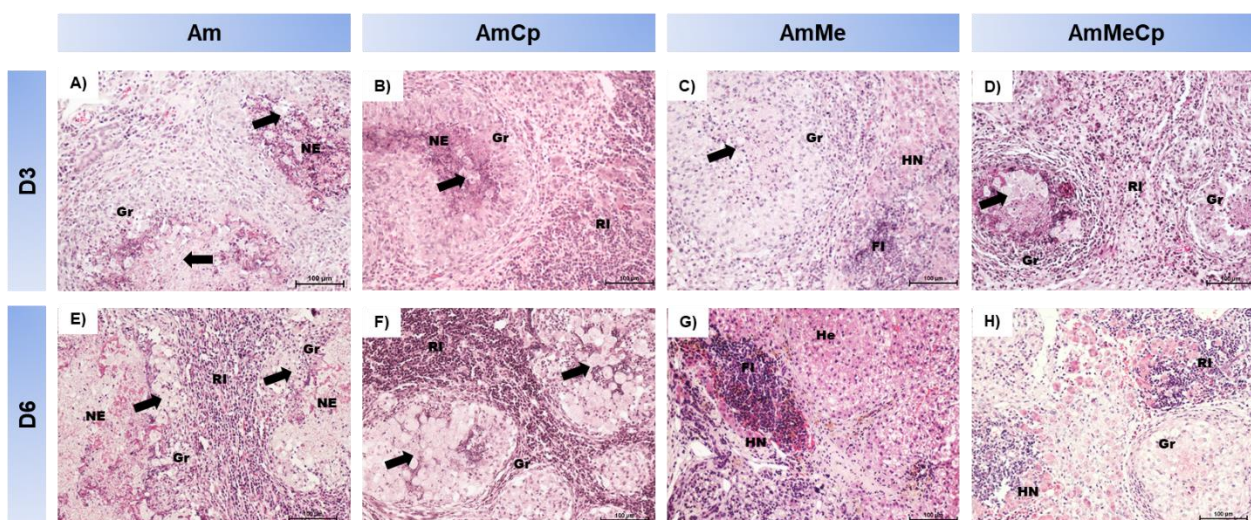
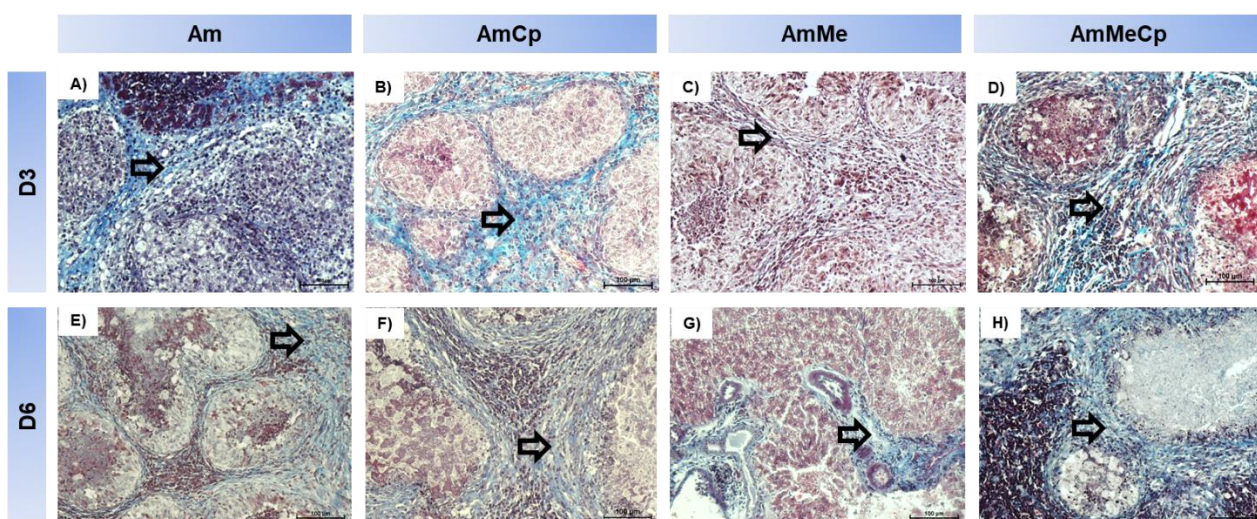


Figura 17. Cambios histológicos durante el proceso regenerativo D3 y D6. A) Formación de granulomas (Gr) con presencia de trofozoítos (Flechas), se observan granulomas con centros necróticos (Ne). B) Zonas extensas de necrosis (Ne), fusión de granulomas (Gr) y respuesta inflamatoria generalizada (RI). C) Disminución del tamaño de los granulomas (Gr), áreas de necrosis y pequeños focos de inflamación (FI), aparición de hepatocitos de neoformación (HN). D) Múltiples granulomas (Gr), áreas extensas de necrosis y respuesta inflamatoria generalizada (RI), con una disminución en el número de hepatocitos de neoformación (HN). Cambios histológicos durante el proceso regenerativo D6. E) Se observan granulomas (Gr) y centros necróticos extensos (Ne), hay un aumento en la respuesta inflamatoria (RI). F) Zonas extensas de necrosis (Ne), fusión de granulomas (Gr) y respuesta inflamatoria dispersa (RI) exacerbada. G) Parénquima hepático de apariencia normal, disminución de hepatocitos de neoformación (HN) y focos inflamatorios (FI). D) Múltiples granulomas (Gr), áreas extensas de necrosis y respuesta inflamatoria generalizada (RI), con una disminución en el número de hepatocitos de neoformación (HN).

7.5 Producción de colágeno de tipo 1.

Una de las características importantes del proceso de regeneración es la remodelación de la matriz extracelular, ya que de ello depende que óptimo pueda ser este proceso. A medida que la lesión hepática progresa la producción de colágeno anormal (con organización irregular) aumenta lo que causa la pérdida progresiva de la función normal del órgano. En el grupo Am D3 y D6 observamos la distribución irregular de fibras de colágeno que rodean a los granulomas A y E). La administración de ciclopamina produce un aumento en zonas líticas y la inducción de producción de matriz extracelular, lo que se observa como formación anormalmente abundante de fibras de colágeno alrededor de los granulomas B, D, F y H). Mientras que en el caso de los grupos tratados con metronidazol para D3 las fibras de colágeno disminuyen en cantidad e intensidad C) y para D6 observamos un parénquima hepático de apariencia normal con presencia de algunas fibras alrededor de algunos vasos G) (Figura 18).



7.6 Cambios ultraestructurales.

El análisis ultraestructural del hígado se realizó mediante MET. Las muestras control mostraron un parénquima hepático de apariencia normal, presencia de hepatocitos viables, con núcleos grandes y esféricos que ocupan un lugar central en la célula y un citoplasma rico en organelos como retículo endoplásmico rugoso y liso, mitocondrias, aparato de Golgi, lisosomas y peroxisomas (Figura 19). Sin embargo, en el grupo de Am observamos la presencia de hepatocitos dañados y un aumento en la presencia de células de tipo inflamatorio y así como algunas fibras de colágeno A y E), para los grupos tratados con ciclopamina observamos un aumento de zonas líticas, presencia de células de tipo inflamatorio con infiltrados multivesiculares lo que podría estar asociado a un mayor daño, además observamos un aumento en la presencia de fibras de colágeno acompañada por la presencia de células de tipo fibroblástico B, D, F y H). El grupo de AmMe de D3 observamos una disminución en la aparición de células de tipo inflamatorio y un mayor número de hepatocitos viables C), mientras que el grupo AmMe de D6 observamos un parénquima hepático de apariencia normal con un mayor número de hepatocitos viables y una disminución drástica de células de tipo inflamatorio G) (Figura 20).

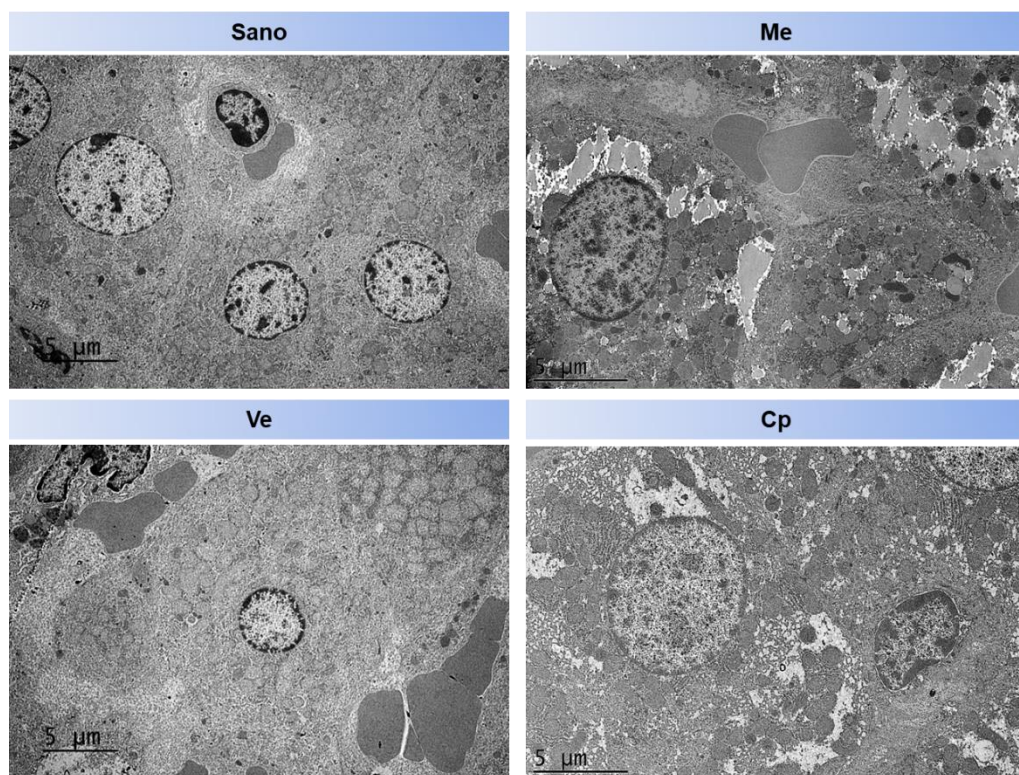


Figura 19. Análisis ultraestructural de controles. Observamos características ultraestructurales normales de los grupos control.

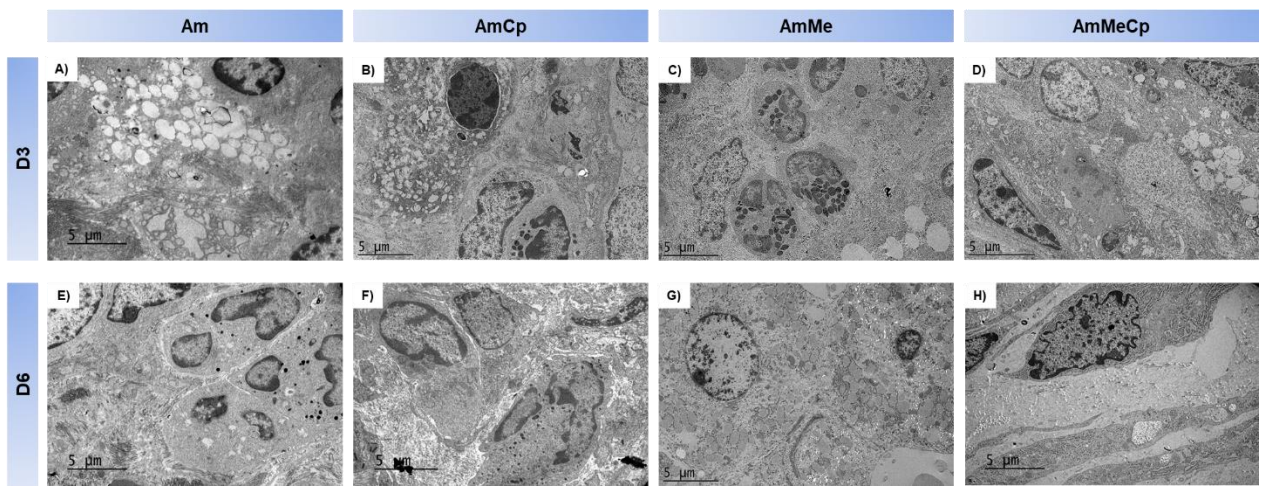


Figura 20. Análisis ultraestructural de tratamientos.

7.7 Análisis bioinformático.

A través del repositorio central de secuencias de proteínas UniPROT, se obtuvieron las secuencias de proteínas de interés en los organismos *M. auratus* y *H. sapiens*, correspondientes al modelo experimental de hámster y a las proteínas conocidas en el humano. Los resultados de la búsqueda se muestran en la tabla 1, en donde se identificaron a las proteínas Shh, Ptc, Smo y Gli, con el número de acceso correspondiente a la registrada en el proteoma de la base de datos.

Tabla 1. Números de acceso registrado en UniPROT para *M. auratus* y *H. sapiens* correspondiente a las proteínas de interés.

Proteínas	Número de acceso UniPROT	
	<i>M. auratus</i>	<i>H. sapiens</i>
Sonic hedgehog (Shh)	A0A1U7R2A8_MESAU	Q15465 SHH_HUMAN
Patched (Ptc)	A0A1U7QGI0_MESAU	Q13635 PTC1_HUMAN
Smoothened (Smo)	A0A3Q0D3R8_MESAU	Q99835 SMO_HUMAN
Glioma (Gli)	A0A3Q0D683_MESAU	P08151 GLI1_HUMAN

Se identificaron las secuencias inmunógenas de los anticuerpos SHH (E-1):sc-365112, Patched (3B3): sc-293416, Smo (E-5): sc-166685, GLI-1 (A-7): sc-515781 de Santa Cruz Biotechnology como se observa en la tabla 2, las cuales se utilizaron para realizar el análisis de alineamiento de secuencias, contra las proteínas de interés e isoformas, datos mostrados en la tabla 3. Los porcentajes de identidad se encuentran entre el 82 y 100%, con un valor Expect (E-value) cercano a cero, lo cual indica que las secuencias comparadas están relacionadas (Figura 21).

Tabla 2. Anticuerpos comerciales e inmunógenos de Santa Cruz Biotechnology.

Anticuerpo comercial	Secuencia del inmunógeno
SHH (E-1):sc-365112	GPGRGFGKRRHPKLTPLAYKQFIPNVAEKTG
Patched (3B3): sc-293416	HETQITMQSTVQLRTEYDPHTHVYYTTAEPRSEIS VQPVTVTQDTLSCQSPESTSSTRDLLSQFSDSSL HCLEPPCTKWTLSSFAEKHYAPFLLKPKAKV
Smo (E-5): sc-166685	VLCQANVTIGLPTKQPIPDCEIKNRPSLLVEKINLF AMFGTGIAMSTWVWTKATLLIWRRTWCRLTGQS DDEPKRIKSKMIAKAFSKRHELLQNPQGELSFS MHTVSHDGPVAGLAFDLNEPSADVSSAWAQHVT KMVARRGAILPQDISVTPVATPVPPEEQANLWLV EAEEISPELQKRLGRKKKRRKRKKEVCPLAPPE LHPPAPAPSTIPRLPQLPRQKCLVAAGAWGAGDS CRQGAWTLVSNPFCPEPSPPQDPFLPSAPAPVA WAHGRRQGLGPIHSRTNLMDTELMADSDSF
GLI-1 (A-7): sc-515781	VAILDEPQGLSPPPSHDQRGSSGHTPPPSGPPN MAVGNMSVLLRSLPGETEFLNSSA

Tabla 3. Valor expect y porcentajes de términos de BLAST para los alineamientos de inmunógenos y proteínas de interés en *M. auratus*.

Proteína	Secuencia ID	Identidad (%)	Positivos (%)	Gaps (%)	E-value
Shh	XP_005084256.1	100	100	0	6e ⁻¹⁷
Ptc	XP_040612068.1	98	98	0	9e ⁻⁶²
	XP_040612069.1	98	98	0	1e ⁻⁶¹
	XP_040612070.1	98	90	0	1e ⁻⁶¹
Smo	XP_040584541.1	90.76	93	3	0
	XP_040584540.1	90.76	93	3	0
Gli	XP_040610683.1	82.14	89	0	2e ⁻²²
	XP_040610684.1	82.14	89	0	2e ⁻²²

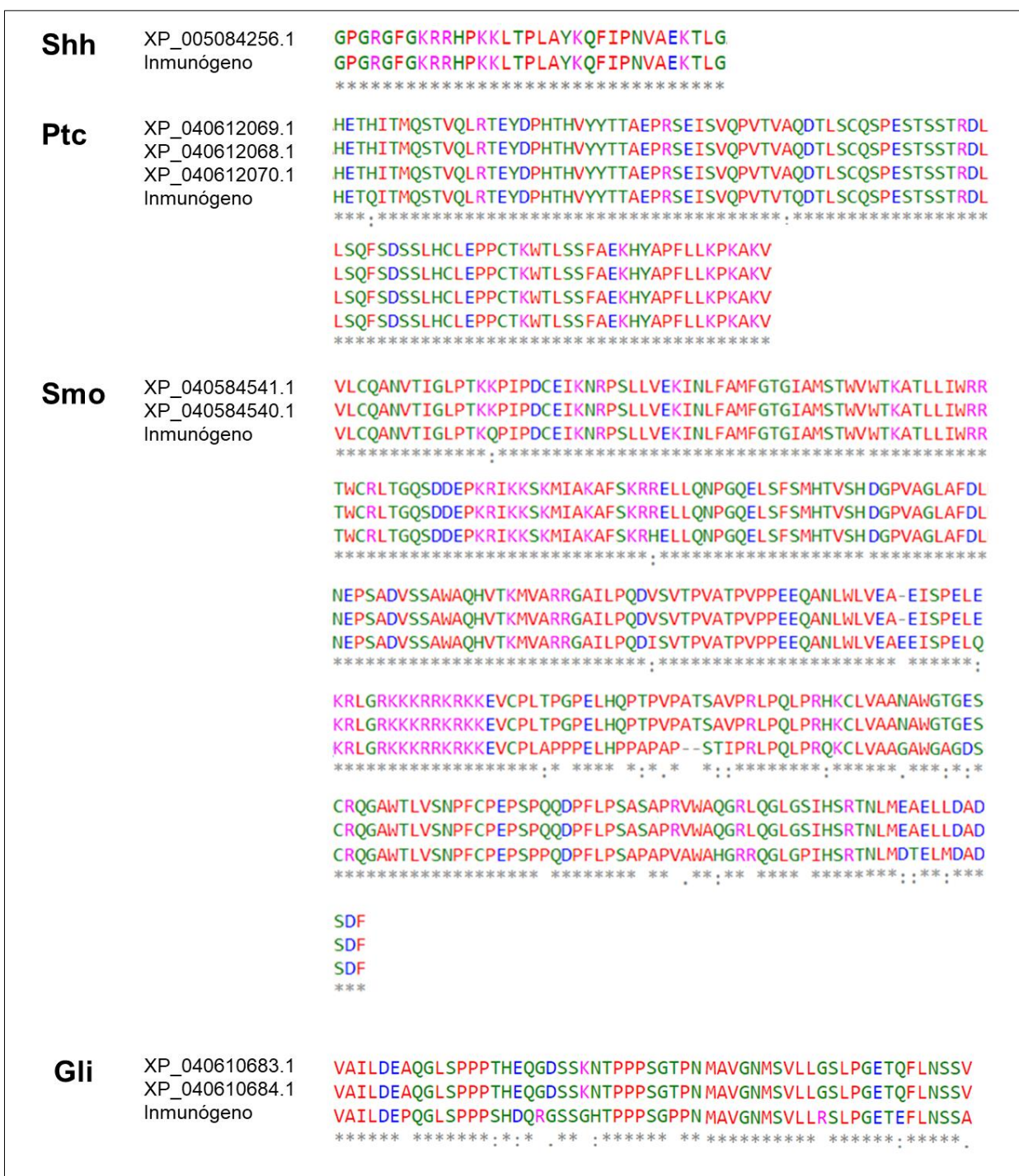


Figura 21. Alineamientos entre inmunógenos y proteínas de interés analizadas por Clustal Omega. *, residuos idénticos; :, residuos conservados; -, gap.

Las secuencias de inmunógenos se analizaron en las bases de datos Protein BLAST y AmoebaDB realizando una búsqueda de posibles proteínas homólogas en *E. histolytica*. Sin embargo, no se encontró ninguna similitud significativa para homólogos en Protein BLAST.

En AmoebaDB solo se identificaron las secuencias con valores de Expect superiores a 1.5 como se observa en la tabla 4, los cuales son considerados como valores altos y sugieren que la similitud entre las secuencias analizadas podrían ser alineamientos al azar, sin coincidencia significativa, lo que indica que son diferentes.

Tabla 4. Valores expect de alineamientos entre inmunógenos de las proteínas de interés y proteínas candidatas de *E. histolytica* HM-1 IMSS en AmoebaDB.

Proteína	Secuencia ID AmoebaDB	E value de alineamiento
Shh	EHI_030130	1.6
Ptc	EHI_059670	9.8
Smo	EHI_103410	2.4
Gli	EHI_072050	1.7

7.8 Análisis de proteína.

7.8.1 Patrones de proteína.

Las muestras obtenidas fueron analizadas mediante un corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida al 12%, en donde se obtuvieron patrones de proteína de las muestras evaluadas en D3 y D6 con la finalidad de comprobar la integridad de los extractos antes de ser transferidos y analizados por western blot. Estos patrones mostraron un patrón diferencial entre las muestras control y los tratamientos (Figura 22).

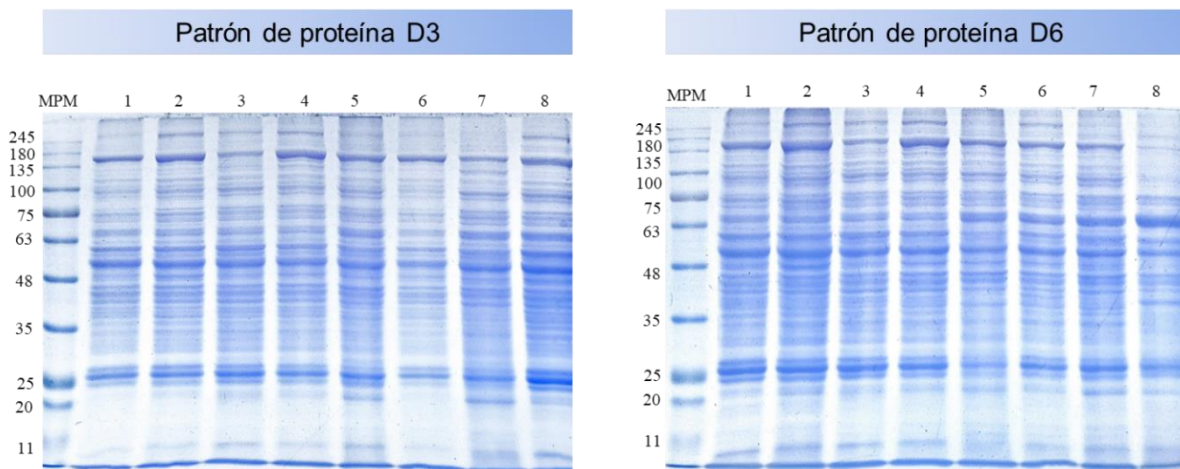


Figura 22. Patrón de proteína. Muestras control (Sano, Me, Ve y Cp) correspondientes a los carriles 1, 2, 3, y 4 y tratamientos (Am, AmCp, AmMe y AmMeCp) correspondientes a los carriles 5, 6, 7 y 8 en D3 y D6. Se observa una expresión diferencial de bandas entre los controles y tratamientos, así como en las dosis evaluadas.

7.8.2 Western blot.

Ante una lesión hepática de tipo mecánico o químico la vía de señalización Hedgehog suele reactivarse con la finalidad de recuperar el tejido perdido por el daño con regeneración óptima. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si esta vía logra reactivarse en respuesta al daño causado por un parásito como *E. histolytica*. Por lo tanto, evaluamos si los componentes centrales de la vía de señalización, como son: ligando Shh, receptores Ptc- Smo y el factor de transcripción Gli se encuentran expresados en las diferentes condiciones de tratamiento y si esta expresión es afectada por la administración de ciclopamina. Se analizaron extractos proteicos de muestras control (Sano, Me, Ve y Cp) y tratamientos (Am, AmCp, AmMe y AmMeCp) obtenidos en D3 y D6.

Los resultados mostraron que la expresión de los constituyentes de la vía de señalización aumenta a partir de D3 en respuesta al daño provocado por el patógeno (Am), mientras que cuando se administra metronidazol, aunque la vía sigue estando activada su expresión es menor (Figura 23 A), además esta activación incrementa conforme la infección progresa (Figura 23 B). Adicionalmente, observamos que la actividad de esta vía se ve disminuida cuando se administra ciclopamina en ambas dosis evaluadas (figura 23).

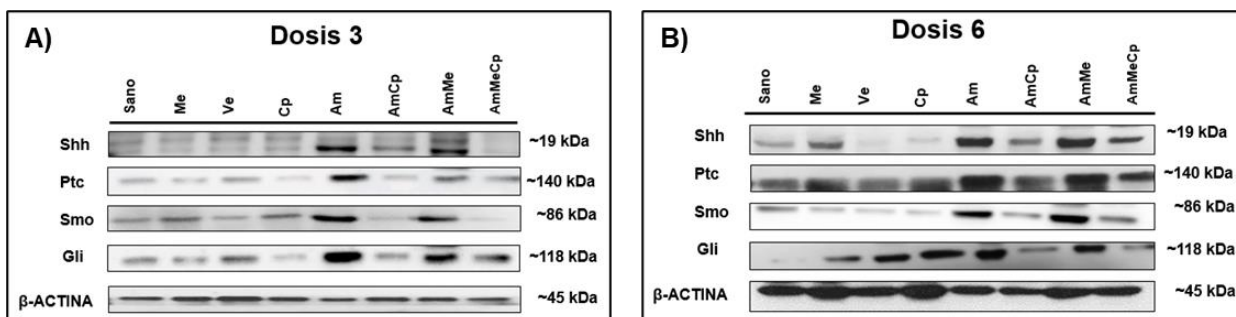


Figura 23. Análisis de western blot. A) Muestras D3. Observamos una expresión diferencial en los grupos tratados Am y AmMe con respecto a la expresión basal de los controles, además observamos una disminución en la expresión de estas proteínas cuando se administra ciclopamina. **B) Muestras D6.** Observamos una expresión diferencial en los grupos tratados Am y AmMe con respecto a la expresión basal de los controles, además observamos una disminución en la expresión de estas proteínas cuando se administra ciclopamina. Se utilizó β-Actina como control de carga.

El análisis de la densidad óptica relativa (DOR) de cada molécula en las dos dosis estudiadas mostró que, en D3 las proteínas constituyentes de esta vía de señalización se expresan en el grupo Am y el grupo AmMe sin embargo, la expresión en el grupo AmMe es menor a la que se presenta en el grupo de Am. Además, Smo receptor responsable de la activación río debajo de la vía presenta un aumento en su expresión a diferencia del ligando y el receptor Ptc acompañado por la expresión del factor de transcripción Gli que solo se encuentra presente cuando Smo presenta actividad. Además, observamos que cuando se administra ciclopamina (inhibidor dirigido a Smo) la expresión de estas moléculas disminuye de manera significativa, siendo Smo y Gli los más afectados por el inhibidor ya que alcanzan niveles basales cuando éste es administrado (figura 24).

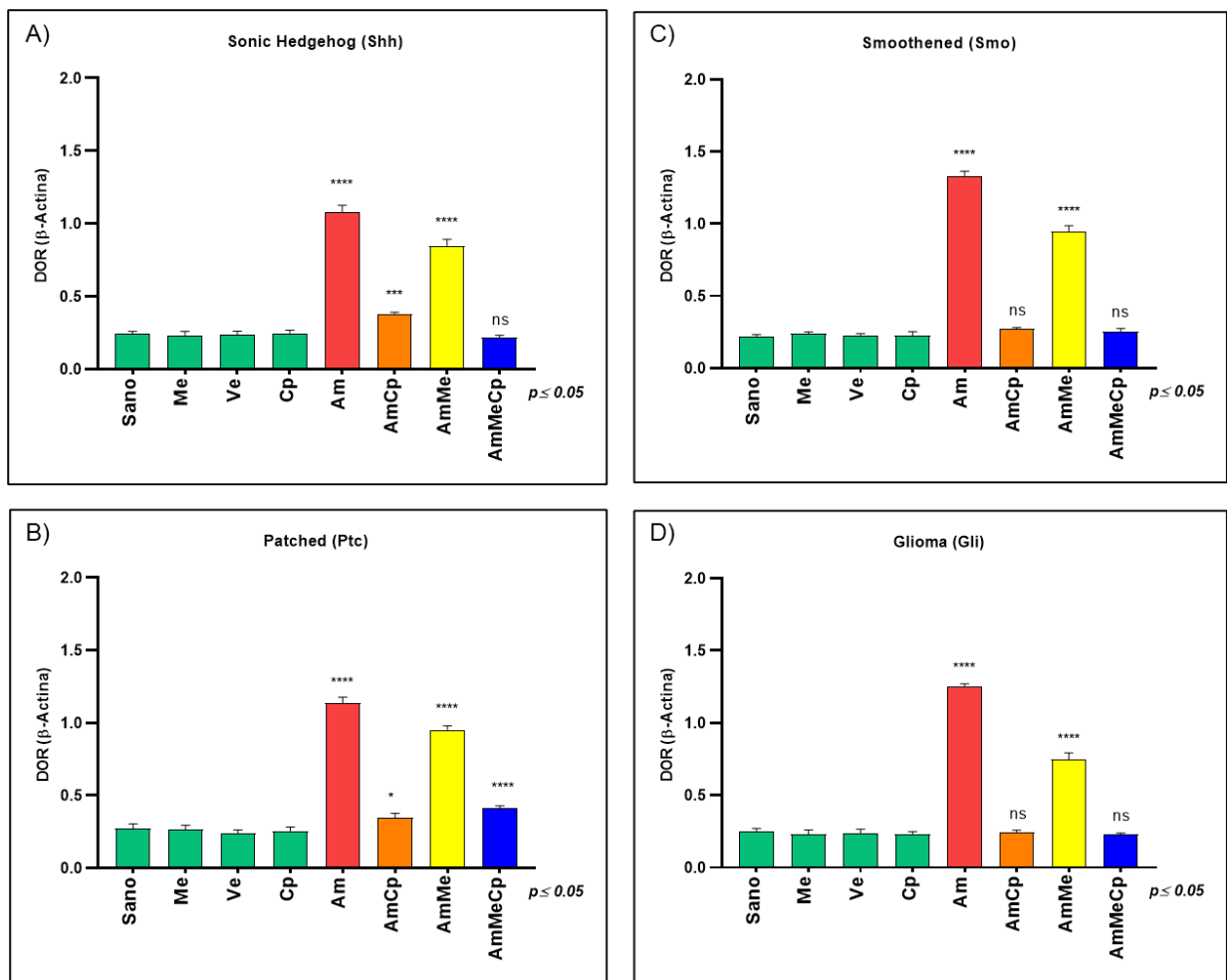


Figura 24. Análisis estadístico D3 de DOR. A) Shh. La expresión del ligando de esta vía se observó en los grupos Am y AmMe, mientras que su expresión disminuyó cuando se administra ciclopamina. **B) Ptc.** La expresión de este receptor se observa en los grupos Am y AmMe, sin embargo, su expresión no alcanza los niveles basales cuando se inhibe la vía de señalización. **C) Smo.** Este receptor fundamental en la actividad de Hh se expresa en los grupos Am y AmMe, sin embargo, su expresión alcanza el basal cuando se administra ciclopamina. **D) Gli.** La expresión del factor de transcripción se observa en los grupos Am y AmMe, mientras que cuando se administra ciclopamina su expresión alcanza el basal. La estadística se determinó mediante análisis de ANOVA unidireccional y prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Se realizó la comparación de los resultados de los tratamientos contra el control sano. Se aceptó significancia al 95%.

En los resultados obtenidos para D6, observamos un comportamiento similar a lo observado en D3, ya que las proteínas analizadas se expresan en el grupo Am y el grupo AmMe y en este último la activación es menor que en el grupo de Am. En el caso de Smo y Gli presentan un aumento en su expresión a diferencia del ligando y el receptor Ptc. Las condiciones evaluadas con inhibidor mostraron una disminución en su expresión,

llegando a niveles casi basales por lo que no muestran diferencia significativa con el control sano (figura 25).

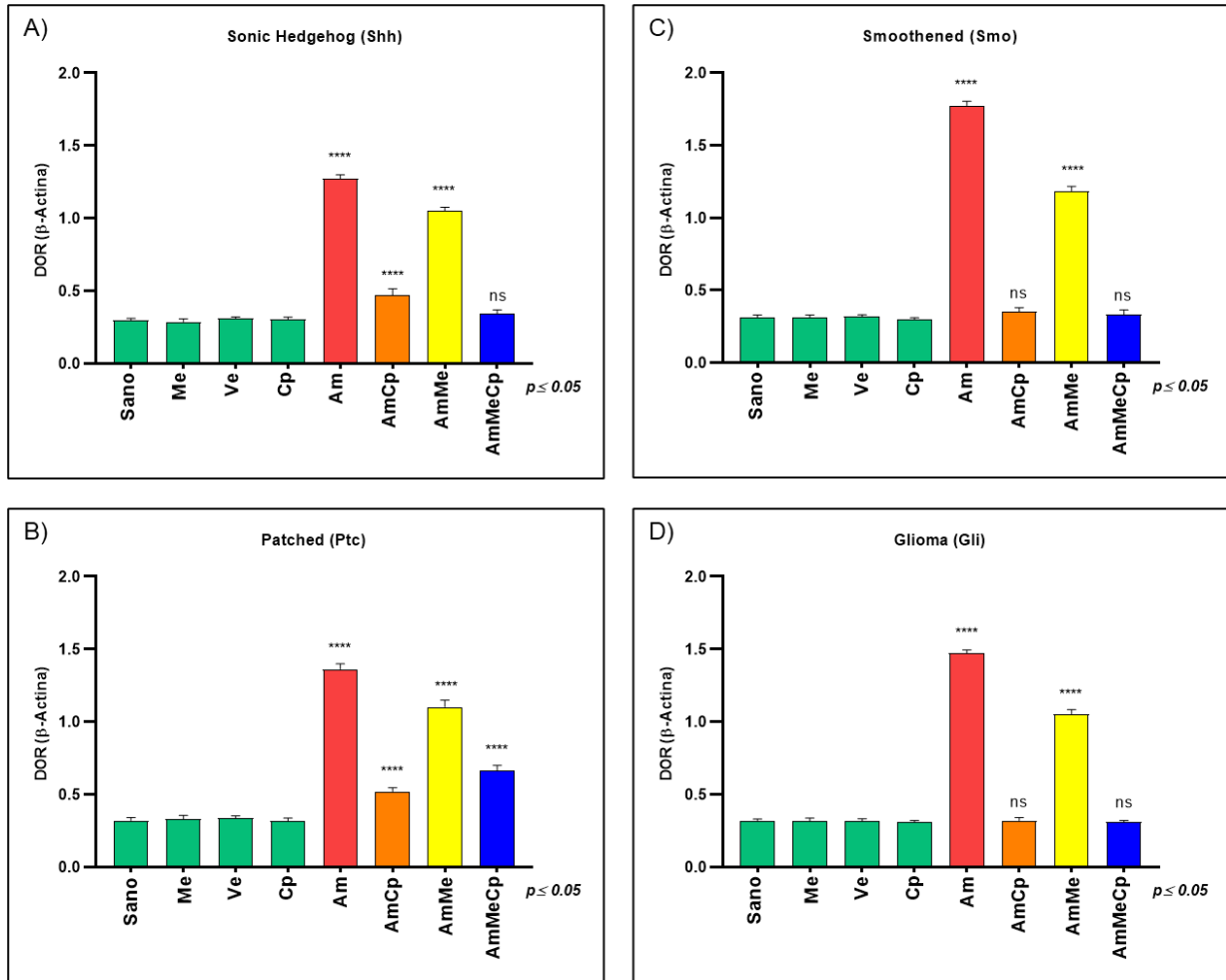


Figura 25. Análisis estadístico D6 de DOR. A) Shh. La expresión del ligando de esta vía se observó en los grupos Am y AmMe, mientras que su expresión disminuyó cuando se administra ciclopamina. **B) Ptc.** La expresión de este receptor se observa en los grupos Am y AmMe, sin embargo, su expresión no alcanza los niveles basales cuando se inhibe la vía de señalización. **C) Smo.** Este receptor fundamental en la actividad de Hh se expresa en los grupos Am y AmMe, sin embargo, su expresión alcanza el basal cuando se administra ciclopamina. **D) Gli.** La expresión del factor de transcripción se observa en los grupos Am y AmMe, mientras que cuando se administra ciclopamina su expresión alcanza el basal. La estadística se determinó mediante análisis de ANOVA unidireccional y prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Se realizó la comparación de los resultados de los tratamientos contra el control sano. Se aceptó significancia al 95%.

En conjunto estos datos sugieren que la vía de señalización Hh juega un papel fundamental durante el proceso de regeneración hepática y contención de daño en el desarrollo y curación del AHA, ya que al encontrarse inhibida la vía de señalización se producen lesiones de mayor tamaño, se observa una respuesta inflamatoria generalizada en el parénquima y la desorganización en la reparación de la MEC lo cual podría estar

estrechamente relacionado a la falta de actividad de esta vía. Además, logramos observar que en D6 la respuesta de la vía de señalización en cuanto al receptor (Smo) y factor de transcripción (Gli) en el grupo Am aumenta en comparación a la expresión en D3, lo que podría atribuirse a que ante la falta del agente encargado de eliminar al trofozoíto (Metronidazol), la respuesta del organismo a nivel celular y molecular se exagera con la única finalidad de tratar de contener el daño causado. Mientras que, cuando se administra metronidazol, la expresión de la vía de señalización disminuye con respecto al grupo de Am, asociada a una respuesta óptima de esta vía mientras el fármaco elimina a la amiba, causando la reparación óptima del daño, aunque a nivel macroscópico ya no se aprecia una lesión, a nivel molecular la respuesta sigue activa.

7.9 Inmunohistoquímica.

La vía de señalización Hh generalmente se encuentra inactiva en el hígado adulto sano, sin embargo, ésta logra reactivarse cuando el hígado sufre algún tipo de daño. Posterior a una hepatectomía parcial, se sabe que esta reactivación es una respuesta organizada de las células residentes lo que asegura una recuperación íntegra y efectiva del órgano^{82,117}. Por lo anterior, fue de interés identificar los tipos celulares involucrados en la respuesta de la activación de la vía en este tipo de daño. Se obtuvieron los controles de anticuerpo en muestras de hígado sano en donde el programa logro detectar señal, aunque ésta fuera muy débil se tomó como señal positiva mientras que en los controles negativos (únicamente anticuerpo secundario) el programa no reconoció fondo o alguna marca positiva (Figura 26).

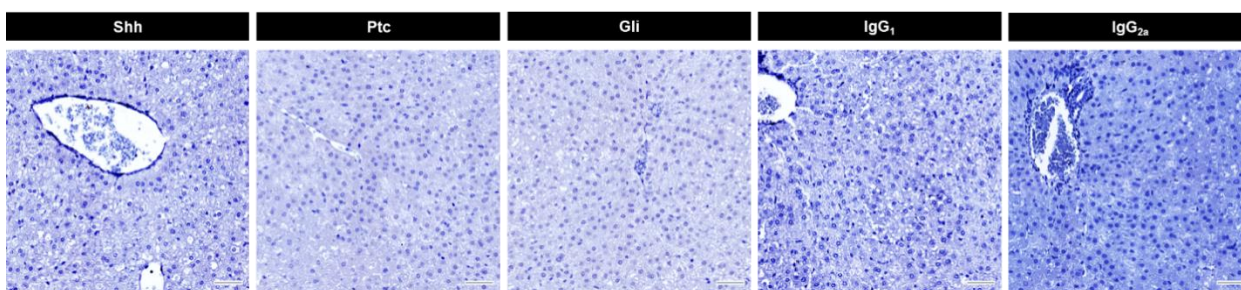


Figura 26. Controles de inmunohistoquímica. Se muestran los controles de los anticuerpos Shh, Ptc y Gli en fragmentos de hígado sano. Se consideraron como controles negativos muestras de hígado sano únicamente con anticuerpo secundario, en donde no observamos fondo ni marca positiva.

El análisis inmunohistoquímico de D3 demostró una marca positiva (color café) en hepatocitos cercanos a las lesiones granulomatosas en los todos los grupos analizados únicamente para Shh, Ptc y Gli. Observamos hepatocitos positivos a la marca en los grupos de Am y AmMe, mientras que los grupos tratados con inhibidor mostraron una disminución en el porcentaje e intensidad de la marca. Además, se realizó la cuantificación del porcentaje de marca positiva para cada condición, para Shh observamos un 75% en el grupo Am, un 28% en el grupo AmCp, un 57% en el grupo AmMe y un 21% en el caso de AmMeCp. En el caso de Ptc observamos un 76% en el grupo de Am, un 32% en AmCp, un 61% en AmMe y un 26% en AmMeCp. Finalmente, el análisis para Gli mostró un 65% en Am, un 22% en AmCp, un 55% en AmMe y un 16%

en AmMeCp. El análisis estadístico mostró diferencia significativa entre los grupos tratados con respecto al control sano (Figura 27).

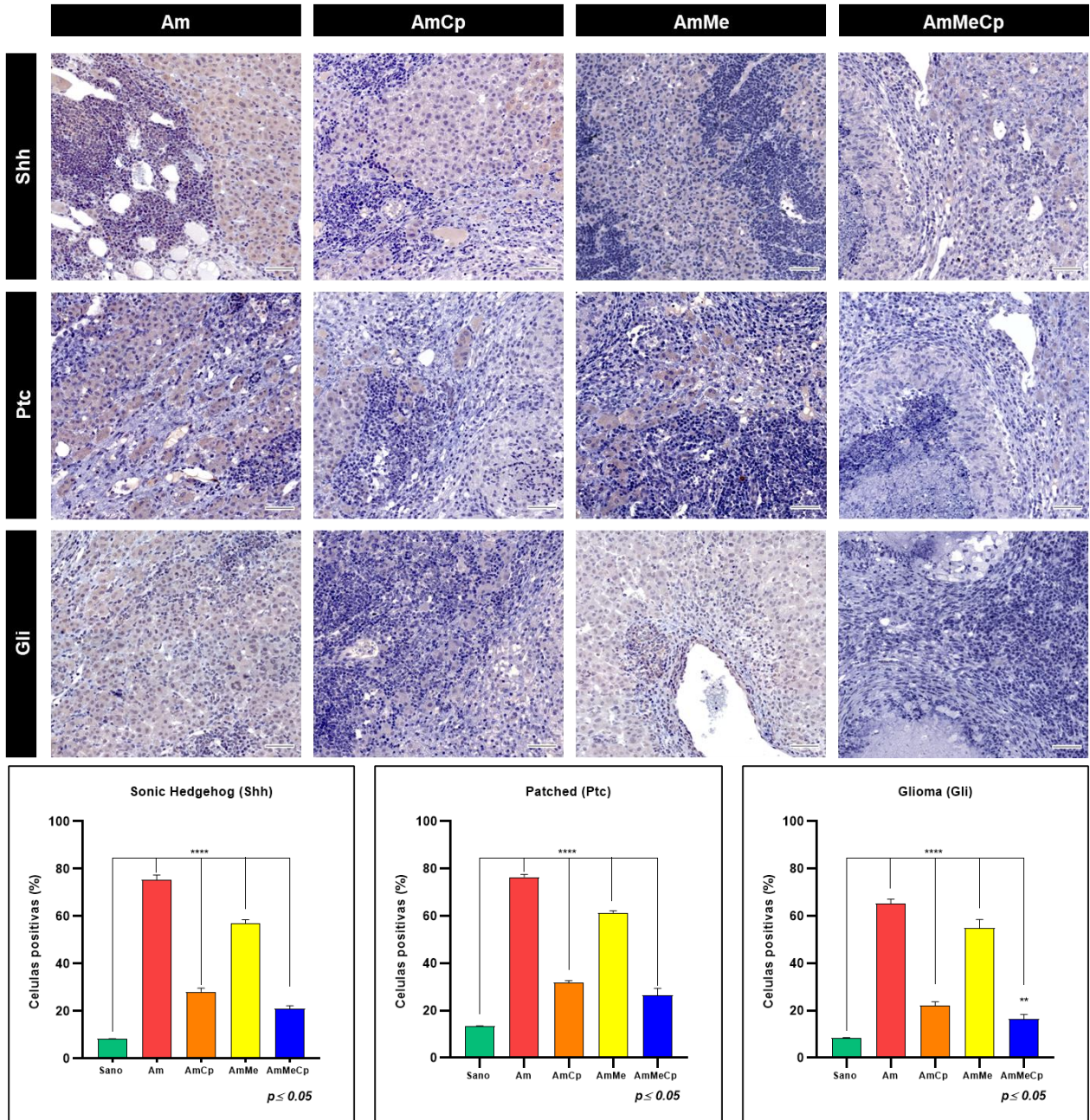


Figura 27. Análisis inmunohistoquímico D3. Los hepatocitos son las principales células que responden a la actividad de Hh en el desarrollo del AHA. Se determinó el porcentaje de células positivas para cada condición en el programa QuPath®, el análisis estadístico mostro diferencia significativa en los cuatro tratamientos con respecto al control. La estadística se determinó mediante análisis de ANOVA unidireccional y prueba de comparaciones múltiples de Dunett. Se acepto significancia al 95%.

El análisis inmunohistoquímico de D6 demostró una marca positiva (color café) en hepatocitos cercanos a las lesiones granulomatosas en los todos los grupos analizados para Shh, Ptc y Gli. Observamos hepatocitos positivos a la marca en los grupos de Am y AmMe, mientras que los grupos tratados con inhibidor mostraron una disminución en el porcentaje e intensidad de la marca. Además, se realizó la cuantificación del porcentaje de marca positiva para cada condición, para Shh observamos un 72% en el grupo Am, un 33% en el grupo AmCp, un 52% en el grupo AmMe y un 22% en el caso de AmMeCp. En el caso de Ptc observamos un 75% en el grupo de Am, un 38% en AmCp, un 45% en AmMe y un 25% en AmMeCp. Finalmente, el análisis para Gli mostró un 62% en Am, un 25% en AmCp, un 36% en AmMe y un 22% en AmMeCp. El análisis estadístico mostró diferencia significativa entre los grupos tratados con respecto al control (Figura 28).

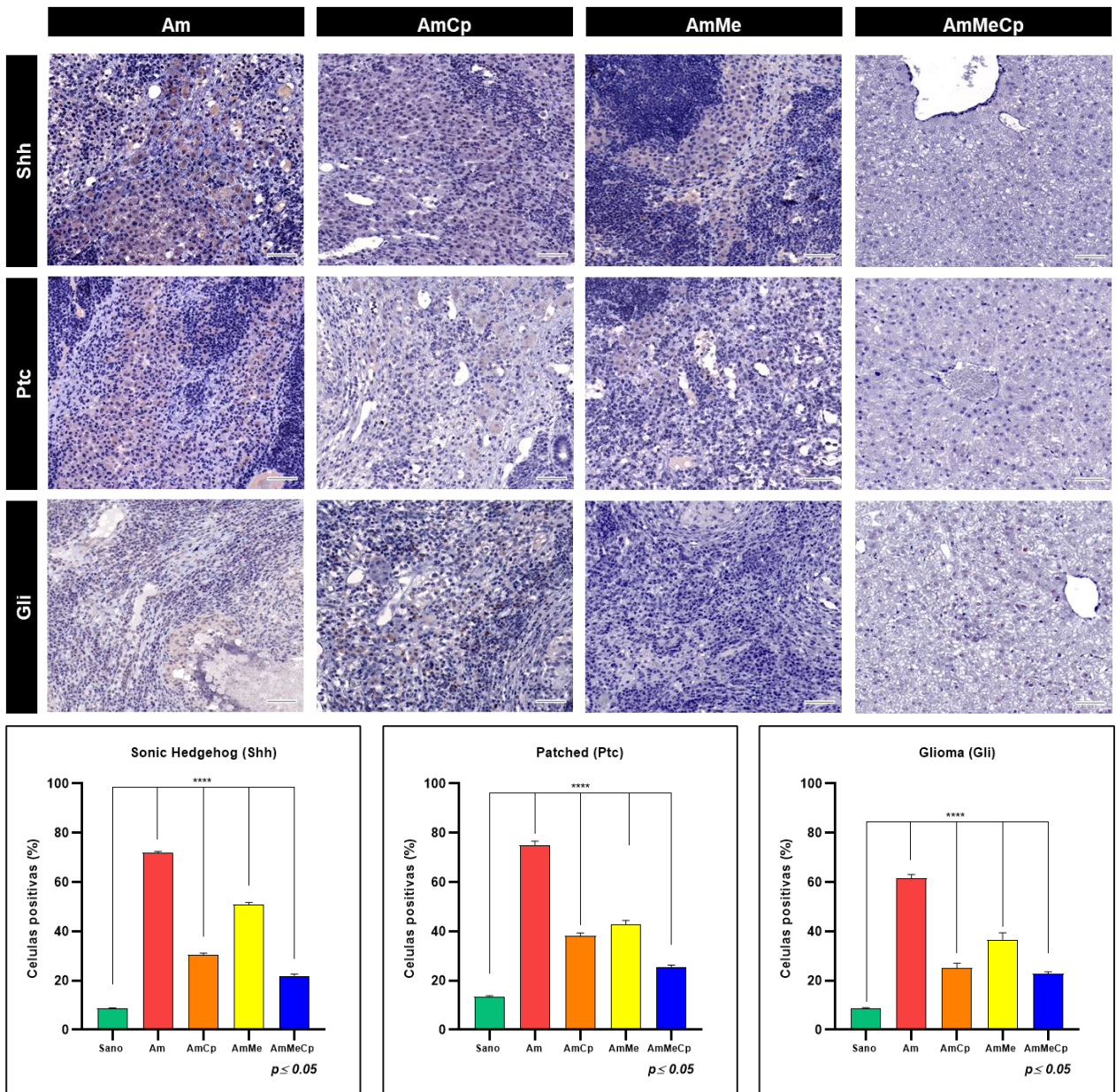


Figura 28. Análisis inmunohistoquímico D6. Los hepatocitos son las principales células que responden a la actividad de Hh en el desarrollo del AHA. Se determinó el porcentaje de células positivas para cada condición en el programa QuPath®, el análisis estadístico mostro diferencia significativa en los cuatro tratamientos con respecto al control. La estadística se determinó mediante análisis de ANOVA unidireccional y prueba de comparaciones múltiples de Dunett. Se acepto significancia al 95%.

VIII.- DISCUSIÓN.

El absceso hepático amibiano (AHA) es la manifestación extraintestinal más común de la amibiasis invasiva en el humano y es causado por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica*. El AHA se caracteriza por ser una lesión localizada más comúnmente en el lóbulo derecho del hígado formado por material líquido espeso e inodoro marrón amarillento ⁴¹. El tratamiento más común hasta ahora es el metronidazol ²⁸, que elimina la amiba; si se administra oportuna y adecuadamente, la mayoría de las personas se recuperan completamente, de no ser así esta enfermedad puede ser potencialmente mortal.

El estudio experimental de esta enfermedad se ha realizado en diversos modelos animales como ratones, jerbos y hámsteres ⁴⁶. Estos modelos han permitido determinar diversas características macroscópicas, histopatológicas y moleculares presentes durante el desarrollo del AHA experimental. Las lesiones descritas en los hámsteres macroscópicamente son de apariencia grumosa y blanquecina, en su mayoría localizadas en el lóbulo izquierdo (cuando se realiza una inoculación intrahepática de los trofozoítos) o pueden encontrarse dispersas en todo el órgano (cuando la inoculación se realiza por vía portal)⁴⁶.

Por otra parte, se ha descrito mediante el análisis histopatológico que, en etapas tempranas de la infección, la presencia de infiltrado inflamatorio se encuentra constituido principalmente por polimorfonucleares y macrófagos; conforme la lesión progresa se desarrollan lesiones granulomatosas acompañadas por zonas extensas de necrosis y respuesta inflamatoria exacerbada ¹¹. Sin embargo, hasta el momento se conoce que el daño provocado al tejido hepático no está directamente relacionado con los mecanismos amibianos, en este sentido, se ha proporcionado evidencia de que, en las fases aguda y crónica, el daño al tejido del huésped es causado por la respuesta inmunitaria, la cual contribuye a la patogénesis del AHA debido a la excreción de enzimas contenidas en las células inflamatorias que son lisadas por los trofozoítos ^{11,139}.

Este padecimiento implica una respuesta compleja del sistema inmunológico y diversas vías de señalización que no se han descrito. Estas vías de señalización forman parte de una red compleja de respuestas inmunitarias e inflamatorias destinadas a eliminar la infección y promover la reparación del tejido dañado en el hígado ¹⁴⁰. La respuesta a la

infección es rápida y compleja, con una mayor expresión de genes vinculados a la defensa del huésped mediante diversas citocinas implicadas en la respuesta inflamatoria y la atracción de células inmunitarias al sitio de infección, interferones encargados de la modulación inmunitaria, así como genes asociados a la apoptosis y regeneración ¹⁴¹.

La regeneración hepática es un fenómeno sorprendente que caracteriza al hígado y le otorga una notable capacidad para recuperarse después de lesiones o daños. A diferencia de muchos otros órganos, el hígado puede regenerarse completamente, restaurando su estructura y función original ^{84,88,142}. Este proceso está regulado por diversas señales moleculares y vías de señalización. Entre ellas, la vía de señalización del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), la vía de señalización del factor de crecimiento hepático (HGF) ^{89,93}, adicionalmente, se han descrito otras vías como: vía Notch, encargada de la transcripción de genes involucrados en proliferación, diferenciación y revascularización ^{52,97}, vía Hippo encargada de la transcripción de genes involucrados en procesos de proliferación ^{52,87} y vía Hedgehog (Hh), crítica para la recuperación normal del tejido después de una hepatectomía parcial (Hp) induciendo la transcripción de genes involucrados en proliferación, supervivencia y diferenciación ⁸⁷.

La vía de señalización Hh, regula diversas decisiones del destino celular, incluida la proliferación, apoptosis, migración y diferenciación, además participa en la morfogénesis de los tejidos durante el desarrollo fetal; en el adulto juega un papel importante en la cicatrización y la regeneración en diversos órganos por lesiones mecánicas y patológicas ¹⁰⁹. En el hígado adulto los efectos de su activación incluyen la regeneración, fibrosis y remodelación vascular, mientras que su activación aberrante se ha relacionado principalmente en la patogénesis de la cirrosis y el cáncer hepático ^{82,117,143,144}.

La activación inapropiada de la vía de señalización se ha asociado a diversas enfermedades lo que ha llevado al estudio de diversos inhibidores que pudiesen ser utilizados como posibles agentes terapéuticos ¹⁴⁵. El inhibidor más utilizado en diversos estudios experimentales ha sido la ciclopamina, la cual bloquea la vía de señalización Hh mediante su unión al co-receptor Smo ¹¹¹. Este inhibidor se obtuvo de la planta *V. californicum* ¹⁴⁶, la cual fue descubierta debido a que ovejas que la pastaban en tiempo de sequía daban origen a fetos cíclopes ^{128,129}. Su estudio se ha realizado en animales

de experimentación en donde se han determinado las dosis adecuadas que deben administrarse para poder evaluar su efecto sin causar reacciones secundarias ¹³².

De momento, se sabe poco del proceso de regeneración durante el AHA. La administración oportuna con metronidazol provoca la curación de la lesión con una óptima regeneración acompañada de macrófagos espumosos, proliferación de conductos biliares, hepatocitos y vasos de neoformación sin dejar tejido de cicatrización ¹³⁶. Se ha descrito la presencia de diferentes citocinas y factores de crecimiento como IL-1 β , TNF- α , IL-10, IL-6, HGF, IGF, VEGF y TGF- β que participan durante el proceso de regeneración hepática durante la administración de metronidazol, se demostró que estas moléculas se activan en distintas etapas, mientras que la remodelación de la matriz extracelular proceso característico de la regeneración, inicialmente se caracteriza por un aumento en la presencia de colágeno tipo 1, que va disminuyendo considerablemente durante el proceso de regeneración ¹³⁸. Adicionalmente se han identificado algunos tipos celulares productores de estas moléculas entre los que se encuentran las células inflamatorias, hepatocitos de neoformación y células espumosas ¹⁴⁷.

Sin embargo, en el caso del AHA, la regeneración puede verse afectada según la gravedad de la infección y el daño tisular. La presencia de *E. histolytica* en el hígado desencadena una respuesta inflamatoria como parte del intento del sistema inmunológico para eliminar la infección, una vez que se logra la eliminación exitosa de la infección mediante la administración de tratamiento el proceso de regeneración hepática puede ser más efectivo. Es importante destacar que el proceso de regeneración hepática es altamente variable y depende de varios factores, incluida la salud general del individuo, la gravedad de la infección y la presencia de complicaciones. Se ha demostrado que la inflamación inducida en lesiones hepáticas de distinto origen, puede ser tanto benéfica como perjudicial para el proceso de regeneración y reparación de las funciones del hígado. Una respuesta inflamatoria moderada y leve logra ser beneficiosa brindándole a este órgano un efecto hepatoprotector, contribuye a su reparación y promueve su recuperación. Por el contrario, la respuesta inflamatoria excesiva suele ser permanente e intensa logrando agravar la lesión promoviendo procesos fibróticos que logran desencadenar respuestas cirróticas e incluso cancerígenas ¹⁴⁸.

Con el objeto de determinar el papel que desempeña la vía de señalización hedgehog en la regeneración hepática en el AHA cuando éste es tratado oportunamente, se realizó la comparación de las lesiones producidas en los hígados de hámster tras la inoculación intrahepática (ih) de trofozoítos virulentos de *E. histolytica* a diferentes tiempos. Los resultados nos permitieron observar que durante el proceso de infección amibiana hepática, sin administración de tratamiento (antiamibiano), la vía de señalización se activa como respuesta ante la presencia de daño, ya que su inhibición (con ciclopamina) da como resultado abscesos de mayor tamaño, además, se demostró que durante la administración de metronidazol la vía de señalización se encuentra activa y favorece el proceso de regeneración mientras el metronidazol se encarga de eliminar al patógeno.

En el caso de D3 las lesiones obtenidas de los animales tratados con ciclopamina aumentaron en un 20% en comparación con las lesiones obtenidas en los animales cuya vía se encuentra activa. Por otra parte, las lesiones obtenidas de los animales administrados con tratamiento antiamibiano cuya vía de señalización fue inhibida, el resultado fue un aumento del 17% en las lesiones, en comparación con los animales a los que no se les administró inhibidor, pero si metronidazol. Mientras que el aumento de las lesiones en D6 fue un aumento del 13% en las lesiones obtenidas de animales tratados con ciclopamina y un aumento del 7% en los animales tratados con ciclopamina y metronidazol. Estos resultados podrían deberse a que la vía de señalización, al encontrarse activa, desde el proceso de infección, intenta repara el daño, mientras que el metronidazol actúa en contra del parásito, así, al no existir la presencia del fármaco antiparasitario y presentarse una respuesta inflamatoria exacerbada que el mismo organismo produce como resultado de la defensa al huésped, no se logra contener por completo el daño. Un dato muy importante en el caso del efecto en D6 es que al administrar metronidazol ya no se obtiene lesiones cuantificables solo la presencia de un puntillero presente en el área de inoculación de las amibas, sin embargo, al inhibir esta vía y administrar el metronidazol pudimos observar que aún se obtienen lesiones pequeñas pero cuantificables. Estos datos son relevantes ya que nos sugieren un posible retraso en el proceso de recuperación del órgano debido a la falta de actividad de la vía. El efecto en el tamaño de lesiones obtenidas cuando se administra ciclopamina, ha sido previamente reportado, en hígados de ratones a los que se les realizaron hepatectomías parciales, aunque en este tipo de daño no se encuentra presente un patógeno, el proceso

de recuperación de la masa reseca se ve afectado cuando se administra inhibidor de esta vía de señalización ⁸².

Por otra parte, se sabe que durante la administración de metronidazol en el AHA se presenta una respuesta inflamatoria focalizada constituida principalmente por polimorfonucleares y macrófagos, hay, además un aumento en la aparición de macrófagos espumosos, disminución gradual de granulomas, aumento en el número de hepatocitos de neoformación, proliferación de conductos biliares y presencia de tejido fibroso, hasta llegar a una curación *ad integrum* del órgano ¹³⁶. El análisis histopatológico realizado en este estudio mostró cambios importantes en los grupos tratados con ciclopamina, en D3 se observó una respuesta inflamatoria generalizada, un aumento en el tamaño de las lesiones granulomatosas, aumento de fibras de colágena, disminución de vasos y hepatocitos de neoformación en comparación de lo observado en el grupo tratado con metronidazol, en donde aún se observa lesión a nivel macroscópico sin embargo, a nivel histopatológico hay presencia de regeneración. En los grupos analizados en D6 observamos un aumento en el daño histopatológico generado cuando se administra ciclopamina en comparación con lo observado cuando se administra metronidazol ya que macroscópicamente no se observa una lesión y a nivel histopatológico se observa un parénquima hepático de apariencia normal, estos resultados confirman que el proceso de regeneración se ve afectado cuando se inhibe la vía Hh, lo que causa una respuesta inflamatoria exacerbada en respuesta a la presencia del parásito.

Hasta el momento se sabe que la inflamación juega un papel importante en el desarrollo del AHA, ya que se asocia directamente al daño causado en este órgano por la excreción de enzimas contenidas en las células inflamatorias lisadas por los trofozoítos ^{11,139}. En el contexto de la inflamación, se ha observado que la vía Hh puede afectar la función de células inmunológicas y modular la producción de mediadores inflamatorios, regula la respuesta inflamatoria en el intestino de los mamíferos ¹⁴⁹ así como eventos mediados por el sistema inmunológico como respuesta a la fibrosis hepática ¹⁴³. Sin embargo, la relación exacta entre la vía Hh y la respuesta inflamatoria en el daño causado por un parásito aún no se encuentra descrita, por lo que es de interés continuar con esta investigación para lograr comprender la asociación existente entre la respuesta inflamatoria y la activación e inhibición de la vía de señalización en este tipo de daño.

Además, se ha reportado que la activación la vía de señalización Hh regula la activación de células estelares responsables del mantenimiento de la homeostasis de la matriz extracelular del hígado (MEC), por lo que, en respuesta al daño, estas células se activan adquiriendo un fenotipo más fibroblástico dando como resultado, la promoción y regulación de respuestas de reparación fibrogénica durante la lesión hepática ⁸². Los resultados en D3 mostraron un aumento en la deposición de fibras de colágeno en los grupos tratados con ciclopamina, localizadas entre los granulomas y alrededor de ellos, formando una red compleja que le confiere resistencia al hígado dañado en comparación con aquellos grupos que no fueron tratados con este inhibidor, en donde se observa la formación de fibras más finas y tenues localizadas entre los granulomas. El análisis para D6 mostro un aumento en la deposición de fibras de colágeno anormales en los grupos tratados con ciclopamina a diferencia de lo observado en los grupos a los cuales no se les administró este inhibidor. Estos resultados sugieren que la vía Hh se encuentra involucrada en la regulación de la remodelación de la MEC, ya que cuando esta se encuentra ausente la generación de fibras de colágeno aumenta conforme aumentan los días de desarrollo del AHA, lo que podría estar asociado a una disminución en la activación de células estelares ⁸² o a la existencia de otros mecanismos activos encargados de restaurar y renovar la MEC durante la regeneración en el AHA.

Una vez determinados los cambios macroscópicos e histopatológicos causados por la inhibición de la vía de señalización, se realizó el análisis molecular de los componentes de la vía de señalización. Debido a que los anticuerpos utilizados para nuestro modelo de estudio no eran específicos de especie, realizamos el análisis bioinformático para identificar su reconocimiento en nuestro modelo experimental (*Mesocricetus auratus*). Los resultados del análisis in silico permitieron identificar a las proteínas homólogas (Shh, Ptc, Smo y Gli) en nuestro modelo de estudio permitiendo continuar con el análisis proteómico de western blot e inmunohistoquímica de manera confiable. Si bien previamente se ha reportado que esta vía de señalización se expresa en el modelo de hámster adulto, solo se conocen sus efectos y función durante el transporte axonal anterógrado cerebral ¹⁵⁰. Estos datos sugieren que continuar con el estudio de esta vía de señalización en el modelo del AHA sin anticuerpos comerciales específicos de especie dan resultados certeros.

El análisis realizado por western blot demostró que la vía Hh se encuentra activa en presencia del patógeno *E. histolytica*, mientras que su expresión disminuye cuando se administra el tratamiento antiamebiano. La mayoría de los estudios realizados sobre esta vía de señalización aseguran que la actividad en hígados sanos es indetectable ¹⁵¹, pero los niveles basales de esta vía en nuestro modelo utilizado (Hámster) nos demostraron su existencia en hígado sano. El análisis de los grupos tratados para D3 demostró la expresión de las moléculas de la vía de señalización (Shh, Ptc, Smo y Gli), no solo en el grupo AmMe sino también en el grupo Am, observamos una expresión diferencial entre ambos grupos ya que la mayor expresión se observó en el grupo Am, mientras que los grupos tratados con ciclopamina su expresión disminuye. En el caso de la condición de D6 se observó un aumento en la expresión de estas moléculas en el grupo de Am, mientras que el grupo de AmMe mantuvo una expresión menor con respecto a lo observado en el grupo con antiamebiano, de la misma manera la administración de ciclopamina afectó la actividad de Hh. Los grupos analizados en ambas dosis demostraron tener diferencia significativa con respecto a la expresión basal de los controles presentados. Estos datos nos sugieren que Hh juega un papel fundamental en este tipo de daño ya que su inhibición en animales que no son tratados con antiamebiano las lesiones que se forman son de mayor tamaño en comparación con aquellas lesiones que se producen en presencia del parásito con la vía activada permitiendo que el organismo responda al daño intentando contenerlo y por ende que este no sea mayor como ocurre en ausencia de la vía. En el caso de las Hp, la expresión de estas moléculas se activa inmediatamente después de la Hp presentando un aumento en la expresión de ligandos, receptores y factor de transcripción, regulando el proceso de regeneración, cuando esta vía se inhibe, afecta el proceso de regeneración incluso causando la muerte de los animales ⁸². Por tanto, sería muy importante evaluar la presencia de esta vía en etapas tempranas y tardías de la infección, para determinar en qué momento se alcanza la expresión mínima y máxima y a qué conlleva esta activación. Además de indagar cuáles pudieran ser aquellos otros mecanismos moleculares que se encuentran asociados a esta activación que en conjunto den como resultado la regeneración óptima de este órgano después de haber sufrido daño ante la presencia de este parásito.

La señalización Hh puede iniciarse mediante mecanismos autocrinos, paracrinos o endocrinos dependiendo la fuente de ligandos, es decir si la propia célula responde a Hh,

o si son células vecinas o células en tejidos lejanos los encargados de liberar ligandos Hh. Específicamente en el hígado los hepatocitos, colangiocitos y células estelares pueden liberar o responder a los ligandos Hh ¹¹³. Diversos estudios han determinado la expresión de los componentes de la vía de señalización en diferentes tipos de cáncer ¹⁵²⁻¹⁵⁸, así como en la enfermedad hepática alcohólica ^{114,159} y la regeneración hepática posterior a una hepatectomía parcial ^{82,151,160}, estos estudios han demostrado que la vía de señalización responde en diversos tipos celulares, en el caso específico del hígado se han identificado a los hepatocitos, colangiocitos y células estelares como células positivas a los componentes de la vía de señalización. El análisis realizado mediante inmunohistoquímica en este trabajo nos permitió identificar a los hepatocitos como las principales células que responde a la vía de señalización en algunas de sus moléculas constituyentes como ligando (Shh), receptor (Smo) y factor de transcripción (Gli). La inhibición de la vía de señalización provoca una disminución en el porcentaje de células positivas a la marca, pero esta inhibición no es total. Es importante considerar para futuros experimentos el análisis de secciones de hígado más alejados a la lesión, para de esta manera poder determinar si existe respuesta de la vía en otros tipos celulares como en el caso de la Hp.

La enfermedad hepática crónica es una de las enfermedades más comunes en todo el mundo. La alteración de la regeneración del hígado debido a diversas causas, como el envejecimiento, los trastornos metabólicos y las infecciones, puede provocar insuficiencia hepática. Los resultados del presente trabajo sugieren que la inducción dirigida de la vía de señalización de Hh puede contribuir a la regeneración del hígado en estos trastornos realizados en condiciones estrictamente controladas ¹⁶¹.

En resumen, presentamos las primeras bases que relacionan la activación de la vía de señalización Hh en el AHA, la cual participa en el proceso de regeneración hepática dando como resultado la recuperación óptima del tejido sin dejar tejido de cicatrización. Sin embargo, hacen falta más estudios que permitan sentar las bases del papel que esta vía de señalización juega en este tipo de daño causado por un parásito, en particular ¿qué moléculas están involucradas en su activación? y ¿qué moléculas son activadas por la misma?. Lo que podría contribuir al mejor entendimiento del proceso de regeneración *ad integrum* que se da en el AHA y no en otros tipos de daño como la fibrosis y la cirrosis hepática.

IX.- CONCLUSIONES.

- La inhibición de la vía de señalización induce lesiones de mayor tamaño.
- El análisis histopatológico de los grupos tratados con ciclopamina mostró una respuesta inflamatoria generalizada, lesiones granulomatosas de mayor tamaño y disminución en la aparición de células características del proceso regenerativo.
- La vía de señalización se encuentra activa no solo en el grupo tratado con metronidazol sino también cuando la infección se encuentra en desarrollo sin la administración del fármaco, además la administración con ciclopamina disminuye la expresión de las moléculas constituyentes de Hh. Estos datos nos sugieren que esta vía de señalización es fundamental en el proceso de recuperación del parénquima dañado.
- Los hepatocitos son las principales células que responden a la activación de Hh en el desarrollo del AHA.

X.- PERSPECTIVAS.

- Evaluar si la ciclopamina posee algún efecto sobre las amibas.
- Realizar una cinética con tiempos más cortos del desarrollo del AHA para identificar en qué momento se activa la vía de señalización.
- Analizar la expresión de citocinas y factores de crecimiento que se expresan cuando la vía de señalización se encuentra activada.
- Analizar la presencia de células estelares mediante western blot e inmunohistoquímica.
- Analizar la presencia de células progenitoras mediante el uso de marcadores.

XI.- REFERENCIAS

1. Espinosa-Cantellano, M. & Martinez-Palomo, A. Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. *Clin Microbiol Rev* **13**, 318–331 (2000).
2. Nasrallah, J. *et al.* Updates on the worldwide burden of amoebiasis: A case series and literature review. *J Infect Public Health* **15**, (2022).
3. Lozano, R. *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* **380**, (2012).
4. Murray, C. J. L. *et al.* Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* **380**, (2012).
5. MacFarlane, R. C., Shah, P. H. & Singh, U. Transcriptional profiling of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Int J Parasitol* **35**, 533–542 (2005).
6. Bruckner, D. A. Amebiasis. *Clin Microbiol Rev* **5**, 356–369 (1992).
7. Haque, R., Huston, C. D., Hughes, M., Houpt, E. & Petri, W. A. Amebiasis. *New England Journal of Medicine* **348**, 1565–1573 (2003).
8. Shirley, D.-A. T., Farr, L., Watanabe, K. & Moonah, S. A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis. *Open Forum Infect Dis* **5**, (2018).
9. Marie, C. & Petri, W. A. Regulation of Virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol* **68**, 493–520 (2014).
10. Haque, R. *et al.* Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *J Clin Microbiol* (2000).
11. Tsutsumi, V., Mena-Lopez, R., Anaya-Velazquez, F. & Martinez-Palomo, A. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol* **117**, 81–91 (1984).

12. Espinosa-Cantellano, M. & Martínez-Palomo, A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* **13**, 318–31 (2000).
13. Trejos-Suárez, J. & Castaño-Osorio, J. C. Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. *Infectio* **13**, 100–110 (2009).
14. Petri, W. A. & Ravdin, J. I. Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: The role of amebic adherence and contact-dependent cytolysis in pathogenesis. *Eur J Epidemiol* **3**, (1987).
15. Frederick, J. R. & Petri, W. A. Roles for the galactose-/N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba* in parasite virulence and differentiation. *Glycobiology* **15**, 53R-59R (2005).
16. Saffer, L. D. & Petri, W. A. Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. *Infect Immun* **59**, 4681–3 (1991).
17. Voigt, H. & Guillén, N. New insights into the role of the cytoskeleton in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* **1**, 195–203 (1999).
18. Que, X. & Reed, S. L. Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis. *Clin Microbiol Rev* **13**, 196–206 (2000).
19. Stanley, S. L. The *Entamoeba histolytica* genome: something old, something new, something borrowed and sex too? *Trends Parasitol* **21**, 451–453 (2005).
20. Hellberg, A., Nickel, R., Lotter, H., Tannich, E. & Bruchhaus, I. Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. *Cell Microbiol* **3**, 13–20 (2001).
21. Scholze, H. & Schulte, W. On the specificity of a cysteine proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Biomed Biochim Acta* **47**, 115–23 (1988).
22. Bruchhaus, I., Loftus, B. J., Hall, N. & Tannich, E. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot Cell* **2**, 501–9 (2003).

23. Leippe, M., Bruhn, H., Hecht, O. & Grötzinger, J. Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. *Trends Parasitol* **21**, 5–7 (2005).
24. Ralston, K. S. & Petri, W. A. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol* **27**, 254–263 (2011).
25. Leippe, M. Amoebapores. *Parasitol Today* **13**, 178–83 (1997).
26. López, Quiroz & Pinilla. Diagnóstico de amebiasis intestinal y extraintestinal
Diagnosis of intestinal and extraintestinal amebiasis. *Acta Med Colomb* (2008).
27. Ali, I. K. M., Clark, C. G. & Petri, W. A. Molecular epidemiology of amebiasis. *Infection, Genetics and Evolution* **8**, 698–707 (2008).
28. Hughes, M. A. & Petri, W. A. Amebic liver abscess. *Infect Dis Clin North Am* **14**, 565–82, viii (2000).
29. Freeman, C. D., Klutman, N. E. & Lamp, K. C. Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs* vol. 54 Preprint at <https://doi.org/10.2165/00003495-199754050-00003> (1997).
30. Löfmark, S., Edlund, C. & Nord, C. E. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. in *Clinical Infectious Diseases* vol. 50 (2010).
31. Kerscher, L. & Oesterhelt, D. Pyruvate : ferredoxin oxidoreductase — new findings on an ancient enzyme. *Trends Biochem Sci* **7**, 371–374 (1982).
32. Müller, M. Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. *Surgery* (1983) doi:10.5555/uri:pii:0039606083902957.
33. Samarawickrema, N. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **40**, 833–840 (1997).
34. Meri, T., Jokiranta, T. S., Suhonen, L. & Meri, S. Resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole: Report of the first three cases from Finland and optimization of in vitro susceptibility testing under various oxygen concentrations. *J Clin Microbiol* (2000).

35. Mata-Cárdenas, B. D., Vargas-Villarreal, J., González-Salazar, F., Palacios-Corona, R. & Said-Fernández, S. A new vial microassay to screen antiprotozoal drugs. *Pharmacologyonline* (2008).
36. Elizondo-Luévano, J. H. *et al.* In Vitro Study of Antiamoebic Activity of Methanol Extracts of *Argemone mexicana* on Trophozoites of *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* **2018**, 1–8 (2018).
37. Olivos-García, Alfonso., Saavedra,Emma., Nequiz,Mario y Pérez-Tamayo, R. Amibiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica* visión. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM* 10–20 (2011).
38. Li, J., Cui, Z., Li, X. & Zhang, L. Review of zoonotic amebiasis: Epidemiology, clinical signs, diagnosis, treatment, prevention and control. *Research in Veterinary Science* vol. 136 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.02.021> (2021).
39. Fleeta Zaragozano, J., Bueno Lozano, O. & Bueno Lozano, M. Amebiasis intestinal y absceso hepático amebiano. *Medicina Integral* (2000).
40. Tannich, E., Mirelman, D. & Petri, W. A. Meeting report: EMBO workshop 'Pathogenesis of amoebiasis: from genomics to disease', Institut Pasteur, Paris, May 19-22, 2003. *Protist* **154**, 293–8 (2003).
41. Anesi, J. A. & Gluckman, S. Amebic liver abscess. *Clin Liver Dis (Hoboken)* **6**, 41–43 (2015).
42. Katzenstein, D., Rickerson, V. & Braude, A. New concepts of amebic liver abscess derived from hepatic imaging, serodiagnosis, and hepatic enzymes in 67 consecutive cases in San Diego. *Medicine* **61**, 237–46 (1982).
43. Prakash, V. & Oliver, T. I. *Amebic Liver Abscess*. *StatPearls* (2019).
44. Santi-Rocca, J., Rigotherier, M.-C. & Guillen, N. Host-Microbe Interactions and Defense Mechanisms in the Development of Amoebic Liver Abscesses. *Clin Microbiol Rev* **22**, 65–75 (2009).
45. Martínez-Palomo, A. The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitology Today* (1987) doi:10.1016/0169-4758(87)90048-2.

46. Tsutsumi, V. & Shibayama, M. Experimental Amebiasis: A Selected Review of Some In Vivo Models. *Arch Med Res* **37**, 210–220 (2006).
47. Abdel-misih, S. R. Z. & Bloomston, M. Liver Anatomy Liver Anatomy Surgery Hepatic vasculature Biliary tree. *Surgical Clinics of NA* (2010) doi:10.1016/j.suc.2010.04.017.
48. Rogers, A. B. & Dintzis, R. Z. Hepatobiliary System. in *Comparative Anatomy and Histology* 229–239 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-802900-8.00013-0.
49. Michalopoulos, G. K. Liver regeneration. *J Cell Physiol* **213**, 286–300 (2007).
50. Michalopoulos, G. K. Liver regeneration after partial hepatectomy: Critical analysis of mechanistic dilemmas. *American Journal of Pathology* (2010) doi:10.2353/ajpath.2010.090675.
51. Grisham, J. W. Organizational Principles of the Liver. in *The Liver* 1–15 (John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2009). doi:10.1002/9780470747919.ch1.
52. Abu Rmilah, A. *et al.* Understanding the marvels behind liver regeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* Preprint at <https://doi.org/10.1002/wdev.340> (2019).
53. Sibulesky, L. Anatomía normal del hígado. *Clin Liver Dis (Hoboken)* **2**, S61Š–S63Š (2013).
54. Sear, J. Anatomy and physiology of the liver. *Baillieres Clin Anaesthesiol* (1992) doi:10.1016/S0950-3501(05)80304-6.
55. Deshpande, R. R., Heaton, N. D. & Rela, M. Surgical anatomy of segmental liver transplantation. *British Journal of Surgery* **89**, 1078–1088 (2002).
56. Fu, X. *et al.* Modeling of xenobiotic transport and metabolism in virtual hepatic lobule models. *PLoS One* **13**, e0198060 (2018).
57. Washabau, R. J. & Day, M. J. *Canine and Feline Gastroenterology*. *Canine and Feline Gastroenterology* (Elsevier, 2013). doi:10.1016/C2009-0-34969-7.

58. Tsutsumi, V., Nakamura, T., Ueno, T., Torimura, T. & Aguirre-García, J. Structure and Ultrastructure of the Normal and Diseased Liver. in *Liver Pathophysiology* 23–44 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-804274-8.00002-3.
59. Delgado Coello, B. A. *Avances En El Estudio Experimental de La Bioquímica Hepática*. (Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 2017). doi:10.22201/ifc.9786070290763e.2017.
60. Tsung, A. & Geller, D. A. Gross and Cellular Anatomy of the Liver. in 3–6 (2011). doi:10.1007/978-1-4419-7107-4_1.
61. Bhunchet, E. & Wake, K. The portal lobule in rat liver fibrosis: A re-evaluation of the liver unit. *Hepatology* **27**, 481–487 (1998).
62. Torre, C., Perret, C. & Colnot, S. Molecular Determinants of Liver Zonation. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 127–150 (2010). doi:10.1016/B978-0-12-385233-5.00005-2.
63. Treyer, A. & Müsch, A. Hepatocyte Polarity. in *Comprehensive Physiology* (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2013). doi:10.1002/cphy.c120009.
64. Krishna, M. Anatomía microscópica del hígado. *Clin Liver Dis (Hoboken)* **2**, 109–112 (2013).
65. Stanger, B. Z. Cellular Homeostasis and Repair in the Mammalian Liver. *Annu Rev Physiol* (2015) doi:10.1146/annurev-physiol-021113-170255.
66. Saxena, R., Theise, N. D. & Crawford, J. M. Microanatomy of the human liver - Exploring the hidden interfaces. *Hepatology* Preprint at <https://doi.org/10.1002/hep.510300607> (1999).
67. Trefts, E., Gannon, M. & Wasserman, D. H. The liver. *Current Biology* **27**, R1147–R1151 (2017).
68. Baratta, J. L. *et al.* Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis. *Histochem Cell Biol* **131**, 713–726 (2009).

69. Soto-Gutierrez, A., Navarro-Alvarez, N. & Kobayashi, N. Hepatocytes. in *Molecular Pathology of Liver Diseases* (ed. Cagle, P. T.) 17–26 (Springer Science, Pittsburgh Pennsylvania, USA, 2011). doi:10.1007/978-1-4419-7107-4_3.
70. Lane, S. W., Williams, D. A. & Watt, F. M. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nat Biotechnol* **32**, 795–803 (2014).
71. Lu, W.-Y. *et al.* Hepatic progenitor cells of biliary origin with liver repopulation capacity. *Nat Cell Biol* **17**, 971–983 (2015).
72. Gissen, P. & Arias, I. M. Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *J Hepatol* **63**, 1023–1037 (2015).
73. Mizuguchi, Y., Specht, S., Isse, K., Lunz, J. G. & Demetris, A. J. Biliary Epithelial Cells. in 27–51 (2011). doi:10.1007/978-1-4419-7107-4_4.
74. Arii, S. & Imamura, M. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **7**, 40–48 (2000).
75. Deleve, L. D. The Hepatic Sinusoidal Endothelial Cell: Morphology, Function, and Pathobiology. in *The Liver* 371–388 (John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2009). doi:10.1002/9780470747919.ch26.
76. Greuter, T. & Shah, V. H. Hepatic sinusoids in liver injury, inflammation, and fibrosis: new pathophysiological insights. *J Gastroenterol* **51**, 511–519 (2016).
77. McGill, M. R. & Jaeschke, H. Oxidant Stress, Antioxidant Defense, and Liver Injury. in *Drug-Induced Liver Disease* 71–84 (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-0-12-387817-5.00004-2.
78. Clària, J. & Titos, E. La célula de Kupffer. *Gastroenterol Hepatol* **27**, 264–273 (2004).
79. Cubero, F. J. & Nieto, N. Kupffer cells and alcoholic liver disease. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* **98**, (2006).

80. Gandhi, C. R. Hepatic Stellate Cells and Hepatocyte Survival. in *Stellate Cells in Health and Disease* 209–225 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-800134-9.00013-0.
81. Senoo, H. *et al.* Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative – past, present and future. *Cell Biol Int* **34**, 1247–1272 (2010).
82. Ochoa, B. *et al.* Hedgehog signaling is critical for normal liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* **51**, 1712–1723 (2010).
83. Fausto, N., Campbell, J. S. & Riehle, K. J. Liver regeneration. *Hepatology* **43**, S45–S53 (2006).
84. Taub, R. Liver regeneration: From myth to mechanism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrm1489> (2004).
85. Court, F. G., Wemyss-Holden, S. A., Dennison, A. R. & Maddern, G. J. The mystery of liver regeneration. *British Journal of Surgery* **89**, 1089–1095 (2002).
86. Gao, X., Wang, W., Wei, S. & Li, W. [Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza radix and its bioactive compounds]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **34**, 2695–700 (2009).
87. Gilgenkrantz, H. & Collin de l’Hortet, A. Understanding Liver Regeneration. *Am J Pathol* **188**, 1316–1327 (2018).
88. Tao, Y., Wang, M., Chen, E. & Tang, H. Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules. *Mediators Inflamm* **2017**, 1–9 (2017).
89. Mao, S. A., Glorioso, J. M. & Nyberg, S. L. Liver regeneration. *Translational Research* Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.01.005> (2014).
90. Palmes, D. & Spiegel, H.-U. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* **25**, 1601–1611 (2004).
91. Kung, J. W. C., Currie, I. S., Forbes, S. J. & Ross, J. A. Liver Development, Regeneration, and Carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 1–8 (2010).

92. Kim, T.-H., Mars, W. M., Stolz, D. B. & Michalopoulos, G. K. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology* **31**, 75–82 (2000).
93. Borowiak, M. *et al.* Met provides essential signals for liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 10608–10613 (2004).
94. Xu, C., Yang, Y., Yang, J., Chen, X. & Wang, G. Analysis of the role of the integrin signaling pathway in hepatocytes during rat liver regeneration. *Cell Mol Biol Lett* (2012) doi:10.2478/s11658-012-0011-x.
95. Russell, J. O. & Monga, S. P. Wnt/ β -Catenin Signaling in Liver Development, Homeostasis, and Pathobiology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **13**, 351–378 (2018).
96. Fujiyoshi, M. & Ozaki, M. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences* Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00534-010-0304-2> (2011).
97. Wang, L. *et al.* Disruption of the transcription factor recombination signal-binding protein-Jk (RBP-J) leads to veno-occlusive disease and interfered liver regeneration in mice. *Hepatology* **49**, 268–277 (2009).
98. Furchtgott, L. A., Chow, C. C. & Periwal, V. A Model of Liver Regeneration. *Biophys J* **96**, 3926–3935 (2009).
99. Cooper, G. M. & Hausman, R. E. *The Cell: A Molecular Approach 2nd Edition*. Sinauer Associates (2007).
100. Nevzorova, Y. A. & Trautwein, C. Regulation of Cell Cycle During Liver Regeneration. in *Liver Regeneration* 153–166 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-420128-6.00011-7.
101. Yam, C. H., Fung, T. K. & Poon, R. Y. C. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1317–1326 (2002).
102. Palestino, M., Clavijo, D., Gutierrez, M. & Gómez, L. El Factor de Crecimiento de Hepatocitos y su receptor c-Met en la protección Contra el daño hepatico por el alcohol. *Rev EMedic* (2013).

103. Esquirol Causa, J. & Herrero Vila, E. Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y geles de silicona en el abordaje de heridas, quemaduras y cicatrices: revisión de la literatura. *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana* (2017) doi:10.4321/S0376-78922017000500009.
104. Mehendale, H. M. Role of hepatocellular regeneration and hepatobular healing in the final outcome of liver injury. *Biochem Pharmacol* **42**, 1155–1162 (1991).
105. Koniaris, L. G., McKillop, I. H., Schwartz, S. I. & Zimmers, T. A. Liver regeneration. *J Am Coll Surg* (2003) doi:10.1016/S1072-7515(03)00374-0.
106. Macías-Silva, M., Li, W., Leu, J. I., Crissey, M. A. S. & Taub, R. Up-regulated Transcriptional Repressors SnoN and Ski Bind Smad Proteins to Antagonize Transforming Growth Factor- β Signals during Liver Regeneration. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 28483–28490 (2002).
107. Takamura, K., Tsuchida, K., Miyake, H., Tashiro, S. & Sugino, H. Activin and activin receptor expression changes in liver regeneration in rat. *Journal of Surgical Research* (2005) doi:10.1016/j.jss.2005.01.002.
108. Chen, L. *et al.* Activin A induces growth arrest through a SMAD- dependent pathway in hepatic progenitor cells. *Cell Communication and Signaling* **12**, 18 (2014).
109. Choudhry, Z. *et al.* Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Ann Neurosci* **21**, (2014).
110. Llovet, J. M. & Bruix, J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* (2003) doi:10.1053/jhep.2003.50047.
111. Chen, J. K. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev* **16**, 2743–2748 (2002).
112. Nieuwenhuis, E. & Hui, C. C. Hedgehog signaling and congenital malformations. *Clinical Genetics* Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2004.00360.x> (2005).
113. Omenetti, A., Choi, S., Michelotti, G. & Diehl, A. M. Hedgehog signaling in the liver. *J Hepatol* **54**, 366–373 (2011).

114. Jung, Y. *et al.* Accumulation of Hedgehog-Responsive Progenitors Parallels Alcoholic Liver Disease Severity in Mice and Humans. *Gastroenterology* (2008) doi:10.1053/j.gastro.2008.02.022.
115. Higgins, G. M. Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol (Chic)* (1931).
116. Jia, Y., Wang, Y. & Xie, J. The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation. *Arch Toxicol* **89**, 179–191 (2015).
117. Machado, M. V. & Diehl, A. M. Hedgehog signalling in liver pathophysiology. *Journal of Hepatology* Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.10.017> (2018).
118. Choy, S. W. & Cheng, S. H. Hedgehog Signaling. in *Vitamins and Hormones* 1–23 (2012). doi:10.1016/B978-0-12-394622-5.00001-8.
119. Porter, J. A., Young, K. E. & Beachy, P. A. Cholesterol Modification of Hedgehog Signaling Proteins in Animal Development. *Science* (1979) **274**, 255–259 (1996).
120. Hooper, J. E. & Scott, M. P. The *Drosophila* patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* **59**, 751–765 (1989).
121. Abidi, A. Hedgehog signaling pathway: A novel target for cancer therapy: Vismodegib, a promising therapeutic option in treatment of basal cell carcinomas. *Indian Journal of Pharmacology* Preprint at <https://doi.org/10.4103/0253-7613.124884> (2014).
122. Kang, J.-S., Zhang, W. & Krauss, R. S. Hedgehog Signaling: Cooking with Gas1. *Science's STKE* **2007**, pe50–pe50 (2007).
123. Arensdorf, A. M., Marada, S. & Ogden, S. K. Smoothened Regulation: A Tale of Two Signals. *Trends Pharmacol Sci* **37**, 62–72 (2016).
124. Taipale, J., Cooper, M. K., Maiti, T. & Beachy, P. A. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature* **418**, 892–896 (2002).
125. Zhao, Y., Tong, C. & Jiang, J. Hedgehog regulates smoothened activity by inducing a conformational switch. *Nature* **450**, 252–258 (2007).

126. Gao, L., Zhang, Z., Zhang, P., Yu, M. & Yang, T. Role of canonical hedgehog signaling pathway in liver. *International Journal of Biological Sciences* Preprint at <https://doi.org/10.7150/ijbs.28089> (2018).
127. Marigo, V., Davey, R. A., Zuo, Y., Cunningham, J. M. & Tabin, C. J. Biochemical evidence that Patched is the Hedgehog receptor. *Nature* **384**, 176–179 (1996).
128. Stegelmeier, B. L. *et al.* Selected Poisonous Plants Affecting Animal and Human Health. in *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* 1259–1314 (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-0-12-415759-0.00040-6.
129. Heretsch, P., Tzagkaroulaki, L. & Giannis, A. Cyclopamine and hedgehog signaling: Chemistry, biology, medical perspectives. *Angewandte Chemie - International Edition* Preprint at <https://doi.org/10.1002/anie.200906967> (2010).
130. Borah, A. & Kumar, D. S. Targeting the Hedgehog and Notch Signaling Pathways in Cancer Stem Cells. in *Oncogenomics* 103–120 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/b978-0-12-811785-9.00008-9.
131. Nachtergaele, S. *et al.* Structure and function of the Smoothed extracellular domain in vertebrate Hedgehog signaling. *Elife* **2**, e01340 (2013).
132. Lipinski, R. J. *et al.* Dose- and Route-Dependent Teratogenicity, Toxicity, and Pharmacokinetic Profiles of the Hedgehog Signaling Antagonist Cyclopamine in the Mouse. *Toxicological Sciences* **104**, 189–197 (2008).
133. Sanchez, P. & Ruiz I Altaba, A. In vivo inhibition of endogenous brain tumors through systemic interference of Hedgehog signaling in mice. *Mech Dev* (2005) doi:10.1016/j.mod.2004.10.002.
134. Palma, V. Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* **131**, 337–345 (2003).
135. JENG, K.-S. *et al.* Blockade of the sonic hedgehog pathway effectively inhibits the growth of hepatoma in mice: An in vivo study. *Oncol Lett* **4**, 1158–1162 (2012).
136. Martinez-Gigena, M. P., Shibayama-Salas, M., Tsutsumi, V. & Martinez-Palomo, A. Histological changes during healing of experimental amebic liver abscess treated with metronidazole. in *Archives of Medical Research* (1992).

137. León Félix Josefina. Regeneración Hepática Postratamiento Antiamibiano. (CINVESTAV, México, 1998).
138. Loza-Medrano Stephanie Sarai. Amibiasis experimental :citocinas y factores de crecimiento en la regeneración hepática post-tratamiento con metronidazol .. (CINVESTAV , México, 2013).
139. Campos-Rodríguez, R. *et al.* A review of the proposed role of neutrophils in rodent amebic liver abscess models. *Parasite* vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.1051/parasite/2016006> (2016).
140. Pacheco-Yépez, J., Galván-Moroyoqui, J. M., Meza, I., Tsutsumi, V. & Shibayama, M. Expression of cytokines and their regulation during amoebic liver abscess development. *Parasite Immunol* **33**, (2011).
141. Pelosof, L. C., Davis, P. H., Zhang, Z., Zhang, X. & Stanley, S. L. Co-ordinate but disproportionate activation of apoptotic, regenerative and inflammatory pathways characterizes the liver response to acute amebic infection. *Cell Microbiol* **8**, 508–522 (2006).
142. Michalopoulos, G. K. & Bhushan, B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0342-4> (2021).
143. Shen, X., Peng, Y. & Li, H. The Injury-Related Activation of Hedgehog Signaling Pathway Modulates the Repair-Associated Inflammation in Liver Fibrosis. *Front Immunol* **8**, (2017).
144. Kotulak-Chrzaszcz, A., Klacz, J., Matuszewski, M., Kmiec, Z. & Wierzbicki, P. M. Expression of the Sonic Hedgehog pathway components in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett* **18**, (2019).
145. Skoda, A. M. *et al.* The role of the hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* Preprint at <https://doi.org/10.17305/bjbms.2018.2756> (2018).

146. Carballo, G. B., Honorato, J. R., De Lopes, G. P. F. & Spohr, T. C. L. D. S. E. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Communication and Signaling* Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0220-7> (2018).
147. Velázquez Rodríguez Jessica. Amibiasis experimental: Regeneración Hepática Post-Tratamiento antiamebiano . (CINVESTAV , México, 2008).
148. Brenner, C., Galluzzi, L., Kepp, O. & Kroemer, G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *Journal of Hepatology* vol. 59 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.033> (2013).
149. Xie, Z. *et al.* Emerging roles of the Hedgehog signalling pathway in inflammatory bowel disease. *Cell Death Discovery* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00679-7> (2021).
150. Traiffort, E., Moya, K. L., Faure, H., Hässig, R. & Ruat, M. High expression and anterograde axonal transport of aminoterminal sonic hedgehog in the adult hamster brain. *European Journal of Neuroscience* **14**, (2001).
151. Tao, J. *et al.* Inhibition of Hedgehog Delays Liver Regeneration through Disrupting the Cell Cycle. *Current Issues in Molecular Biology* 2022, Vol. 44, Pages 470-482 **44**, 470–482 (2022).
152. Guy, C. D. *et al.* Hedgehog pathway activation parallels histologic severity of injury and fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **55**, (2012).
153. Kim, H. S. *et al.* Expression profile of sonic hedgehog signaling-related molecules in basal cell carcinoma. *PLoS One* **14**, (2019).
154. Ghazy, S. & abdel ghani, seham. Immunohistochemical expression of sonic hedgehog signaling and its influence on angiogenesis in osteosarcoma and chondrosarcoma. *Egypt Dent J* **67**, (2021).
155. Al Ghamdi, D. *et al.* The significance of sonic hedgehog immunohistochemical expression in colorectal carcinoma. *J Microsc Ultrastruct* **3**, (2015).
156. Lira, J. P. I., Faria Rosa, J., Albuquerque, R. M., Pereira, T. A. & Vidigal, P. V. T. Immunohistochemical Evaluation of the Hedgehog Route as a Potential Prognostic Factor in Hepatocellular Carcinoma. *J Bras Patol Med Lab* **58**, (2022).

157. Tanese, K., Emoto, K., Kubota, N., Fukuma, M. & Sakamoto, M. Immunohistochemical visualization of the signature of activated Hedgehog signaling pathway in cutaneous epithelial tumors. *Journal of Dermatology* **45**, (2018).
158. Hoyos Cadavid, A. M. *et al.* Immunohistochemical evaluation of Sonic Hedgehog signaling pathway proteins (Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2, and Gli3) in sporadic and syndromic odontogenic keratocysts. *Clin Oral Investig* **23**, (2019).
159. Jung, Y., McCall, S. J., Li, Y.-X. & Diehl, A. M. Bile ductules and stromal cells express hedgehog ligands and/or hedgehog target genes in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **45**, 1091–1096 (2007).
160. Langiewicz, M. *et al.* Hedgehog pathway mediates early acceleration of liver regeneration induced by a novel two-staged hepatectomy in mice. *J Hepatol* **66**, (2017).
161. Zhou, Y. *et al.* The Emerging Role of Hedgehog Signaling in Viral Infections. *Frontiers in Microbiology* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.870316> (2022).