



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MECANISMOS DE RESISTENCIA NATURAL A LA AMIBIASIS  
HEPÁTICA EXPERIMENTAL**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMÁCEUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A**

**CINDY JANETH SANDOVAL GRANADOS**



**MÉXICO, D.F.**

**2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: GUTIÉRREZ RAMOS ABEL  
**VOCAL:** Profesor: ORTEGA SOTO ENRIQUE  
**SECRETARIO:** Profesor: OLIVOS GARCIA ALFONSO  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: CORDERO HERNANDEZ JOSE  
**2° SUPLENTE:** Profesor: MORENO EUTIMIO MARIO ADAN

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN MEDICINA EXPERIMENTAL, LABORATORIO DE PATOLOGÍA  
EXPERIMENTAL, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:** DR. ALFONSO OLIVOS GARCÍA

**SUPERVISOR TÉCNICO:** BIOL. MARIO NEQUIZ AVENDAÑO

**SUSTENTANTE:** CINDY JANETH SANDOVAL GRANADOS

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Amibiasis	5
1.2 Morfología de <i>E. histolytica</i>	8
1.3 Ciclo biológico	9
1.4 Inmunidad innata	11
1.4.1 Complemento	13
1.4.2 Resistencia amibiana al complemento	15
1.4.3 Óxido nítrico	15
1.5 Resistencia natural a la amibiasis	16
<b>2. HIPÓTESIS</b>	18
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b>	19
<b>4. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	19
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
5.1 Mantenimiento de la virulencia de <i>E. histolytica</i>	20
5.2 Conteo de trofozoítos	20
5.3 Inyección intraportal de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en hámsters y ratones	21
5.4 Evaluación de la actividad hipocomplementémica del factor de veneno de cobra (CVF)	21
5.5 Infección hepática amibiana en ratones hipocomplementémicos	22
5.6 Desarrollo del algoritmo informático utilizando el <i>software imageJ</i> para el conteo automático de leucocitos	22

5.7	Conteo de leucocitos	22
5.8	Cuantificación del área de necrosis	23
5.9	Cuantificación de los focos inflamatorios	23
5.10	Quimiotáxis en cavidad peritoneal inducida por PBS	23
5.11	Quimiotáxis en cavidad peritoneal de ratones y hámsters inducida por la mezcla suero fresco- <i>E. histolytica</i>	24
5.12	Detección de iNOS en cortes de hígados de hámster y ratón infectados con <i>E. histolytica</i>	25
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>26</b>
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>47</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>52</b>
<b>10</b>	<b>APENDICE</b>	<b>53</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>54</b>

## Abreviaturas

**AHAE** Absceso Hepático Amibiano Experimental

**CVF** Factor de veneno de cobra

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peróxido de hidrógeno

**HCl** Acido clorhídrico

**IHA** Infección hepática amibiana

**iNOS** Óxido nítrico sintasa inducible

**MBL** Lectina Fijadora de Manosa

**MO** Leucocitos mononucleares

**NK** Natural killer

**NO·** Oxido nítrico

**PBS** Solución Amortiguadora de Fosfatos

**PAS** Tinción de ácido peryodico (Shift)

**PMNs** Leucocitos polimorfonucleares

**ROS** Especies reactivas de oxígeno

**µm<sup>2</sup>** Micras cuadradas

## RESUMEN

*Entamoeba histolytica* es un protozoo parásito responsable de la amibiasis en humanos. Esta enfermedad causa aproximadamente cien mil muertes por año en el mundo y es prevalente en países subdesarrollados. Además, de colonizar el intestino grueso, ocasionalmente *E. histolytica* puede perforar el intestino y a través de la circulación invadir diversos órganos, siendo el hígado el más frecuente. Los tratamientos farmacológicos anti-amibianos no son inocuos y en algunas ocasiones no resuelven la enfermedad. En condiciones experimentales el hámster ha mostrado ser un animal altamente susceptible a la infección hepática amibiana (IHA) mientras que el ratón es considerado un animal resistente. En el presente trabajo se estudiaron los mecanismos de resistencia natural del ratón a la IHA debido a que su esclarecimiento puede dar lugar a nuevas y mejores alternativas terapéuticas. Contrario a lo que sucede en el hámster, nuestros resultados mostraron que la desaparición de las amibas del hígado del ratón sucede en dos etapas (~6 y 72 h) con escaso o nulo infiltrado inflamatorio y sin destrucción tisular. El ROS, NO<sup>·</sup> y complemento no participan en la eliminación amibiana y la reducida quimiotaxis leucocitaria parece depender del complemento. Es muy probable que durante la primera etapa de eliminación, las amibas localizadas en zonas bien perfundidas mueran por hiperoxia, mientras que en la segunda, a pesar de que la isquemia prolonga su supervivencia, los parásitos pueden desaparecer por la carencia de nutrientes. Finalmente, los resultados de este trabajo sugieren que la falta de afluencia leucocitaria constituye un factor de resistencia natural del ratón a la IHA.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Amibiasis

La amibiasis es una enfermedad parasitaria del ser humano causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. Esta enfermedad es una de las principales causas de mortalidad en los países subdesarrollados (Haque *et al.*, 2003).

A pesar de que la amibiasis es considerada una enfermedad tropical, en 1875 el primer paciente identificado con amibas fue un joven campesino llamado J. Markow, proveniente del círculo polar ártico. Markow padecía diarrea acompañada de un constante malestar abdominal. El doctor Fedor Aleksandrovich Lesh, al realizar el análisis de las heces del paciente, encontró en ellas numerosas formaciones microscópicas que por su forma y movilidad consideró, sin duda, como amibas, descubriendo de esta manera el agente causal de la enfermedad. Por primera vez en la historia de la humanidad se reconocían a las amibas como agentes de un padecimiento y se les trataba de combatir para salvar la vida de un paciente; desafortunadamente el joven Markow murió. Posteriormente, utilizando el contenido intestinal de Markow, el doctor Lesh reprodujo la infección intestinal en perros, de los cuales sólo uno enfermó con diarrea y evacuaciones con abundantes amibas. Según el doctor Lesh, el experimento demostró que las amibas eran capaces de producir irritación intensa que progresaba hacia la ulceración.

En 1890 el canadiense William Osler, fue el primero en hacer la descripción detallada del primer caso de absceso hepático amibiano en América. Osler trató a un médico de 29 años, quien había sufrido de disentería, fiebre, malestar general y dolor en la región del hígado. A pesar de que Osler observara numerosas amibas en el material líquido que obtuvo del absceso hepático y en las heces del paciente, concluyó que era imposible estar seguro de la relación de estos microorganismos con la enfermedad. (Martínez-Palomo, 1987).



En 1893 los médicos alemanes, Quincke y Roos descubrieron la forma de resistencia de la amiba, el quiste. Por otra parte, en 1903 el zoólogo alemán Fritz Schaudinn, diferenció a las amibas y las denominó *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba coli*. En el año 1906 este investigador murió a la edad de 35 años debido a complicaciones secundarias a una amibiasis adquirida por autoinfección. Además, Schaudinn decidió llamar a la amiba histolítica, debido a creía que ésta era la responsable de la lisis (destrucción) de los tejidos (Pinilla et al., 2008; Thorburn, 1971).

En el siglo XIX el tratamiento quirúrgico del absceso hepático recibió gran impulso gracias al trabajo del doctor Miguel Jiménez, quien inició la punción y canalización del absceso hepático como forma eficaz de terapia, con lo cual se obtuvo una apreciable reducción de la mortalidad por este padecimiento (Martínez-Palomo, 1996).

En 1925 el parasitólogo francés Émile Brumpt postuló la hipótesis de la dualidad de las amibas. Basado en consideraciones epidemiológicas, Brumpt recalcó que la amiba de distribución cosmopolita es un parásito no patógeno al que llamó *Entamoeba dispar*, mientras que la localizada en ciertos países tropicales en los que la disentería y el absceso hepático son frecuentes, es otra amiba, a la que dio el nombre de *E. dysenteriae*. Además, Brumpt insistió que no era posible diferenciar morfológicamente ambas amibas, debido a que los datos epidemiológicos de aquel tiempo eran irrefutables y sólo podían fundamentarse en la existencia de dos especies diferentes de amibas, unas patógenas y otras no patógenas (Clark, 1998; Martínez- Palomo 1996).

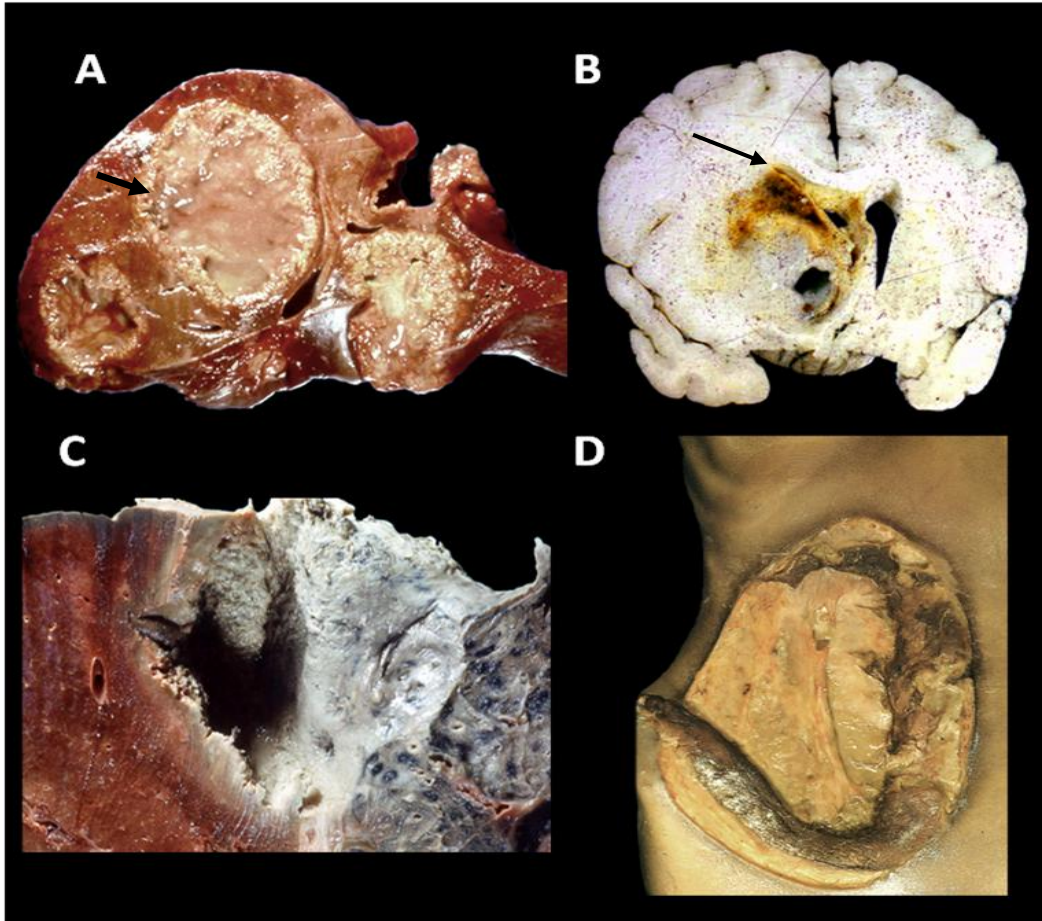
En 1993 Diamod y Clarck por medio de análisis bioquímicos, inmunológicos y genéticos caracterizaron a *E. histolytica* como cepa patógena y a *E. dispar* como cepa comensal (Tannich, 1998).

En nuestro país, en los últimos años la amibiasis ha ocupado el quinto o sexto lugar dentro de las principales causas de morbilidad (Ximenez et al., 2009). Un estudio seroepidemiológico mostró que el 8.41% de la población mexicana ha desarrollado anticuerpos circulantes anti-amiba (Caballero-Salcedo et al., 1994), lo

que indica una alta exposición de la población mexicana al parásito. A pesar de ello, las tasas de mortalidad se han reducido durante las últimas décadas, debido a la accesibilidad a medicamentos anti-amibianos eficaces. El metronidazol es uno de los fármacos de elección para el tratamiento de esta enfermedad, sin embargo, debido a que recientemente se han observado algunos casos de resistencia a este compuesto, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas (Hanna *et al.*, 2000).

La manifestación clínica más común de la amibiasis intestinal es la colitis amibiana aguda. Esta se caracteriza por dolor abdominal, episodios de diarrea alternados con periodos de constipación y evacuaciones con moco o sangre. Además, con frecuencia también se puede presentar la colitis amibiana crónica cuyos síntomas son dolor abdominal y diarrea no muy intensa alternada con periodos de estreñimiento. Por otra parte, una de las complicaciones de la amibiasis intestinal invasiva es el amiboma de colon, el cual se presenta como una masa que obstruye parte de la pared y la luz intestinal (Ramiro *et al.*, 2008). En cuanto a las manifestaciones extra-intestinales, el parásito invade principalmente el hígado provocando el absceso hepático amibiano y con menor frecuencia causa destrucción en otros tejidos como los pulmones, el cerebro y la piel, (Figura 1).

El paso del trofozoíto del intestino a la circulación sanguínea puede ser consecuencia de lesiones intestinales. Una vez en los vasos sanguíneos, el parásito viaja a través de la circulación portal y llega al hígado. En este órgano las amibas son rodeadas por leucocitos polimorfonucleares, los cuales generan un microambiente de hipoxia que es favorable para la supervivencia del parásito (Pérez-Tamayo *et al.*, 1992). Posteriormente, las células inflamatorias causan destrucción tisular, la cual en etapas tardías se transforma en un material pastoso de color chocolate que se incrementa con el tiempo (Morán *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Amibiasis extraintestinal en distintos tejidos del ser humano. A) hígado con múltiples lesiones, B) lesión amibiana en cerebro, C) invasión en pulmón D) lesión en piel en la región abdominal, debido a la cercanía de órganos infectados (intestino o hígado).

### 1.2 Morfología de *E. histolytica*

*Entamoeba histolytica* es un protozoo no flagelado que pertenece a la clase Rhizopoda. Se puede encontrar en forma de quiste (Figura 2) o trofozoíto (Figura 3). Los quistes son redondos u ovals con una pared lisa (p) y refringente. El quiste inmaduro tiene solamente un núcleo, a medida que transcurre el tiempo el núcleo se divide en dos (n) y posteriormente en cuatro (quiste maduro).

El trofozoíto (Figura 3) presenta un núcleo sin posición fija en el citoplasma, además se observa que el ectoplasma es hialino, ancho y transparente (c), mientras que el endoplasma (d) tiene gran cantidad de inclusiones.



**Figura 2.** Quiste inmaduro de *Entamoeba histolytica*



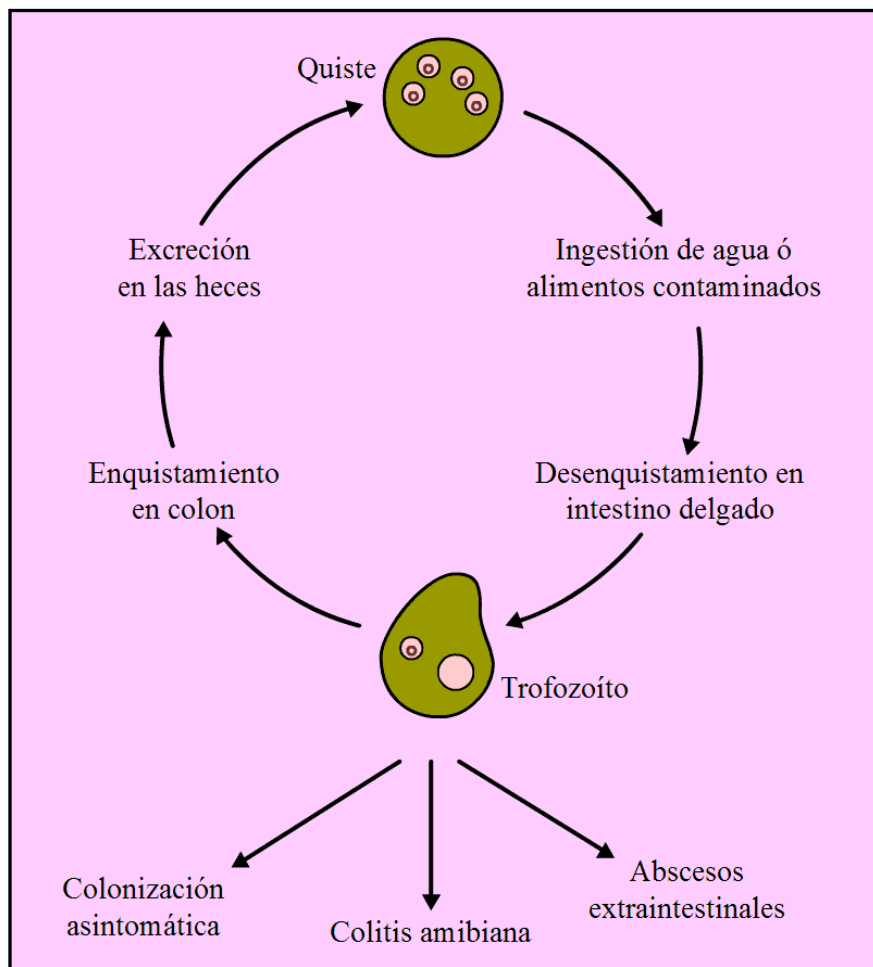
**Figura 3.** Trofozoítos de *Entamoeba histolytica*

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

El ciclo biológico de *E. histolytica* involucra dos formas, el quiste y el trofozoíto. El primero es la forma infectante y el segundo la forma vegetativa y responsable de la invasión tisular. Los quistes (Figura 2) tienen un diámetro de 10-15  $\mu\text{m}$ , poseen cuatro núcleos y pueden sobrevivir durante varias semanas en el suelo o en el agua. En cambio, los trofozoítos presentan movilidad por medio de la emisión de pseudópodos, su tamaño oscila entre 10-60  $\mu\text{m}$  y son lábiles al medio ambiente (Figura 3).

La infección amibiana inicia cuando el ser humano ingiere agua o alimentos contaminados con quistes del parásito, algunos de los cuales al llegar al estómago reblandecen su pared debido al contacto con los ácidos gástricos, enzimas intestinales y bilis. Después, en el intestino delgado ocurre el desenquistamiento,

la división nuclear y citoplasmática. Cada quiste tetranucleado puede dar lugar a ocho nuevos trofozoítos, los cuales se dividen por fisión binaria en la luz del intestino y migran al colon. En este mismo lugar y por mecanismos desconocidos algunos trofozoítos se transforman en quistes, los cuales al salir junto con las heces están listos para reiniciar el ciclo biológico (Figura 4). La invasión a los tejidos del hospedero ha sido considerada un defecto biológico de *E. histolytica*, ya que pone en riesgo la sobrevivencia de su único hospedero y además interrumpe su ciclo biológico (Martínez-Palomo 1989).



**Figura 4.** Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*

## 1.4 Inmunidad innata

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa contra los microorganismos, restringe la entrada de éstos al organismo y elimina o limita el crecimiento de muchos de ellos que pueden ser capaces de colonizar los tejidos. La respuesta de esta inmunidad es inmediata y a diferencia de la inmunidad adquirida, para su activación, no se necesita de un contacto previo con el microorganismo.

Los principales componentes de la inmunidad innata consisten en:

1) Barreras físicas y químicas, como los epitelios y las sustancias antimicrobianas sintetizadas en las superficies epiteliales; 2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), y linfocitos citotóxicos naturales (NK); 3) proteínas sanguíneas (complemento y otros mediadores de la inflamación); 4) proteínas denominadas citocinas las cuales regulan las actividades de las células de la inmunidad innata.

La inflamación inicia con la quimiotáxis y activación de los leucocitos, así como con la extravasación de varias proteínas plasmáticas en las zonas de infección o daño. Las principales células efectoras de la inmunidad innata son los neutrófilos, también llamados leucocitos polimorfonucleares (PMNs), los fagocitos mononucleares (MO) y los linfocitos NK. Todas estas células detectan y tratan de eliminar a los microorganismos que han alterado las barreras epiteliales y penetrado en los tejidos o en la circulación.

En la circulación los neutrófilos maduros tiene un diámetro de 7-10 micras, su núcleo es segmentado y su citoplasma está enriquecido con gránulos y vesículas secretoras. La cantidad de neutrófilos en los seres humanos y los ratones es diferente. En los seres humanos, el 50-70% de leucocitos en sangre periférica son neutrófilos, mientras que en el ratón sólo el 10-25% de los leucocitos en sangre son PMNs. En ratones y seres humanos la vida media de estas células en la circulación es de aproximadamente 1.5 y 8 h, respectivamente (Doeing *et al.*, 2003; Mestas *et al.*, 2004).

Los neutrófilos pueden eliminar a los patógenos utilizando mecanismos dependientes de NADPH oxidasa (especies reactivas de oxígeno) o proteínas antibacterianas (colagenasa, defensinas lactoferrina y lisozima). Estas proteínas se liberan de los gránulos de los neutrófilos ya sea en fagosomas o hacia el medio extracelular (Borregaard 2010).

Los PMNs son la población más abundante de los leucocitos circulantes y actúan en las primeras fases de las reacciones inflamatorias.

Los MO circulan en la sangre y cuando son reclutados a los tejidos, se convierten en macrófagos. Éstos, además de ingerir microorganismos, también ingieren células muertas del hospedero como parte de un proceso de limpieza después de la infección. Días después de este proceso, es decir en los estadios finales de la enfermedad, los macrófagos son las células dominantes (Abbas, 2004).

En el modelo del absceso hepático amibiano experimental en hámsters, cuando se inyectan trofozoítos de *E. histolytica* en el hígado de hámster, se provoca una gran afluencia de leucocitos PMNs y MO (Tsutsumi *et al.*, 2006). Posteriormente, la isquemia que provoca este foco inflamatorio disminuye la concentración local de oxígeno, que es favorable para la sobrevivencia del parásito (Pérez- Tamayo *et al.*, 1992). Se ha demostrado que el hospedero es el principal responsable de la destrucción tisular que caracteriza a esta parasitosis a través de los sistemas enzimáticos, oxidantes y proteolíticos derivados de la inflamación. (Olivos-García, *et al.*, 2004). Por otra parte, algunos estudios sugieren que en los ratones Balb/c los neutrófilos son las células que le proporcionan resistencia natural a la amibiasis, ya que éstos expresan la enzima iNOS y además el NO<sup>•</sup> circulante se encuentra incrementado (Velázquez *et al.*, 1998).

### 1. 4. 1 Complemento

El complemento es un sistema de proteínas séricas que puede ser activado por los microorganismos para favorecer su destrucción, e inducir la inflamación. Dicho sistema puede ser activado por diversos microorganismos a través de tres principales vías.

La *vía clásica* del complemento se activa por la acción de complejos antígeno-anticuerpo, mientras que las superficies microbianas como los polisacáridos de bacterias (LPS), de levaduras (zimosan) y de plantas (inulina) activan la *vía alterna*, ambas consisten en una cascada de enzimas proteolíticas que generan mediadores de la inflamación y opsoninas. Las dos vías conducen a la formación de un complejo terminal común que se inserta en la membrana plasmática y produce lisis celular. La *vía de las lectinas* se activa por una proteína plasmática denominada lectina de unión a manosa (MBL) la cual reconoce los residuos de manosa terminales situados en las glicoproteínas y glucolípidos microbianos.

Aunque las vías de activación del complemento difieren en el inicio, todas dan lugar a la proteólisis de la proteína del complemento C3, que genera productos biológicamente activos, denominados C3a y C3b.

C3a, estimula la inflamación al actuar como sustancia quimiotáctica para los neutrófilos, mientras que C3b, se une de forma covalente a los microorganismos y sirve de opsonina para favorecer su fagocitosis. Por otra parte, las C5 convertasas generadas por cualquiera de las tres vías, inician la activación de los componentes finales del sistema del complemento, los cuales culminan en la formación del complejo de ataque a la membrana, capaz de destruir a las células. (Abbas, 2004). La principal función del sistema del complemento es la destrucción de los microorganismos. Su activación por cualquiera de las tres vías favorece distintas funciones biológicas como anafilaxis, quimiotaxis y opsonización.

*Anafilaxis.* Como parte de la respuesta inflamatoria del huésped y la activación del complemento se generan las anafilatoxinas C3a y C5a por escisión específica del tercer y quinto componente del complemento. C3 y C5 son glicoproteínas compuestas por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ . Durante la activación del complemento, las cadenas  $\alpha$  de C3 y C5 tienen potentes actividades



proinflamatorias, debido a que un fragmento de la cadena  $\alpha$  interacciona con receptores presentes en las células cebadas y los basófilos, induciendo su degranulación. En consecuencia se libera su contenido rico en aminas vasoactivas (histamina o serotonina, según la especie) y leucotrienos, cuyos efectos principales son el aumento en la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso. (Tack *et al.*, 1981).

*Quimiotáxis.* La quimiotáxis es un sistema de respuesta sensorial de locomoción, gobernado químicamente. El fragmento C5a muestra actividad quimiotáctica sobre los neutrófilos, basófilos, eosinófilos y monocitos; la actividad quimiotáctica de C5a es una de las más potentes que se conocen.

Es posible que los neutrófilos sean atraídos hacia la zona donde se encuentra la ameba por medio de la actividad quimiotáctica de las proteínas de membrana presentes en *E. histolytica* (Guerrant *et al.*, 1981; Chadee *et al.*, 1987; Salata *et al.*, 1989; Kretschmer *et al.*, 1985) y por los fragmentos C5a y C3a producidos por la activación del complemento en la fase fluida (Reed *et al.*, 1989; 1990; 1995).

Las membranas de los macrófagos y neutrófilos contienen receptores que reconocen a la molécula C3b resultante de la activación del complemento. De esta forma, si C3b se adhiere a la superficie de un microorganismo, los fagocitos pueden reconocerlo mediante sus receptores, facilitando de esta manera el fenómeno de la fagocitosis. Esta actividad facilitadora de la fagocitosis se denomina *opsonización*. (Rojas- Espinosa 2006).

#### 1.4.2 Resistencia amibiana al complemento

La resistencia a la lisis celular mediada por el complemento se considera un factor de virulencia para bacterias y parásitos que invaden el torrente sanguíneo (Joiner et al., 1982; Joiner et al., 1984; Pearce *et al.*, 1990; Norris *et al.*, 1991). Los cultivos de *E. histolytica* provenientes de pacientes con amibiasis invasiva son resistentes a la lisis mediada por el complemento (Reed *et al.*, 1983; Reed *et al.*, 1986). Estas amibas pueden resistir la lisis por el complemento mediante dos vías: 1) a través de la activación del complemento en fase fluida por la proteasa EhCP de 56 kDa (Reed, *et al.*, 1990) y 2) por la inhibición de la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) mediante un epítipo que se encuentra en la adhesina EhGL, el cual muestra una alta similitud con el CD59 de humanos. CD59 es una proteína ampliamente distribuida en las membranas celulares que inhibe la inserción de C9 en el complejo C5b-8 (Braga *et al.*, 1992).

#### 1.4.3 Óxido nítrico

El NO<sup>•</sup> es una molécula de gas inestable que es sintetizado a partir de la oxidación de L-arginina a L-citrulina. Esta oxidación es catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) la cual se encuentra en tres isoformas: dos constitutivas (neuronal nNOS y endotelial eNOS) y una inducible (inducible iNOS) (Cooke et al., 1997; Michel *et al.*, 1997). El NO<sup>•</sup> ha mostrado tener potente actividad tumoricida y antimicrobiana tanto *in vitro* como *in vivo* (Nathan 1992).

La generación de NO<sup>•</sup>, por iNOS, es una propiedad de las células activadas del sistema inmune como células dendríticas, NK, mastocitos y células fagocíticas que incluyen monocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos (Bogdan, 2000).

Estudios *in vitro* han demostrado que el NO<sup>•</sup> es una de las principales moléculas generadas por el hospedero con actividad amebicida (Lin *et al.*, 1992).

Durante la infección hepática amibiana en el ratón, se ha observado que tanto la expresión de iNOS en los leucocitos que rodean a la amiba como el NO circulante aumentan a partir de las seis horas y disminuyen de forma gradual hasta la desaparición de los parásitos (Jarillo-Luna *et al.*, 2002).

Por lo anterior, se ha sugerido que la expresión de iNOS, en esta especie animal, constituye un factor de resistencia natural a la amibiasis hepática experimental. La expresión reducida de iNOS en hámsters normales en comparación con el ratón refuerza esta hipótesis (Pérez *et al.*, 2006).

### **1.5 Resistencia natural a la amibiasis**

Uno de los principales obstáculos para el estudio de los mecanismos moleculares de patogenicidad implicados en la amibiasis ha sido la falta de un modelo animal que reproduzca el ciclo biológico del parásito.

En la actualidad, no es posible provocar lesiones intestinales y extraintestinales en animales que ingieren quistes de amibas. Debido a esto, la mayor parte de los estudios de amibiasis *in vivo* se han realizado con modelos intestinales o hepáticos, los cuales consisten en la inyección directa de trofozoítos de amibas en el órgano. El modelo del absceso hepático amibiano experimental (AHAE) en hámsters y jerbos es el más utilizado para estudiar la enfermedad. A diferencia con lo sucede con estos animales, la rata, el ratón y el cobayo son resistentes al desarrollo del AHAE (Tsutsumi *et al.*, 2006).

Se ha sugerido que la resistencia natural a la infección hepática experimental observada en ratas, cobayos y ratones se debe a que las células inflamatorias producen altas concentraciones de moléculas con capacidad amebicida como NO<sup>•</sup> y especies reactivas de oxígeno (ROS). Sin embargo, en la actualidad esta propuesta no puede ser sostenida ya que las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (la ROS más tóxica para el parásito) producidas durante el estallido oxidativo de los leucocitos (<30µM) (Winterbourn y Kettle, 2013) no es tóxica para *E. histolytica* y la resistencia de éste parásito al NO<sup>•</sup> es mayor que el que presentan las células del hospedero (Pacheco-Yépez *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha demostrado que la intensa reacción inflamatoria que acompaña el AHAE en hámsters es indispensable para la sobrevivencia del parásito ya que le crea un microambiente de hipoxia a través de una isquemia local.

Debido a que la intensidad de la reacción inflamatoria a un determinado estímulo puede presentar variaciones intra- e inter-especie (Jaeschke 2006), es probable que durante la infección amibiana hepática experimental en diferentes especies animales, la intensidad del infiltrado inflamatorio desempeñe un papel importante en la susceptibilidad a la infección. Esto quiere decir: 1) a mayor inflamación mayor isquemia, 2) a mayor isquemia menos irrigación sanguínea que resulta en menos oxígeno, ROS, NO<sup>•</sup>, complemento y anticuerpos, lo cual favorece la sobrevida amibiana.

## **2. HIPÓTESIS**

La resistencia natural del ratón a la infección hepática experimental se debe a una reducida respuesta quimiotáctica leucocitaria.

### 3. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la participación del infiltrado inflamatorio como parte de los mecanismos de resistencia natural del ratón a la amibiasis hepática experimental.

### 4. OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar un algoritmo informático utilizando el *software imageJ* para cuantificar las células inflamatorias presentes en cortes histológicos de hígado de ratones y hámsters infectados con *E. histolytica*.
- Validar el algoritmo informático para el conteo de leucocitos.
- Determinar el área de necrosis en los hígados de ratones y hámsters infectados con *E. histolytica*.
- Determinar la expresión de la enzima iNOS en cortes histológicos de hígados de ratones y hámsters infectados con amibas.
- Determinar, en condiciones *in vivo*, la actividad quimiotáctica leucocitaria del complemento de ratón y hámster incubado con *E. histolytica*.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Mantenimiento de la virulencia de *E. histolytica***

Cuatro hámsters machos fueron anestesiados con pentobarbital sódico (2mg/kg) por vía intraperitoneal. Se les realizó una laparotomía, se descubrió la vena porta y se inyectaron  $1 \times 10^6$  trofozoítos de amibas virulentas resuspendidas en 0.2 mL de PBS. Además, para evitar la hemorragia se puso un fragmento de gelfoam en el sitio de la inyección. La herida fue suturada en dos planos con hilo de seda y los hámsters se dejaron por 7 días con agua y alimento *ad libitum*. Posteriormente, los animales fueron eutanasiados con sobredosis de anestesia, se les extrajeron los hígados y se colocaron en una caja de Petri estéril. Éstos se cortaron en pequeños fragmentos, los cuales fueron depositados en tubos estériles de 8 mL que contenían 6 mL de medio TYI-S-33 y 3 gotas de una mezcla de antibióticos (estreptomicina, bencilpenicilina y cefalexina). Enseguida los tubos se incubaron a 36.5°C y después de realizar varios cambios de medio, las amibas se colocaron en cajas de plástico para su expansión y su posterior uso.

### **5.2 Conteo de trofozoítos**

Los trofozoítos de *E. histolytica* (HM1-IMSS) fueron cultivados en medio TYI-S-33 (Diamond 1978) a 36.5 °C en condiciones axénicas durante 72 h. Al finalizar este tiempo las amibas se colocaron en tubos de 50 mL, se centrifugaron durante 5 min y se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Después, en la cámara de Neubauer y utilizando azul trypan se determinó el número de trofozoítos viables.

### **5.3 Inyección intraportal de trofozoítos de *E. histolytica* en hámsters y ratones**

Dos grupos de 12 hámsters Sirio dorado y de 12 ratones Balb/c entre 8-10 semanas de edad, fueron anestesiados con ketamina (80mg/kg)- Xilacina (5mg/kg) ó pentobarbital sódico en PBS estéril (2mg/kg), respectivamente. Se realizó una incisión en la cavidad abdominal de los animales, se descubrió la vena porta y se inyectaron amibas (cepa HM-1: IMSS) resuspendidas en 100 µl de PBS ( $1 \times 10^6$  en los hámsters y  $0.5 \times 10^6$  en los ratones). Después de la infección, dos animales de cada grupo se eutanasiaron con sobredosis de anestesia a 3, 6, 12, 24 y 72 h, y siete días. Enseguida se extrajeron los hígados, se cortaron y se colocaron en tubos con 20 mL de formol al 10% vol/vol en PBS. Después de 24 h los fragmentos de hígado se trataron con alcohol 96°, alcohol absoluto, alcohol absoluto/xileno y xileno. Después, los tejidos se incluyeron en bloques de parafina, se cortaron con el micrótopo y se tiñeron con ácido peryódico (PAS). Finalmente, las zonas con amibas y con infiltrado inflamatorio se seleccionaron y se fotografiaron.

### **5.4 Evaluación de la actividad hipocomplementémica del factor hipocomplementémico de veneno de cobra (CVF)**

El CVF se purificó a partir del veneno de cobra *Naja haje* utilizando cromatografía de filtración molecular e intercambio iónico, como lo describe Sharma *et al.*, (2001). Debido a que el complemento de la rata es completamente letal para *E. histolytica*, evaluamos la actividad hipocomplementémica del CVF determinando la capacidad amebicida del suero de rata (113 gr) que fue inyectada previamente (24h) con 7.4 µg de CVF por vía intraperitoneal. Para esto, incubamos  $0.5 \times 10^6$  amibas en 1mL de suero de rata normal y suero de rata con CVF durante 2 h a 37°C. Después la viabilidad amibiana se determinó con azul tripan.



### **5.5 Infección hepática amibiana en ratones hipocomplementémicos**

Un grupo de 8 ratones Balb/c de 8-10 semanas fue inyectado con 4.4 µg de CVF por vía intraperitoneal. Después de 24 h,  $0.5 \times 10^6$  amibas virulentas fueron inyectadas en la vena porta de este grupo y de otro de animales normales (control). Después de 6, 24, 72 h y siete días dos animales de cada grupo fueron eutanasiados y sus hígados fueron procesados por histología como ya se mencionó.

### **5.6 Desarrollo del algoritmo informático utilizando el *software imageJ* para el conteo automático de leucocitos**

Se seleccionaron 32 fotomicrografías de 3 y 12 h posteriores a la infección. Se utilizó el software *ImageJ 1.47v National Institutes of Health, USA, JAVA 1.6.0\_20 (64-bit)* para desarrollar un algoritmo (método de instrucciones, con un orden lógico, que permite introducir datos, procesarlos y arrojar resultados), el cual realizó el conteo de los leucocitos de manera automatizada.

El desarrollo del algoritmo informático nos permitió realizar un análisis cuantitativo de las fotomicrografías (Figura 9). Para la validación de este programa, se realizó una regresión lineal entre los conteos manuales y los automatizados.

### **5.7 Conteo de leucocitos**

Utilizando las fotomicrografías tomadas a 40X de los cortes de hígado de los animales infectados durante 3 y 12 h con amibas, se realizó la cuenta automática de los leucocitos que rodeaban al menos una amiba. Para esto usamos el algoritmo informático de *Image.J* previamente validado.

## **5.8 Cuantificación del área de necrosis**

Para determinar el área de necrosis presente en los cortes histológicos de los hígados de hámster y de ratón se utilizó el *software Image J*. Primero se hizo una selección manual del área de interés que se cuantificó en base al área total de la fotomicrografía. Enseguida se realizó la conversión de pixeles a micras ( $\mu\text{m}^2$ ) (Figura 13).

## **5.9 Cuantificación de los focos inflamatorios**

Mediante microscopía de luz y con un aumento de 4x se obtuvieron las microfotografías y se realizó el conteo de los focos inflamatorios presentes en los cortes histológicos del hígado de los ratones y hámsters infectados con amibas (24 y 72 h post- infección).

## **5.10 Quimiotáxis en cavidad peritoneal inducida por PBS**

Cuatro grupos de ratones Balb/c y de hámsters Sirio dorado de 8-10 semanas de edad se anestesiaron con ketamina-xilacina y con pentobarbital sódico, respectivamente. Se realizó una incisión en la cavidad abdominal de los animales y se les colocaron cámaras de plástico (Figura 17) y vidrio (Figura 18) diseñadas en nuestro laboratorio Ambos dispositivos contenían  $5 \times 10^4$  amibas resuspendidas en PBS y una cubierta de membrana de policarbonato con poros de  $3 \mu\text{m}$  (Figura 17a). Después de 6 h, los animales fueron eutanasiados y los tubos y las cámaras se extrajeron. Finalmente una alícuota de cada cámara se resuspendió con azul trypan y con la cámara de Neubauer se determinó el número de leucocitos presentes en la muestra.

### 5.11 Quimiotaxis en cavidad peritoneal de ratones y hámsters inducida por la mezcla suero fresco-*E. histolytica*

Cuatro grupos de ratones Balb/c y de hámsters Sirio dorado de 8-10 semanas de edad, se anestesiaron con ketamina-xilacina o con pentobarbital sódico, respectivamente. En la cavidad peritoneal de estos animales se les colocaron 3 tubos de vidrio cubiertos con una membrana de policarbonato con poros de 3  $\mu\text{m}$  Lot #W8220003 Neuro Probe, Inc. (Figura 18). Los tubos de cada grupo contenían 60  $\mu\text{l}$  de: 1) suero de ratón fresco, 2) suero de ratón descomplementado (calentado a 56° C durante 30 min), 3) suero de hámster fresco y 4) suero de hámster descomplementado (tabla 1). Además, todos los tubos también contenían  $5 \times 10^4$  trofozoítos de *E. histolytica*. Las membranas y los tubos de vidrio fueron previamente lavados y esterilizados en la autoclave (121° durante 15 min). Después de 6 h, los tubos se extrajeron de la cavidad peritoneal de los animales, se enfriaron con hielo y una alícuota se resuspendió con azul trypan.

Finalmente, con la cámara de Neubauer se determinó la cantidad de leucocitos presentes en cada tubo.

Grupo 1 Suero de ratón con complemento	Grupo 2 Suero de ratón descomplementado	Grupo 3 Suero de hámster con complemento	Grupo 4 Suero de hámster descomplementado
3 ratones	3 ratones	3 ratones	3 ratones
3 hámsters	3 hámsters	3 hámsters	3 hámsters

Tabla 1. Distribución de los tubos en cada grupo de animales

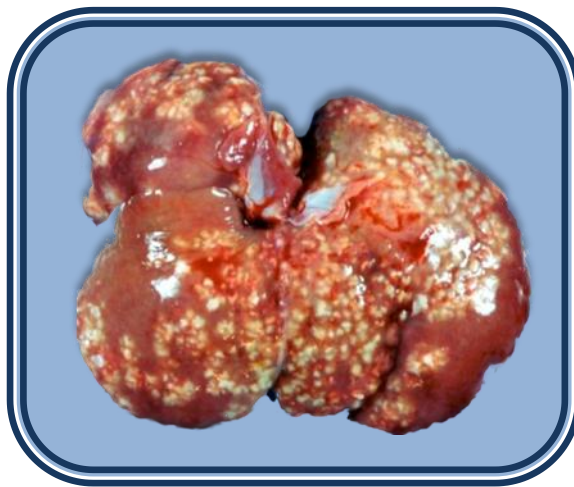
### **5.12 Detección de iNOS en cortes de hígados de hámster y ratón infectados con *E. histolytica***

Los hígados de hámster y ratón que fueron inyectados con amibas en la vena porta, (como se describió en “Inyección intraportal de trofozoítos de *E. histolytica* en hámsters y ratones”), se incluyeron en parafina y los bloques se cortaron con el micrótopo. Las laminillas se desparafinaron con un tratamiento de: xileno, alcohol-xileno, alcohol absoluto, alcohol 96° y agua, y se colocaron en un vaso Coplin con 50 mL de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol por 40 min. Se realizaron 3 lavados de 5 min con 50 mL de TRIS-HCl 10mM pH 7.4, NaCl 0.15 M (TRIS salino) y las laminillas se incubaron con albúmina al 0.5% en 50 mL de TRIS salino durante 30 min. Posteriormente, éstas se lavaron 3 veces por 5 min con TRIS salino. Las laminillas se colocaron en una charola de tinción, se les adicionó una solución que contenía el anticuerpo primario Anti-iNOS (Sigma Aldrich Cat. N7782) diluido 1:500 y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente. Después, las laminillas se lavaron con 50 mL de TRIS salino 5 veces por 5 min, se les colocó un anticuerpo secundario Anti-rabbit IgG acoplado a peroxidasa (Cell Signaling Cat. 7074S) diluido 1:1000, se incubaron durante 5 h, se lavaron nuevamente con 50 mL de TRIS salino 4 veces por 5 minutos y con 50 mL de TRIS-HCl 0.1M pH 7.4, tres veces por 5 min. Las laminillas se colocaron en una charola de tinción y se cubrió el área del tejido con la solución reveladora (3 mg de diaminobencidina disuelta en 10 mL de TRIS salino, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3% y 13.61 mg de imidazol (para realzar el color de la reacción). Enseguida una laminilla con solución reveladora se observó al microscopio a un aumento de 10x y cuando aparecieron manchas de color café la reacción se detuvo con agua corriente. Finalmente, las laminillas se contrastaron tiñéndolas con hematoxilina durante 1 min, se montaron con resina y se observaron al microscopio a un aumento de 40X.

## 6. RESULTADOS

### Virulencia de *E. histolytica*

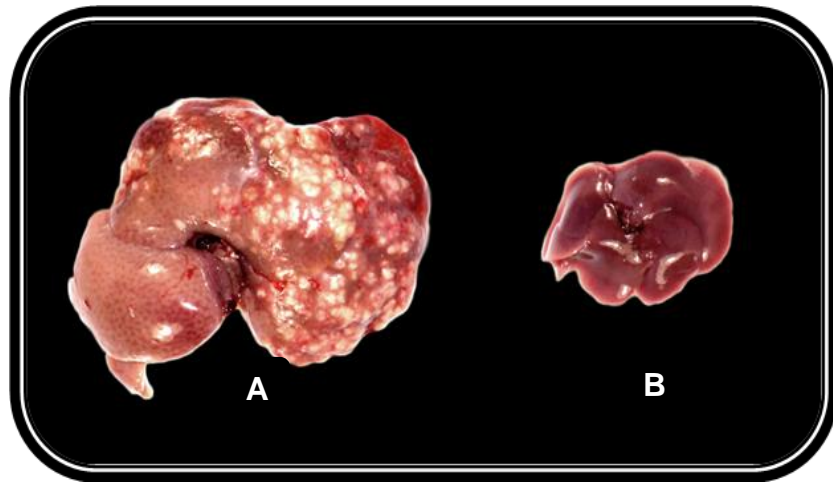
Para mantener la virulencia amibiana se recuperaron de manera periódica trofozoítos de *E. histolytica* del absceso hepático amibiano del hámster. La virulencia de las amibas utilizadas en este estudio fue constante ya que en todos los casos la recuperación de amibas fue posible y provino de lesiones extensas hepáticas del hámster.



**Figura 5.** Aspecto macroscópico de un hígado de hámster infectado con amibas del cual se recuperaron trofozoítos de *E. histolytica* en condiciones axénicas. Se puede apreciar hepatomegalia y múltiples lesiones puntiformes distribuidas en todos los lóbulos.

### **Infección hepática amibiana en ratones y hámsters**

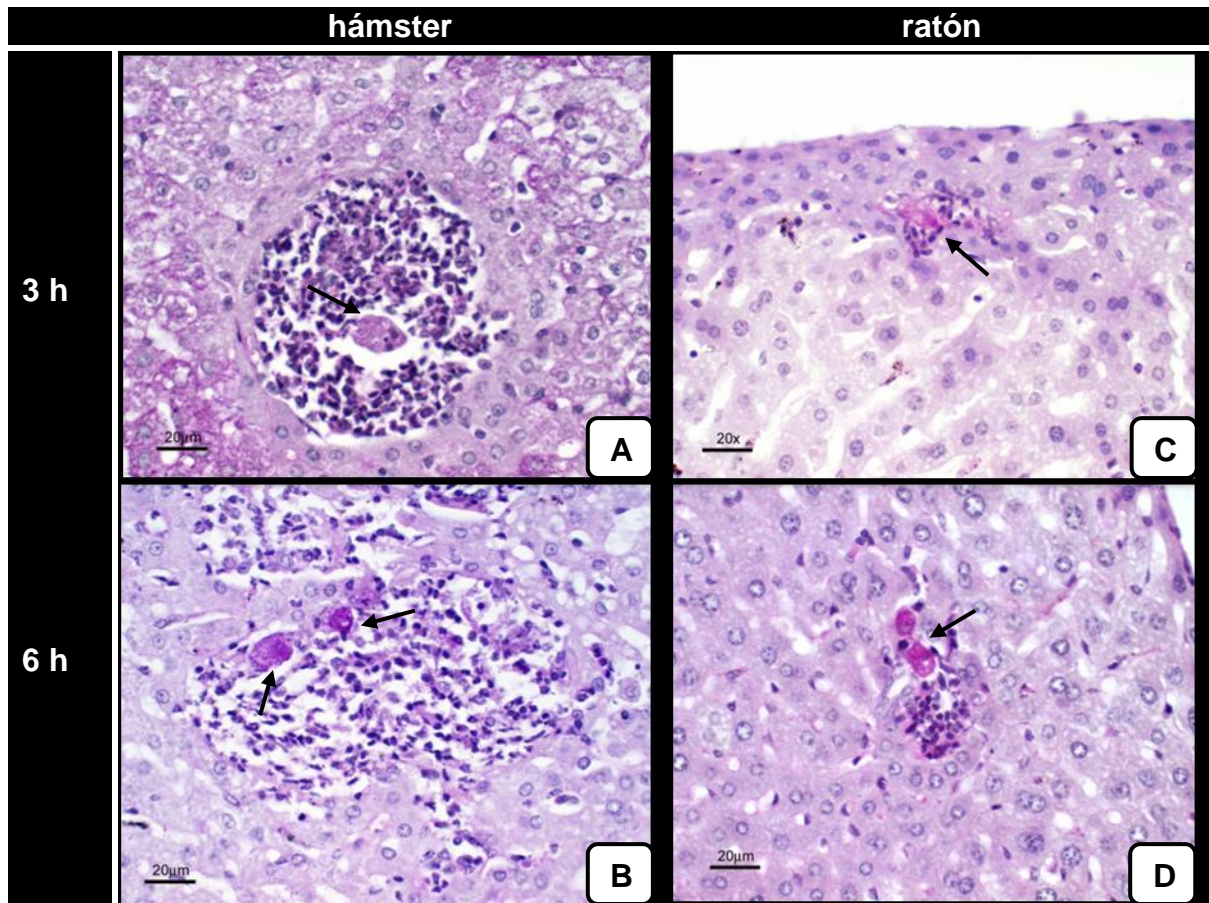
A nivel macroscópico, la infección hepática amibiana en hámsters y ratones no mostró grandes cambios durante las etapas iniciales de infección. Sin embargo, durante las etapas tardías (7 días) el hígado de hámster mostró hepatomegalia y abundantes lesiones distribuidas en todos los lóbulos (Figura 6A). Contrario a esto, los hígados de los ratones no mostraron hepatomegalia ni lesiones macroscópicas (Figura 6B).



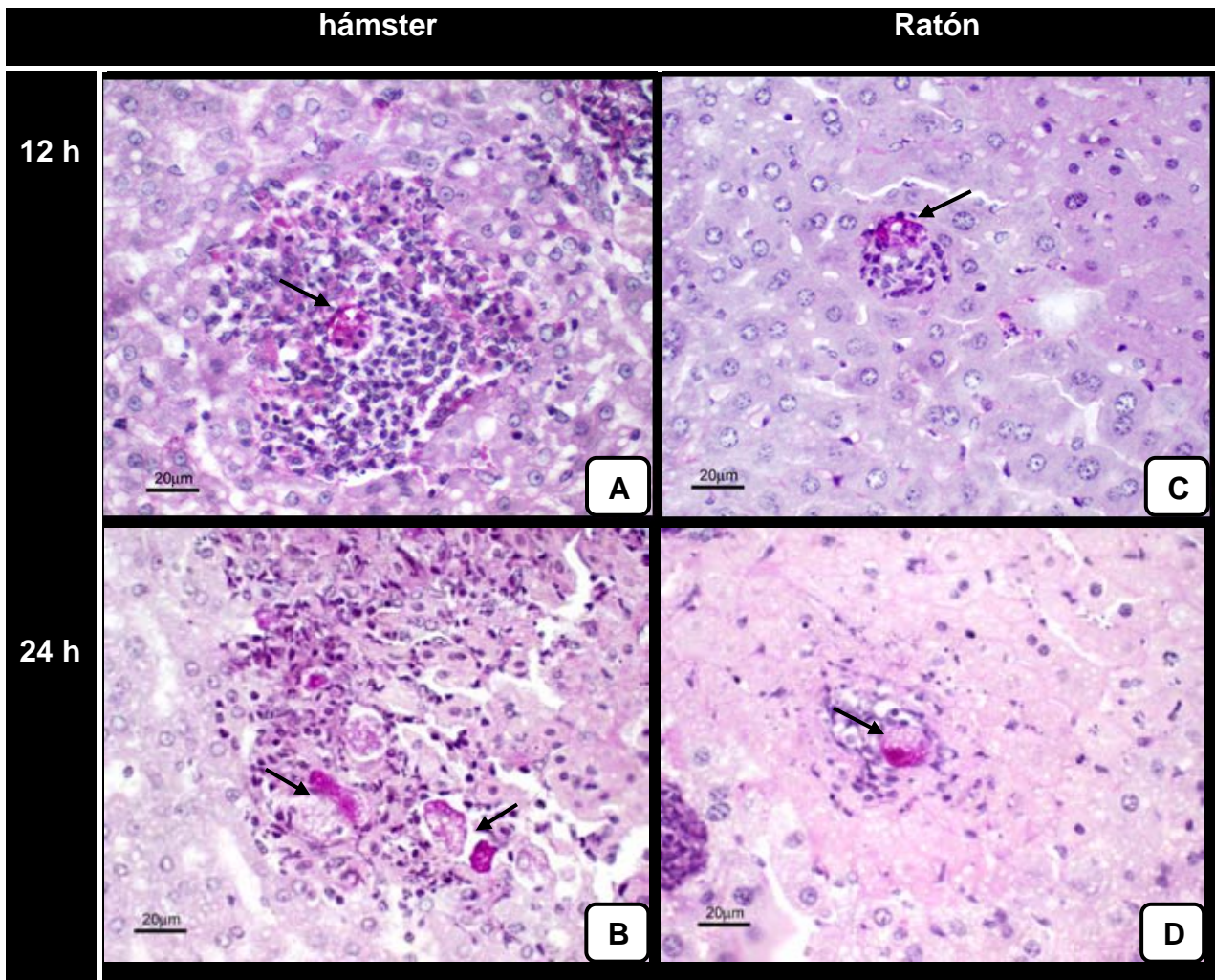
**Figura 6.** Infección hepática amibiana en hámster (A) y ratón (B) con siete días de evolución. En el hígado de hámster se pueden apreciar lesiones puntiformes distribuidas en todo el hígado que están ausentes en el hígado del ratón.

### **Análisis cualitativo del infiltrado inflamatorio en el hígado de hámster y de ratón infectado con *E. histolytica***

El análisis microscópico de los cortes de hígado de hámster se caracterizó por múltiples amibas bien conservadas rodeadas por un abundante infiltrado inflamatorio durante todo el desarrollo de la infección (Fig. 7A, 7B, 8A, 8B). Además, la necrosis fue aparente y progresiva desde las 6 h. A diferencia de esto, en el ratón sólo se observaron algunas amibas bien conservadas durante las etapas iniciales de la infección (Figura 7C, 7D 8C y 8D). Estas amibas estuvieron rodeadas por escasas células inflamatorias y con mínima destrucción tisular.



**Figura 7.** Fotomicrografías de cortes histológicos de hígado de hámster y ratón con inyección intraportal de trofozoítos de *E. histolytica*, después de 3 h y 6 h. Sólo en el hígado de hámster de 6h se observa mínima destrucción tisular. Las flechas señalan algunos trofozoítos bien conservados.

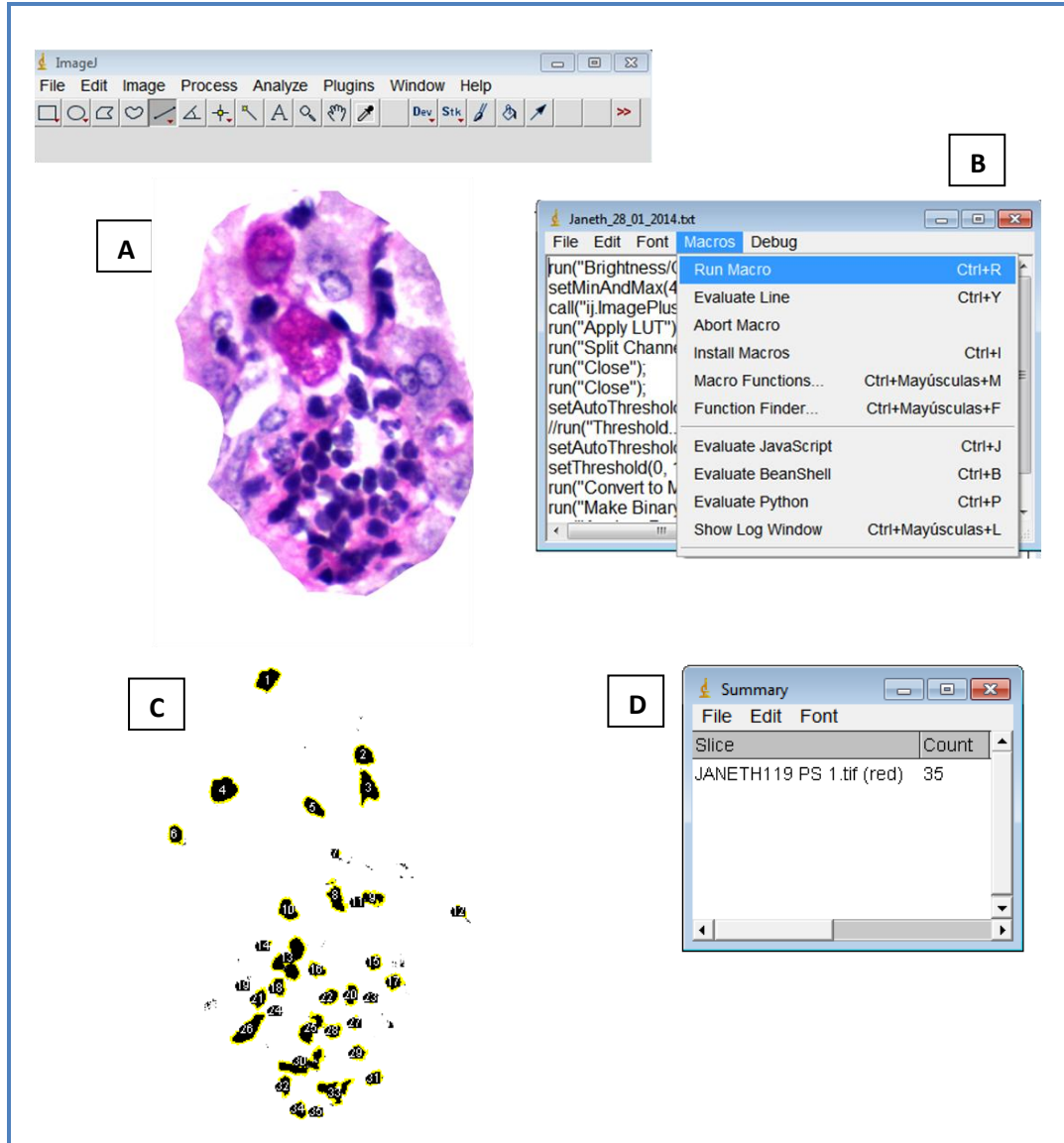


**Figura 8.** En el hámster, 12 h posteriores a la inoculación de amibas (A) se observa un trofozoíto rodeado por células inflamatorias, principalmente leucocitos polimorfonucleares y después de 24 h (B) se produce mayor daño en el tejido, en comparación con el ratón (C) (D) que presenta mínima necrosis. En todas las imágenes algunas amibas bien conservadas son señaladas con flechas.



## Análisis cuantitativo leucocitario en cortes histológicos de hígados de ratón y hámster

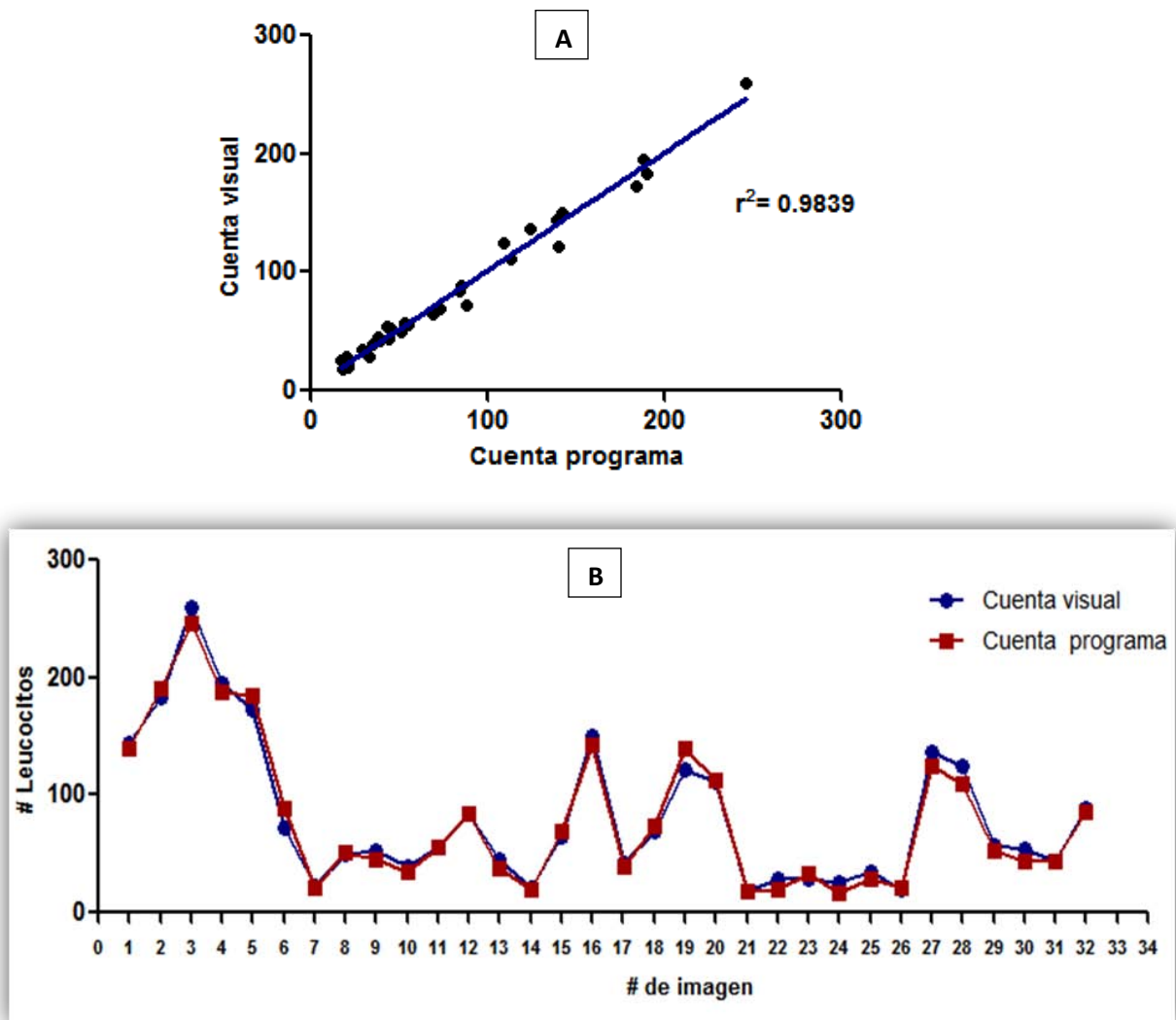
El algoritmo informático permitió determinar el total de leucocitos



**Figura 9.** Algoritmo para la cuenta de leucocitos, utilizando el *software Image J*. A) Imagen a analizar. B) Con el comando *Run Macro* se ejecuta el algoritmo. C) Resultado gráfico del análisis de la imagen. D) Resultado cuantitativo del análisis de imagen (*Count 35*).

## Cuenta de leucocitos con el programa *ImageJ* de forma manual y automática, y validación del algoritmo informático

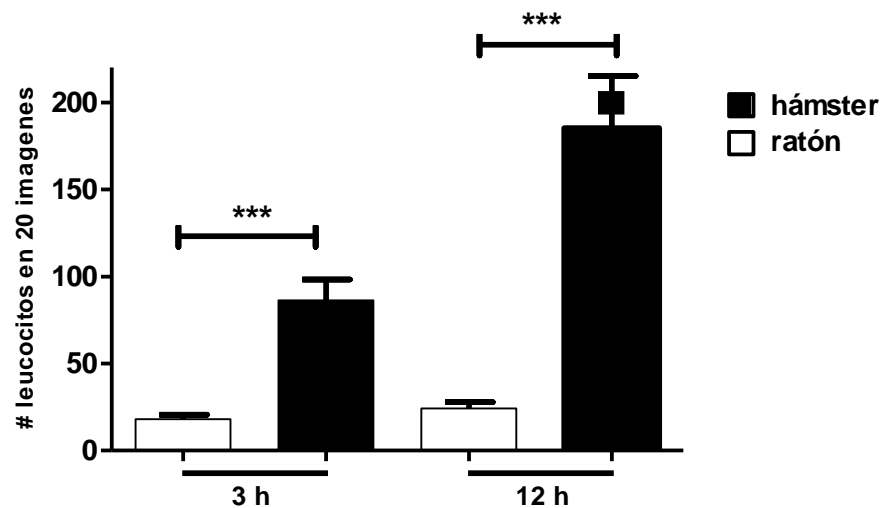
Para validar el algoritmo, se compararon cuentas manuales vs cuentas automatizada de leucocitos presentes en una misma imagen. Los datos obtenidos se graficaron y se realizó una prueba de regresión lineal.



**Figura 10.** Validación del algoritmo. Regresión lineal (A). Se obtuvo una similitud de 0.98 al realizar un análisis entre los dos grupos de datos. (B) Representación de ambos métodos de conteo para una misma imagen.

## Análisis cuantitativo de leucocitos en cortes histológicos de hígados de ratón y hámster infectados con *E. histolytica* virulenta (6 y 12 h)

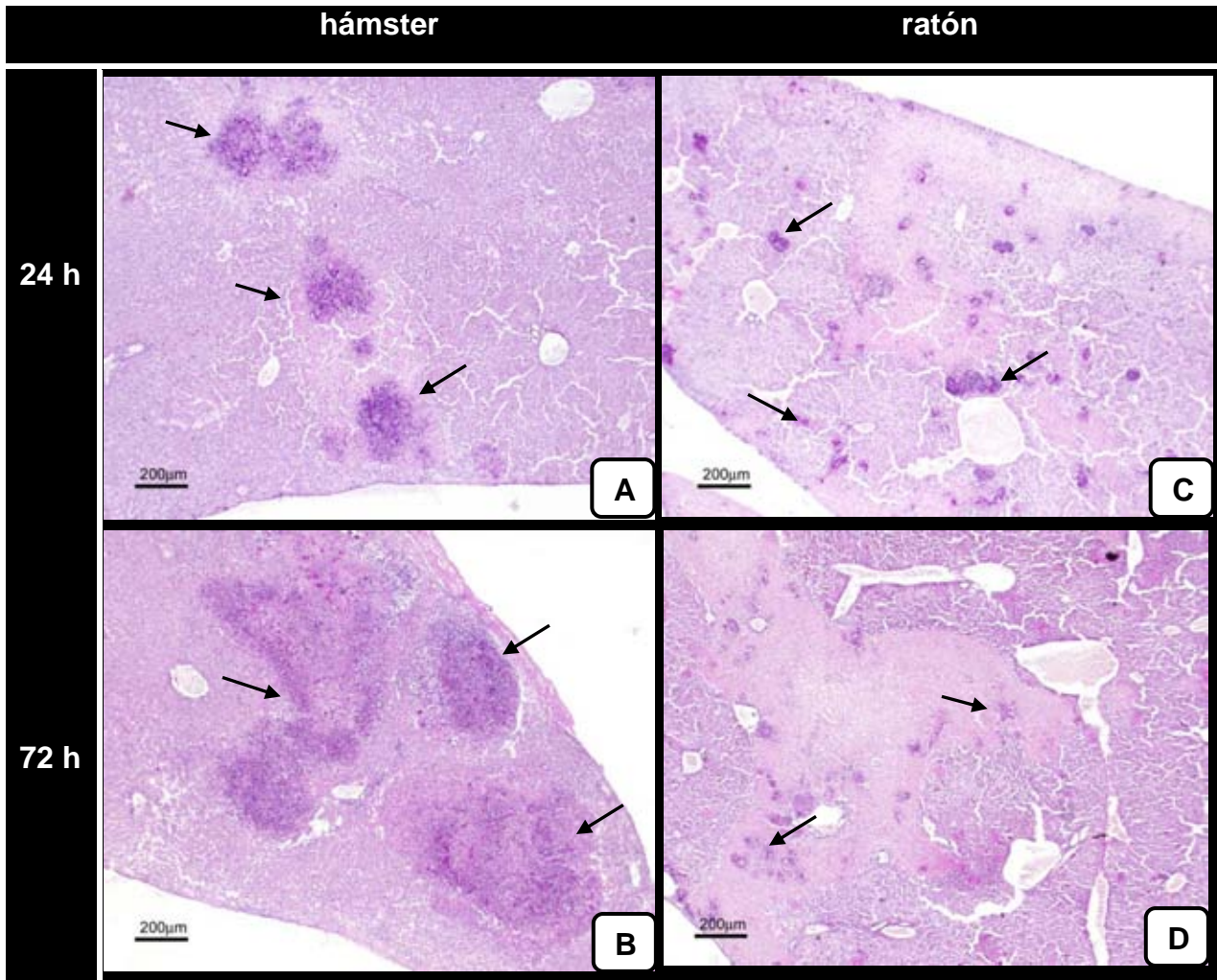
Durante las etapas iniciales de infección amibiana el número de leucocitos en el hígado de hámster fue mayor que los del ratón.



**Figura 11.** A partir de las fotomicrografías de los cortes de hígado de ambos animales, se cuantificaron los leucocitos con el algoritmo informático. Se analizaron 20 imágenes para cada intervalo de tiempo. Se observan diferencias significativas en la cantidad de (PMNs) presentes en el ratón y el hámster en el mismo lapso de tiempo. Se graficó el error medio, prueba Kruskal-Wallis, con post-prueba estadística Dunn's Multiple comparison Test, significancia\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## Análisis cualitativo del daño tisular de hígados de hámster y ratón infectados con *E. histolytica* virulenta (24 y 72 h)

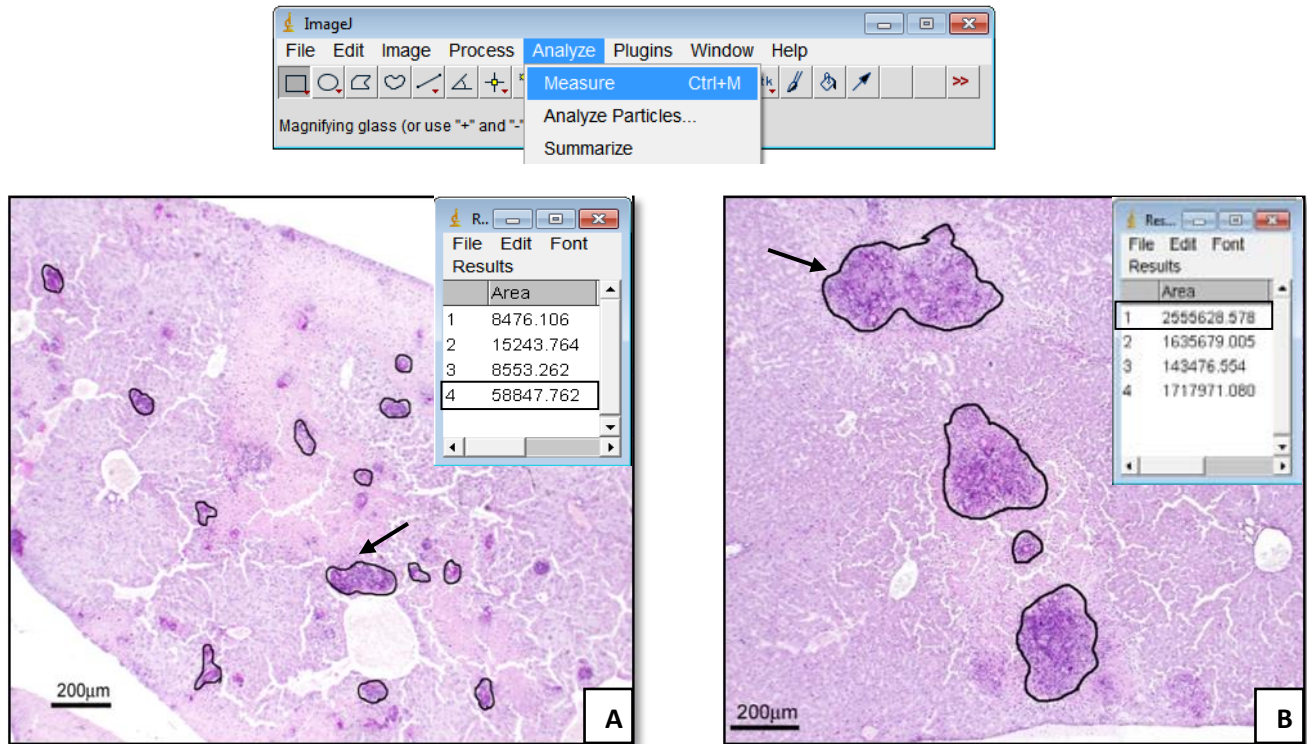
La infección hepática en hámsters y ratones mostró diferencias en la magnitud del área necrosada, la cual es mayor en el hámster.



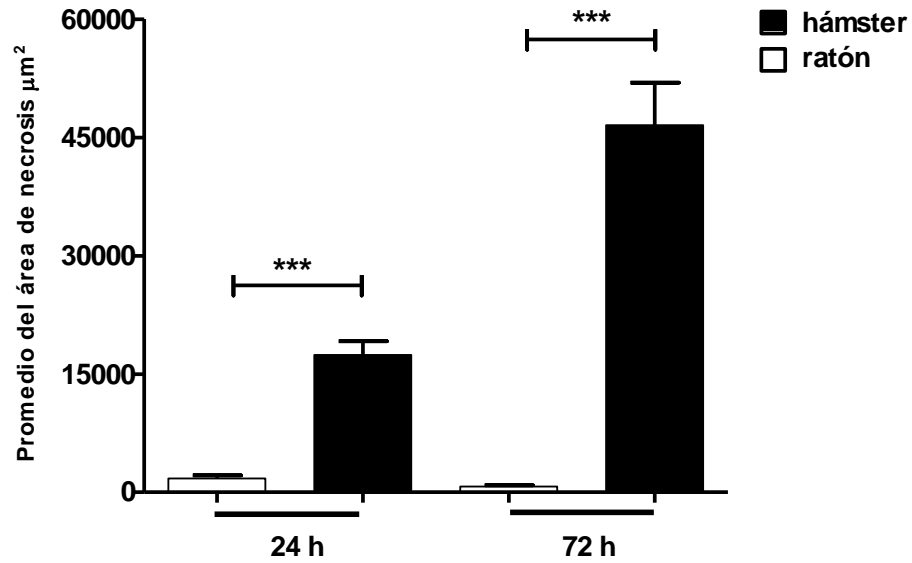
**Figura 12.** En los hígados infectados con amibas la necrosis es aparente y progresiva a partir de las 24 h. En el hámster (A, B) se presenta una intensa y progresiva reacción inflamatoria con necrosis (flechas). En el ratón (C, D) se observan menos zonas con necrosis que no incrementan en área ni en número. Sin embargo, la infección de este animal se caracteriza por grandes zonas de isquemia.

## Análisis cuantitativo del daño tisular de hígados de hámster y ratón infectados con *E. histolytica* virulenta (24 y 72 h)

Con el software *ImageJ* se determinó el área de necrosis calculado en  $\mu\text{m}^2$



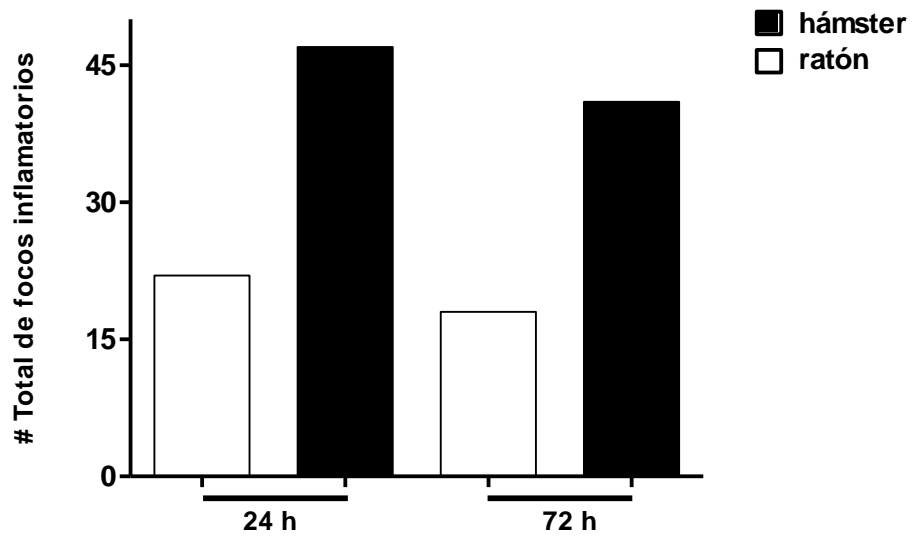
**Figura 13.** Después de 24 h, las zonas necrosadas en el hígado del hámster son mayores que las del ratón. Las áreas seleccionadas corresponden a las zonas necrosadas con abundantes (PMNs). Para cuantificar su superficie se empleó el software *Image J*. El programa indica las medidas del área seleccionada en  $\mu\text{m}^2$  (flechas). Ratón (A) 58 847.762  $\mu\text{m}^2$  y hámster (B) 2 555 628.578  $\mu\text{m}^2$ . Siguiendo este procedimiento las imágenes restantes fueron analizadas y los resultados se muestran en la Figura 14.



**Figura 14.** El área de tejido necrosado fue mayor en el hámster que en el ratón. Se graficó el error medio, prueba Kruskal-Wallis, con post- prueba estadística Dunn's Multiple comparison Test, significancia \*\*\*  $p < 0.0001$ .

## Focos inflamatorios en hámster y ratón

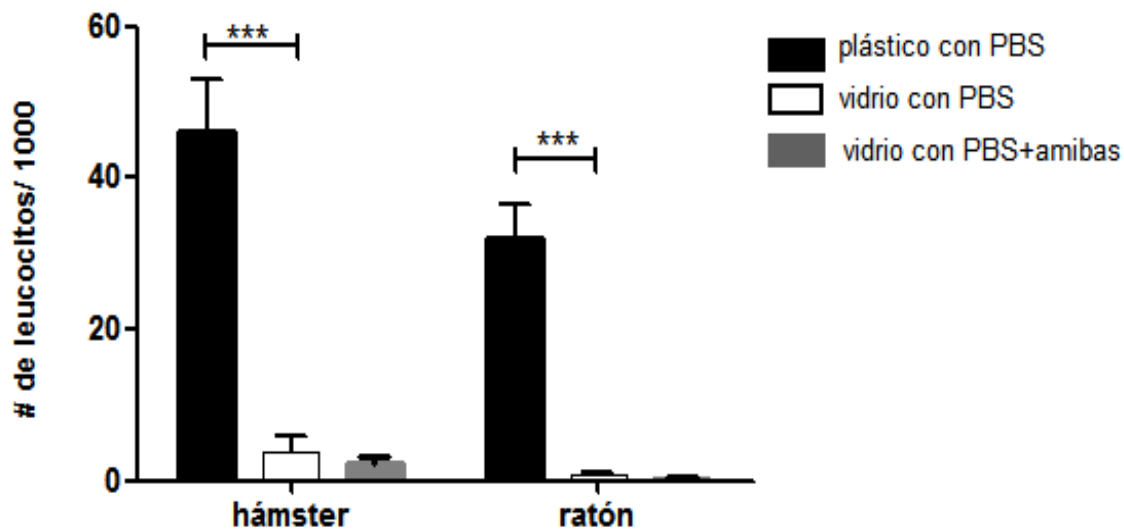
De forma manual se cuantificaron las zonas necrosadas presentes en el hígado de hámster y ratón.



**Figura 15.** Después de 24 y 72 h el número de focos inflamatorios del hígado de hámster es mayor que los del ratón. Se contaron de forma manual los focos inflamatorios (zonas necrosadas con amibas y PMNs) presentes en las lesiones.

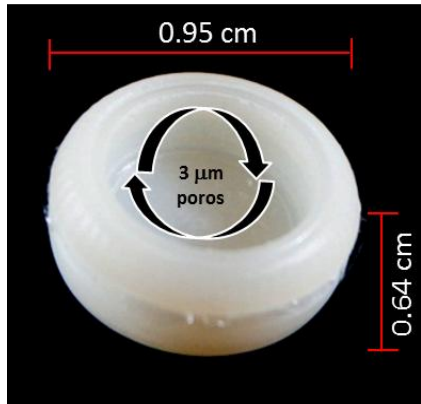
## Quimiotaxis en cavidad peritoneal inducida por PBS en tubos y cámaras de plástico

Para determinar la quimiotaxis leucocitaria inducida por las amibas, se utilizaron cámaras de plástico (Figura 17). Sin embargo, debido a que estas cámaras sin amibas ejercían gran atracción de leucocitos se decidió cambiar de material. Nuestro objetivo era cuantificar los leucocitos atraídos por las amibas y por el suero, mas no por el dispositivo. Es por esto que diseñamos tubos de vidrio pequeños (Figura 18), los cuales en ausencia de amibas ejercieron muy poca atracción de células inflamatorias. Además se observó que la actividad quimiotáctica leucocitaria que las amibas inducen en ambas especies de animales es marginal.

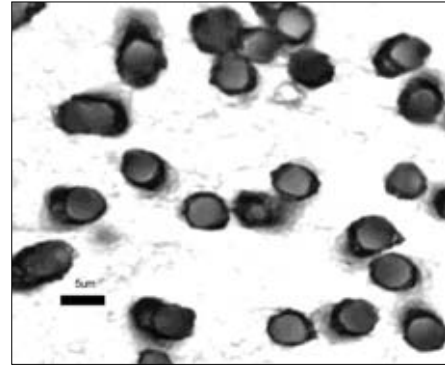


**Figura 16.** El plástico indujo una mayor atracción de leucocitos, en comparación con el vidrio. Las cámaras de plástico y tubos de vidrio fueron introducidos en la cavidad peritoneal de ambos animales. Se eligió este último para la realización de quimiotaxis *in vivo*. Prueba estadística ANOVA 2 vías, con post-prueba estadística Bonferroni, significancia \*\*\*  $p < 0.0001$





**Figura 17.** Cámaras de plástico cubiertas con membrana de policarbonato (Figura 17a)



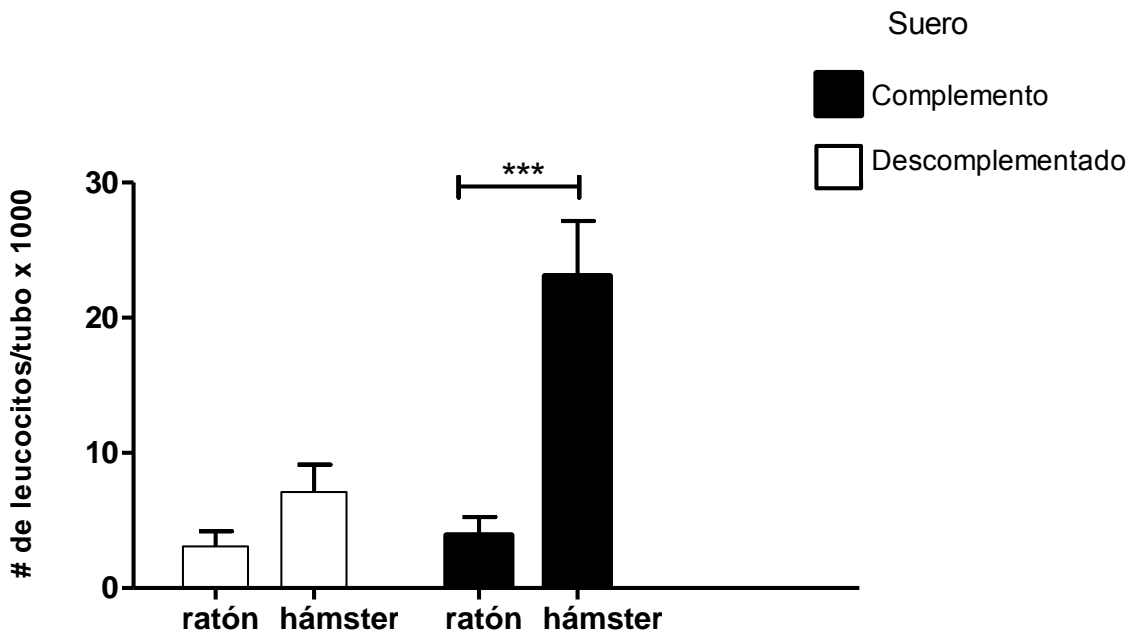
**Figura 17a.** Membrana de policarbonato poros de 3  $\mu\text{m}$ . Lot #W8220003 NeuroProbe, Inc.



**Figura 18.** Dispositivo diseñado para la realización de quimiotaxis *in vivo*. Tubos de vidrio cubiertos con membrana de policarbonato (Figura 17a)

### Actividad quimiotáctica del complemento de hámster y ratón en la cavidad peritoneal de ratón (6 h)

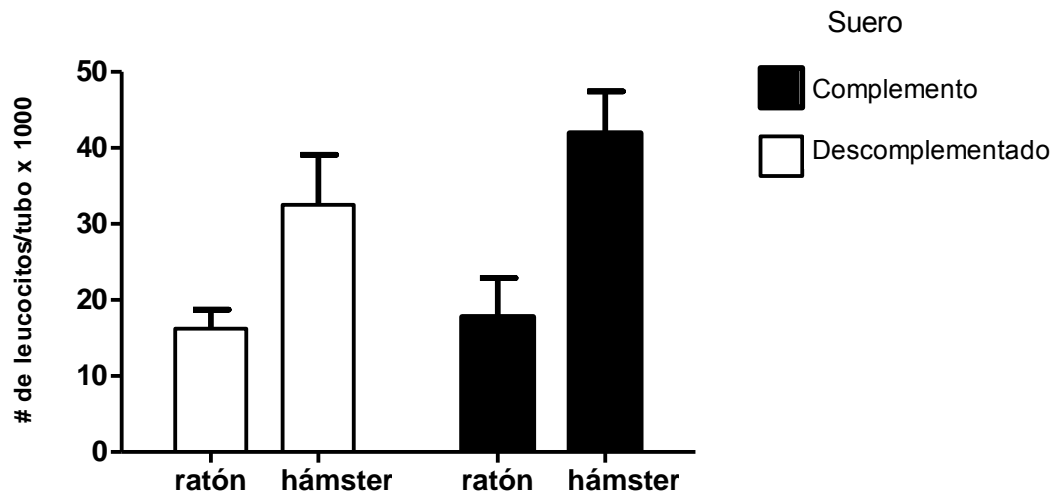
Los tubos de vidrio que contenían suero de hámster o de ratón, fresco o descomplementado más amibas, fueron introducidos en la cavidad peritoneal de ratones. La activación del complemento de hámster por amibas atrae a los leucocitos del ratón, por el contrario la incubación de suero fresco de ratón con amibas no estimula la quimiotaxis de los leucocitos del ratón (Figura 19).



**Figura 19.** Quimiotaxis *in vivo*. En la cavidad peritoneal del ratón se colocaron tubos de vidrio con cincuenta mil trofozoítos de *E. histolytica* incubados con suero de hámster y ratón fresco y descomplementado. Después de 6 h se contabilizaron los leucocitos atraídos por el suero incubado con las amibas. Prueba estadística ANOVA 2 vías, con post-prueba estadística Bonferroni, significancia \*\*\*  $p < 0.0001$ .

### Actividad quimiotáctica del complemento de hámster y ratón en la cavidad peritoneal de hámster (6 h)

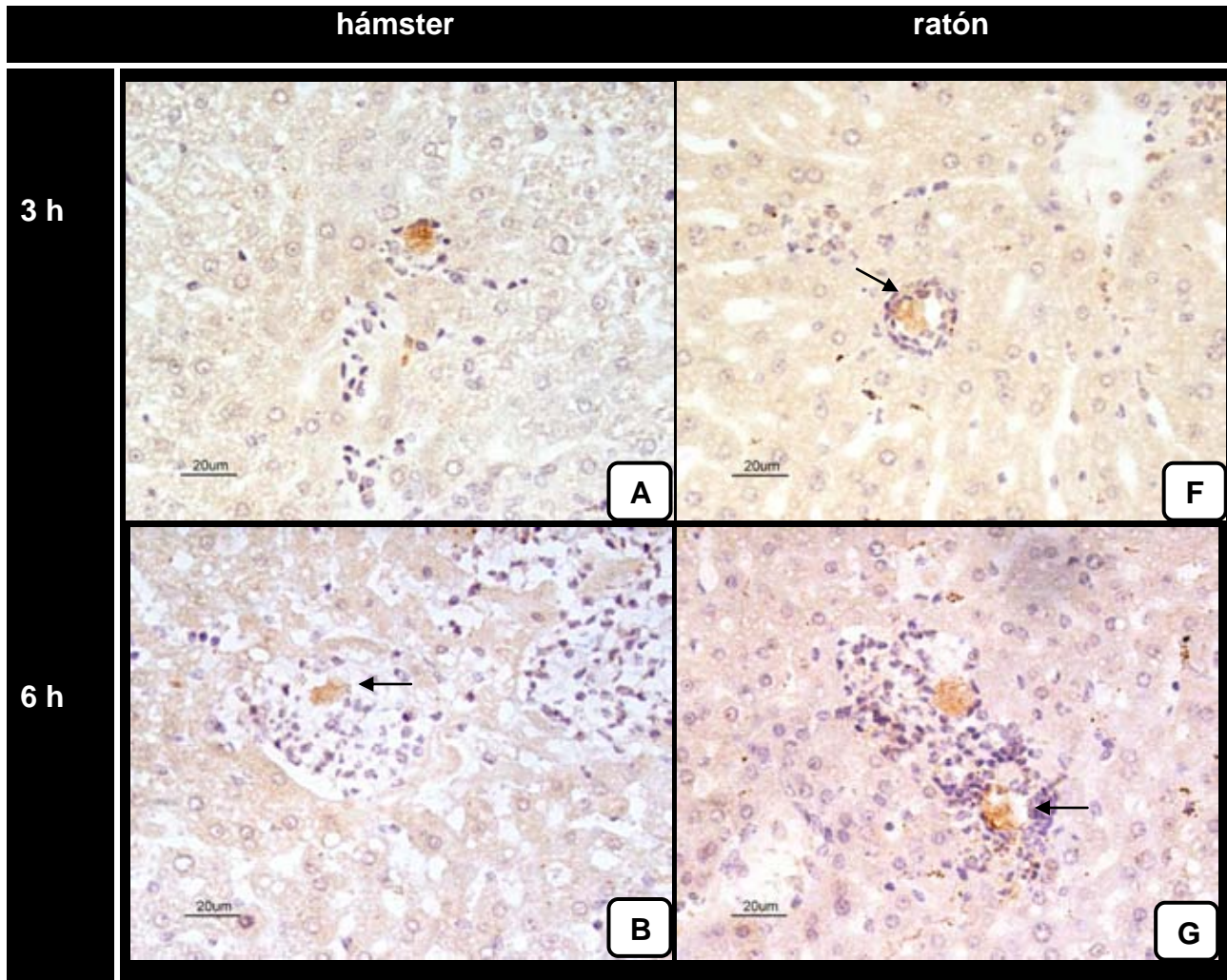
Los tubos de vidrio que contenían suero de hámster o de ratón, fresco o descomplementado más amibas, fueron introducidos en la cavidad peritoneal de hámsters. La incubación de las amibas con suero fresco o descomplementado de hámster o de ratón estimuló la quimiotaxis de los leucocitos del hámster.

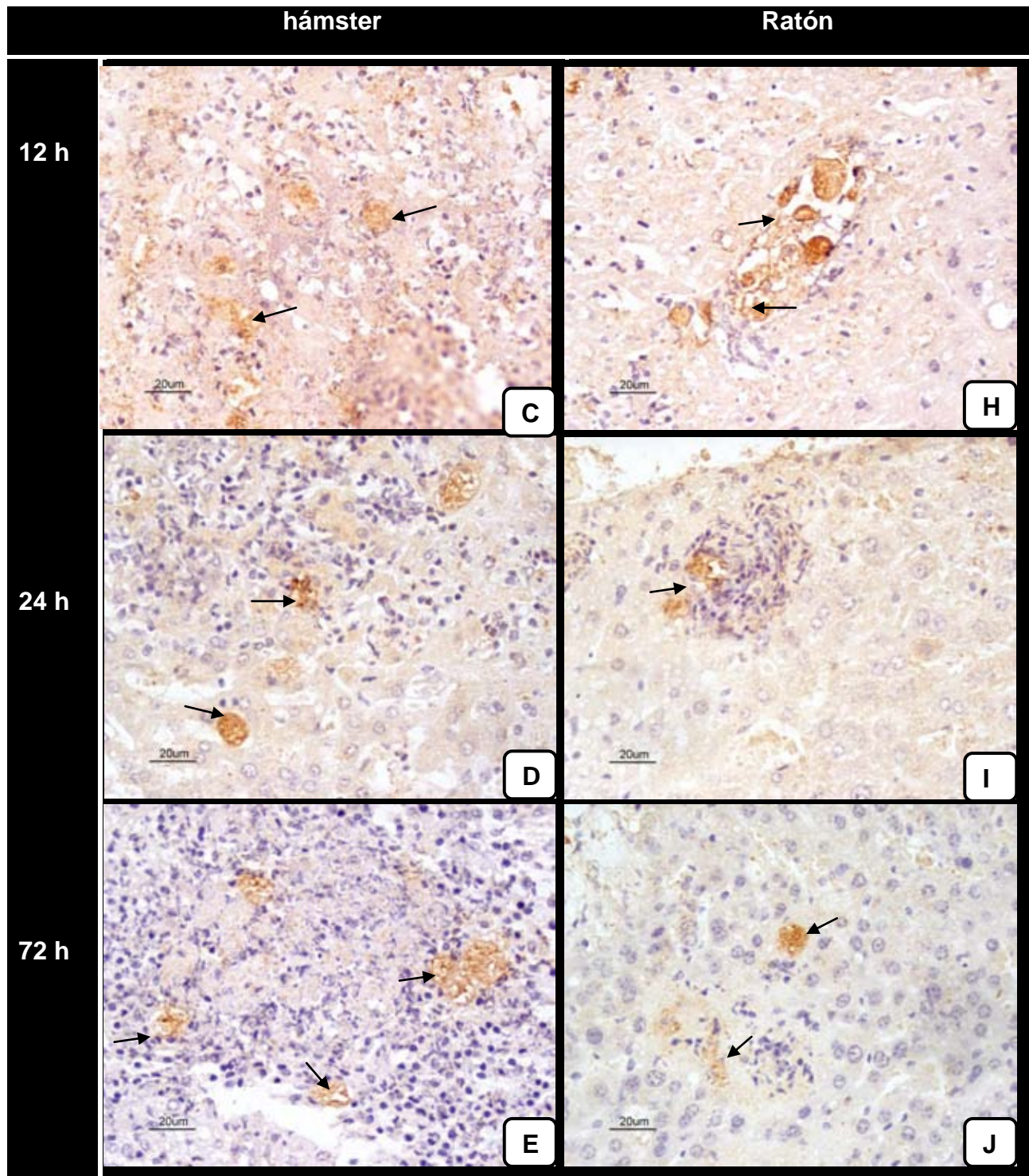


**Figura 20.** Quimiotaxis *in vivo*. En la cavidad peritoneal del hámster se colocaron tubos de vidrio con cincuenta mil trofozoítos de *E. histolytica* incubados con suero de hámster y ratón fresco y descomplementado. Después de 6 h se contabilizaron los leucocitos atraídos por el suero incubado con las amibas. No se observa diferencia significativa entre los grupos. Prueba estadística ANOVA 2 vías, con post-prueba estadística Bonferroni, significancia \*\*\*  $p < 0.05$

## Detección de iNOS por inmunohistoquímica

Detección de iNOS por inmunohistoquímica en hígado de hámster y ratón 3, 6, 12, 24 y 72 h después de la infección por *E. histolytica*. Durante el transcurso de la infección, en ambos animales no se observan leucocitos positivos a iNOS.





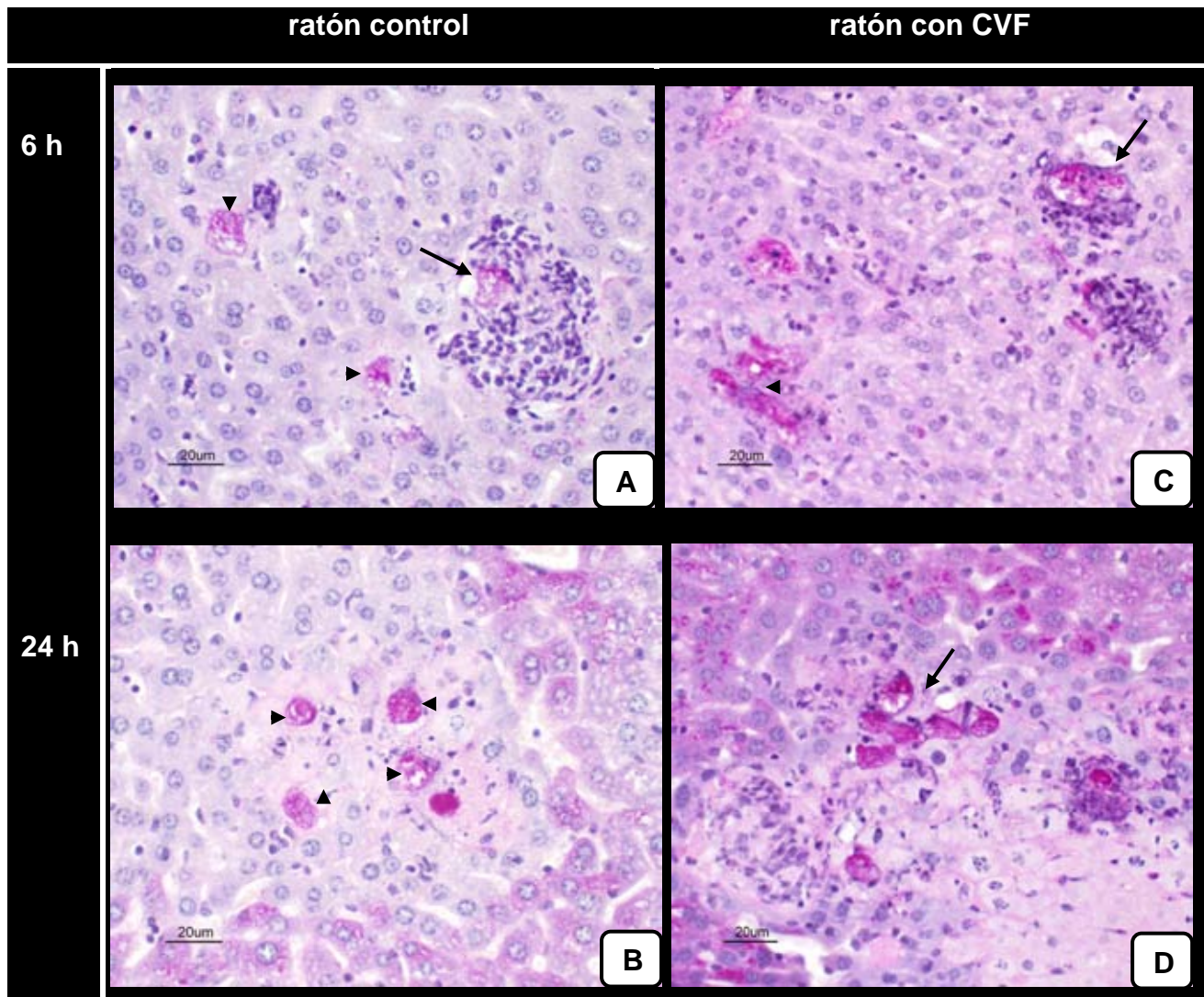
**Figura 21.** Durante las etapas iniciales y tardías de la infección hepática amibiana, el NO no participa en la eliminación de *E. histolytica*. En ambos animales los leucocitos que rodean a las amibas no expresan iNOS. Sin embargo, las amibas (flechas) muestran reacción positiva ya que tienen algunos epítomos que son reconocidos por los anticuerpos anti-iNOS (Hernández-Campos *et al.*, 2003). En el control negativo correspondiente a IgG normal las amibas y los leucocitos no se tiñen (imagen no mostrada).

## **Efecto de la hipocomplementemia en la infección amibiana hepática en el ratón**

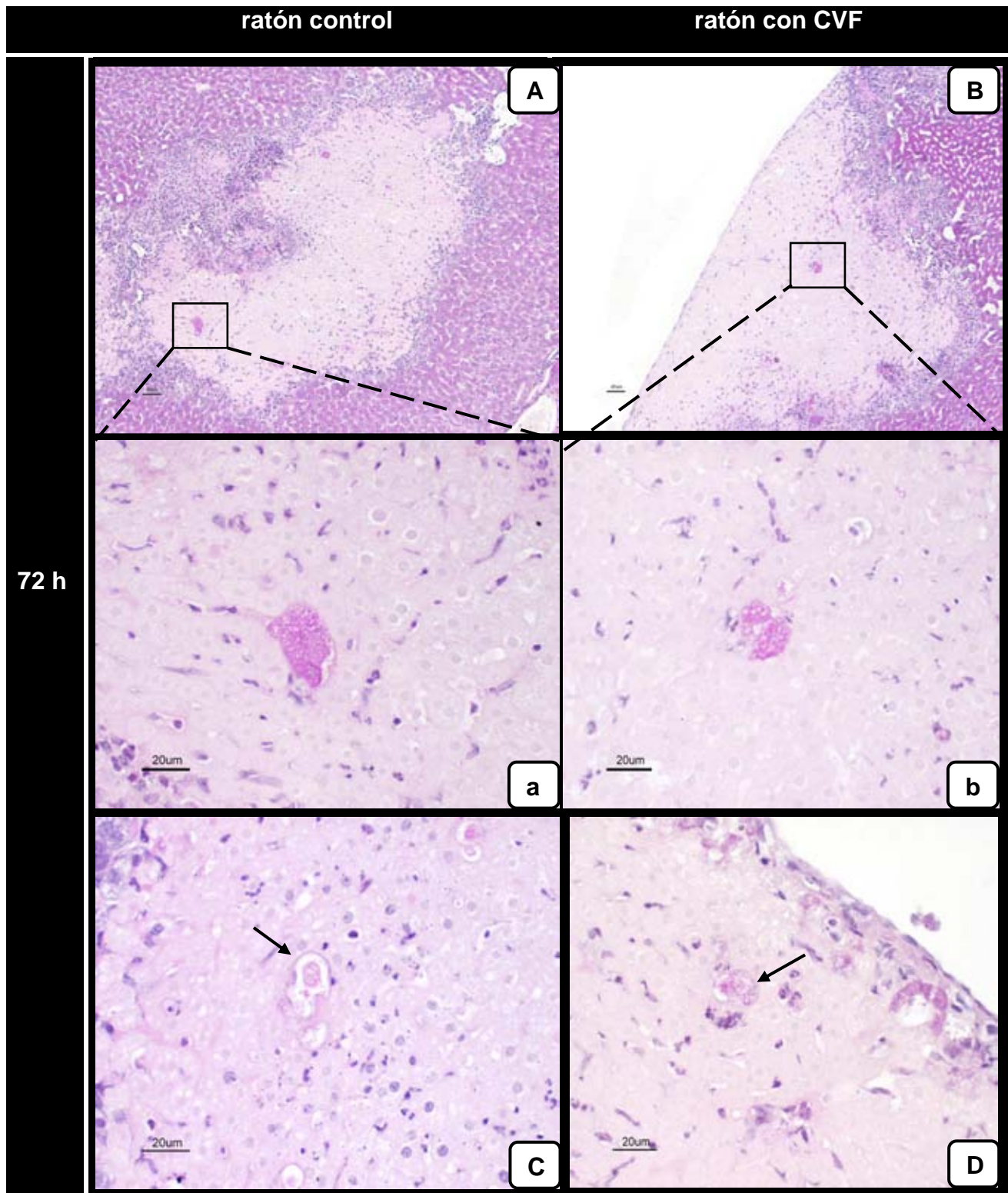
El CVF purificado mostró buena actividad hipocomplementémica en el suero de la rata ya que la administración intraperitoneal de 7.3 µg fueron capaces de inhibir completamente la lisis de *E. histolytica* (100%). Por otra parte, el suero de rata normal (control) causó lisis completa de las amibas.

Durante la infección amibiana hepática en el ratón, la hipócomplementemia causada por el CVF no modificó la intensidad del infiltrado inflamatorio ni prolongó la sobrevivencia de *E. histolytica*. No se observan diferencias histológicas entre los ratones inyectados con CVF y los ratones normales (Figura 22).

Además, al inicio de la infección 6 h (Figura 22 A y C), las amibas bien conservadas o sus fragmentos muestran un color rosa intenso por la tinción PAS. Esta tinción indica gran cantidad de carbohidratos que se mantiene hasta las 24 h (Figura 22 B y D). Después de 72 h (Figura 23 C y D) las amibas presentan una disminución en la intensidad del color (flechas), lo que sugiere consumo del glucógeno por disminución de glucosa.

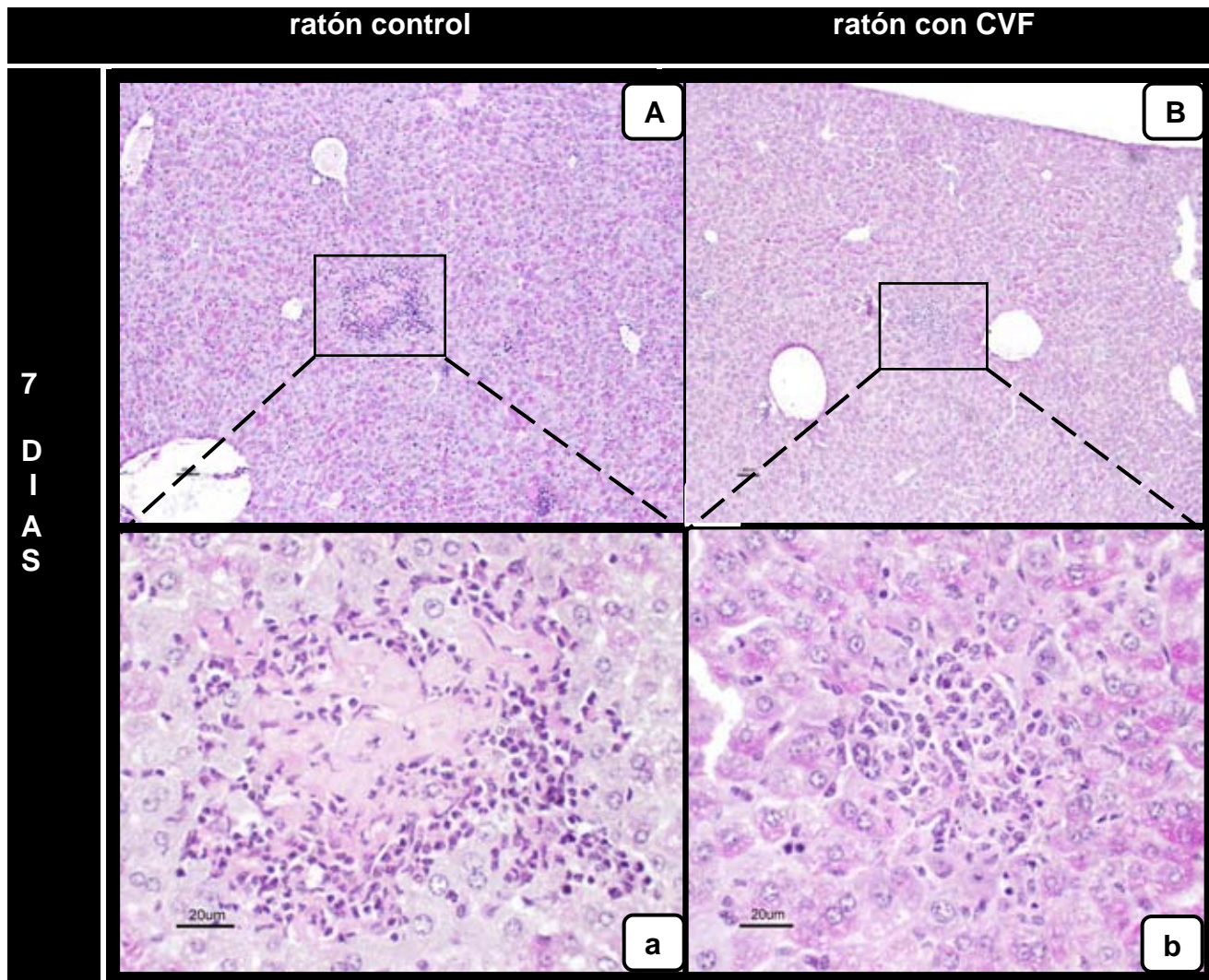


**Figura 22.** Después de 6 h en ambos animales (A) (C) no se observan diferencias histológicas. Además, 24 h después (B) (D) se empiezan a observar zonas con isquemia. En todos los casos se observan amibas bien conservadas, algunas solas (punta de flecha) y otras rodeadas por leucocitos (flechas).



**Figura 23 .** Después de 72 h de infección en el grupo control (A) y con CVF (B) la isquemia es aparente y a pesar de ello no hay necrosis tisular. Además, en ambos grupos el infiltrado inflamatorio es escaso o nulo.





**Figura 24.** Después de 7 días de la infección en el ratón normal (A) y con CVF (B) se observa que el tejido dañado se ha regenerando, no hay daño ni fragmentos de amibas y sólo se observan algunos leucocitos residuales.

## 7. DISCUSIÓN

El modelo del absceso hepático amibiano experimental (AHAE) en hámster es el más utilizado en el estudio de los mecanismos moleculares de patogenicidad de *E. histolytica* (Tsutsumi *et al.*, 2006). Contrario a esto, la rata, el cobayo y el ratón son roedores que han mostrado ser resistentes al desarrollo del AHAE (Figura 6). Los fármacos que actualmente se usan para el tratamiento de la amibiasis tienen un efecto nocivo sobre la flora intestinal, su uso es indiscriminado y en algunas ocasiones han mostrado ser ineficaces (Hanna *et al.*, 2000). Es por esto que la inducción de resistencia amibiana en animales susceptibles a partir del conocimiento de los mecanismos moleculares de resistencia natural, que algunos roedores presentan a la amibiasis, puede dar lugar a nuevas y mejores alternativas terapéuticas. Diversas cepas de ratones han sido usadas para estudiar la patogenicidad de *E. histolytica*. Sin embargo, en todos ellos las amibas desaparecen en corto tiempo y el daño mecánico debido a la inyección directa de abundantes parásitos en el parénquima hepático (Velázquez *et al.*, 1998) representa un importante artificio metodológico. Uno de los principales objetivos de la respuesta inflamatoria inducida por diversos microorganismos es evitar su diseminación y proporcionar factores citotóxicos solubles y celulares. Además, se sabe que la respuesta inflamatoria ante un determinado estímulo presenta variaciones inter-especie (Jaeschke, 2006). En el presente trabajo la inyección intraportal de las amibas en los ratones Balb/c permitió el estudio comparativo de la magnitud de la respuesta inflamatoria con la del hámster sin artificios metodológicos. Además, el desarrollo de un algoritmo informático permitió cuantificar los resultados de dicho estudio. Al inyectar el parásito en hígados de hámsters se indujo una intensa afluencia de leucocitos PMNs y mononucleares (Figura 7A, 7B, 8A, 8B) similar a lo ya reportado por Tsutsumi *et al.*, (1984). Contrario a lo que sucede en este animal, la respuesta inflamatoria del ratón que la amiba induce es escasa (Figuras 7C, 7D 8C y 8D).

Una vez que los trofozoítos entran en contacto con componentes del plasma, incluyendo las proteínas del complemento, la mayoría de éstos no son lisados a pesar de la activación del complemento (Reed et al., 1989). Se sabe que la activación del complemento genera potentes péptidos quimiotácticos como C3a y C5a, siendo C5a una potente anafilatoxina, la cual además de inducir la quimiotaxis de los neutrófilos (PMNs) (Fernández *et al.*, 1978), también participa en la activación de los macrófagos (Chenoweth *et al.*, 1982). Se ha observado que algunos microorganismos ya sean bacterias o parásitos pueden ser capaces de sintetizar y liberar moléculas quimiotácticas o inhibitoras de la cascada del complemento. Por ejemplo, *S. aureus* es una bacteria capaz de producir diversos inhibidores del complemento que interfieren con las distintas etapas de su activación (Rooijackers *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004; Laarman *et al.*, 2011). Por otra parte, los ácaros de la sarna también producen una variedad de proteínas que inhiben la activación del complemento, como la proteína SMSB4 que interfiere con el inicio de la activación del complemento, lo cual disminuye la opsonización y fagocitosis de bacterias por los neutrófilos (Swe *et al.*, 2014).

Nuestros estudios *in vivo* mostraron que, en ausencia de complemento, la actividad quimiotáctica leucocitaria que las amibas inducen en ambas especies de animales es marginal. Sin embargo, la activación del complemento de hámster por *E. histolytica* ejerce una alta actividad quimiotáctica sobre los leucocitos de hámster y de ratón, lo cual puede explicar en parte el intenso y permanente infiltrado inflamatorio durante el AHAE en hámsters. Por el contrario, la incubación del suero fresco de ratón con amibas no estimuló la quimiotaxis en leucocitos de ratón. Además, la hipocomplementemia en el ratón no modificó la magnitud de la inflamación ni el tiempo de supervivencia del parásito. Estos resultados sugieren que la activación del complemento de ratón por *E. histolytica* no genera péptidos con actividad quimiotáctica o que las amibas no son capaces de activar el complemento de ratón. Esto podría atribuirse al menos a dos causas: 1) a la falta o poca afinidad de los receptores C5a presentes en la membrana de los leucocitos, ya que estos receptores son determinantes para la respuesta quimiotáctica al fragmento C5a del complemento (Rojas-Espinosa 2006), y 2) a

que la reacción inflamatoria es atenuada mediante la degradación de las anafilotoxinas C3a y C5a por la proteasas de cisteína de *E. histolytica* (Reed *et al.*, 1995). Estudios para evaluar la capacidad de *E. histolytica* de activar el complemento de ambas especies están en progreso.

Además de la quimiotaxis ejercida por el complemento, éste también posee efecto lítico, el cual podría tener efectos perjudiciales sobre las amibas. Sin embargo, la resistencia amibiana al complemento puede explicarse al menos por dos mecanismos: 1) *E. histolytica* puede resistir la lisis mediada por el complemento a través de la activación del complemento en fase fluida por la proteasa EhCP de 56 kDa (Reed *et al.*, 1990) y 2) por la inhibición de la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) por un epítipo que se encuentra en la adhesina EhGL, el cual muestra una alta similitud con CD59 de humanos (Braga, *et al.*, 1992).

Se ha sugerido que el NO<sup>•</sup> puede desempeñar un papel importante en la eliminación de *E. histolytica* del hígado de ratón, ya que estudios *in vitro* han mostrado alta actividad amebicida por parte del NO<sup>•</sup> producido por macrófagos activados (Denis *et al.*, 1989; Ghadirian *et al.*, 1993 ; Lin *et al.*, 1992 ). Además, en condiciones *in vivo* durante las etapas iniciales de la infección amibiana hepática en los ratones Balb/c y C3H/HeJ los neutrófilos que rodean al amiba son capaces de producir la enzima iNOS que cataliza la síntesis de NO<sup>•</sup> (Jarillo-Luna *et al.*, 2002). Sin embargo, nuestros resultados no son compatibles con dicha hipótesis ya que en el hígado del ratón Balb/c los escasos leucocitos que rodean a las amibas no expresan la enzima iNOS (Figura 21) lo cual sugieren que el NO<sup>•</sup> producido por iNOS no desempeña un papel importante en la resistencia natural del ratón BALB/c a la infección hepática experimental. Este resultado es apoyado por experimentos previos realizados con ratones genéticamente deficientes en iNOS (C57BL/6), en los cuales a pesar de haberse desarrollado más lesiones hepáticas, la carga parasitaria no incrementó (Seydel *et al.*, 2000).

Por todo lo anterior y aunque pueda parecer inverosímil, los resultados obtenidos sugieren que la ausencia de infiltrado inflamatorio es la principal causa de la

resistencia del ratón a la infección hepática amibiana. Los resultados histológicos de este modelo indican que las amibas desaparecen en dos etapas. La primera de ~3-6 h con y sin escasa afluencia de leucocitos, y la segunda de ~72h caracterizada por isquemia, ausencia de necrosis y escaso o nulo infiltrado inflamatorio. Este análisis sugiere que desde las etapas iniciales, en el hígado infectado con amibas, existen áreas con circulación comprometida.

Se sabe que la amiba es un microorganismo microaerófilico que no sobrevive en ambientes con concentraciones de oxígeno superiores al 5% (Canales-Treviño *et al.*, 1990). Al igual que los organismos anaeróbicos la principal causa de la susceptibilidad de *E. histolytica* al oxígeno se debe al aumento del estrés oxidante que inactiva los centros Fe-S de sus enzimas, lo cual genera disfunción metabólica, acidificación citoplasmática, pérdida de la integridad de la membrana y muerte (Olivos-García *et al.*, 2012). Es por esto que las concentraciones de oxígeno presentes en el hígado que oscilan entre el 6 y el 13 % (Nauck *et al.*, 1981) no son compatibles con la sobrevivencia de *E. histolytica*. Al igual que en el hígado de hámster (Rigothier *et al.*, 2002), nuestro análisis histológico reveló una desaparición masiva de las amibas del hígado del ratón durante las etapas iniciales de la infección. Es posible que dicha desaparición se deba a que éstas estuvieron en zonas bien perfundidas las cuales mantienen los niveles fisiológicos de oxígeno. Sin embargo, la baja tensión de oxígeno en áreas con isquemia debiera favorecer la proliferación y sobrevivencia de las amibas hasta ~72h. Se sabe que la glucólisis es la principal fuente de energía de *E. histolytica* ya que este parásito carece de mitocondrias y por lo tanto de fosforilación oxidativa. Además, se ha sugerido que durante el AHAE en hámster la destrucción tisular que la inflamación produce le proporciona al parásito nutrientes para su sobrevivencia y proliferación (Olivos-García *et al.*, 2004). En el hígado de ratón y posterior a 72h, la completa desaparición de las amibas puede explicarse por la falta de glucosa y de otros nutrientes derivados de la necrosis. Es decir, la isquemia limita el acceso de glucosa y la poca que queda es consumida por el parásito; la disminución de la intensidad de la tinción PAS en la amiba durante el periodo de ~72h (Figura 23) sugiere ausencia de glucosa. Además, debido a la escasa o nula afluencia

leucocitaria, no se genera destrucción tisular la cual favorecería la sobrevida amibiana. A pesar de que este parásito ha sido denominado histolítico, en el hígado de ratón y al igual de lo que sucede en hámsters leucopénicos (Olivos-García *et al.*, 2004), en ausencia de células inflamatorias, éste no fue capaz de causar la destrucción de hepatocitos. Similar a lo ocurrido en condiciones *in vitro*, es posible que los inhibidores de proteasas presentes en los sinusoides hepáticos, como  $\alpha$ -2 macroglobulina, inhiban la capacidad citolítica del parásito (Montfort *et al.*, 1993).

Finalmente, la incapacidad de *E. histolytica* de sobrevivir en el hígado de hámsters leucopénicos demuestra que una intensa reacción inflamatoria es una condición necesaria del hospedero para ser susceptible a la amibiasis (Olivos-García *et al.*, 2004).

## **8. CONCLUSIÓN**

La resistencia natural del ratón Balb/c a la amibiasis hepática experimental se correlaciona con la escasa afluencia leucocitaria.

## 9. APÉNDICE

### Stock de fosfatos

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.15 M

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.15 M

Llegar a un pH final de 7.2

### Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Stock de fosfatos 100 mL

NaCl 14.41 g

Aforar a un volumen de 1 L con agua desionizada

### Solución TRIS-HCl 1M pH 7.4

TRIS-Base ( $\text{HOCH}_2$ )<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> 60.57 g

Ajustar pH a 7.4 con HCl

Aforar a un volumen de 500 mL con agua desionizada

### TRIS-HCl 10 mM pH 7.4 NaCl 0.15M

Solución TRIS-HCl 1M pH 7.4 10 mL

NaCl 8.76 g

Aforar a un volumen de 1 L con agua desionizada

### TRIS-HCl 10 mM pH 7.4

Solución TRIS-HCl 1M pH 7.4 10 mL

Aforar a un volumen de 1 L con agua desionizada

### TRIS-HCl 0.1M pH 7.4

Solución TRIS-HCl 1M pH 7.4 50 mL

Aforar a un volumen de 500 mL con agua desionizada



## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, Abul K., MBBS Andrew, Lichtman H. 2004. Inmunología celular y molecular, Mecanismos efectores de la inmunidad humoral Elsevier, 5<sup>ta</sup> ed.
2. Bogdan, C. 2000. The function of nitric oxide in the immune system. in Handbook of Experimental Pharmacology. Volume: Nitric Oxide. ed. Mayer B. 443–492 Springer, Heidelberg.
3. Borregaard, N. 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. Immunity 33: 657–670.
4. Braga, L.L., Ninomiya, H., McCoy, J.J., Eacker, S., Wiedmer, T., Pham, C., Wood, S., Sims, P.J., Petri, W.A. Jr. 1992. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Invest. 90(3): 1131-7.
5. Caballero-Salcedo, A., Viveros-Rogel, M., Salvatierra, B., Tapia-Conyer, R., Sepulveda-Amor, J., Gutiérrez G., Ortiz-Ortiz L. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. Am. J. Trop. Med. Hyg. 4:412-419.
6. Chadee, K., Moreau, F., Meerovitch, E., 1987. *Entamoeba histolytica*: chemoattractant activity for gerbil neutrophils in vivo and *in vitro*. Exp. Parasitol. 64:12–23.
7. Chenoweth, D. E., Goodman, M. G., Weigle, W. O. 1982. Demonstration of a specific receptor for human C5a anaphylatoxins on murine macrophages. J. Exp. Med. 156:67.
8. Canales-Treviño, M.L., Tsutsumi, V., Martínez-Palomo, A. 1990. Role of macrophages and T-lymphocytes: resistance of guinea pigs to amebic liver infection. Arch. Invest. Med. Mex. 21 Suppl 1:81-84.
9. Clark, C.G.1998. Amoebic disease. *Entamoeba dispar*, an organism reborn. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 92(4):361-364.
10. Cooke, J.P., Dzau, V.J. 1997. Nitric oxide synthase: Role in the genesis of vascular disease. Annu. Rev. Med. 48:489-509.
11. Denis, M., Chadee, K. 1989. Cytokine activation of murine macrophages for in vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Infect. Immun. 57: 1750–1756.

12. Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnick, C.C. 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:431-432.
13. Doeing, D. C., Borowicz, J. L. Crockett, E. T. 2003. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. BMC Clin. Pathol 12;3(1):3.
14. Fernandez, H. N., Henson, P. M, Otani, A., and Hugli, T. E. 1978. Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vivo and in vitro. J. Immunol. 120:109.
15. Ghadirian, E., Salimi, A. 1993. *In vivo* effect of recombinant interferon-gamma in combination with LPS on amebicidal activity of murine Kupffer cells. Immunobiology 188:203–219.
16. Guerrant, R.L., Brush, J., Ravdin, J.I., Sullivan, J.A., Mandell, G.L. 1981. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. J. Infect. Dis. 143:83–92.
17. Hanna, R.M., Dahniya, M.H., Badr, S.S., El-Betagy, A., 2000. Percutaneous catheter drainage in drug-resistant amoebic liver abscess. Trop. Med. Int. Health. 5(8):578-81.
18. Haque, R., Mondal, D., Kirkpatrick, B.D., Akther, S., Farr, B.M., Sack, R.B., Petri, W.A. Jr. 2003. Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infections in preschool children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. Am. J. Trop. Med. Hyg. 69(4):398-405.
19. Hernández-Campos, M. E., Campos-Rodríguez, R., Tsutsumi, V., Shibayama, M., García-Latorre, E., Castillo-Henkel, C., Valencia-Hernández I. 2003. Nitric oxide synthase in *Entamoeba histolytica*: its effect on rat aortic rings. Exp. Parasitol. 104(3-4):87-95.
20. Jaeschke, H. 2006. Mechanisms of Liver Injury II. Mechanisms of neutrophil induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. 290: G1083–G1088.

21. Jarillo-Luna, R.A., Campos-Rodríguez, R., Tsutsumi, V. 2002. *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. *Exp. Parasitol.* 101(1):40-56.
22. Joiner, K. A., Brown, E. J., and Frank, M. M., 1984. Complement and bacteria: chemistry and biology in host defense. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 461.
23. Joiner, K. A., Hammer, C. A., Brown, E. J., and Frank, M. M. 1982. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement mediated killing C8 and C9 release C5b67 from the surface of *Salmonella minnesota* S218 because the terminal complex does not insert into the bacterial outer membrane. *J. Exp. Med.* 155:809.
24. Kretschmer, R.R., Collado, M.L., Pacheco, M.G., Salinas, M.C., Lopez-Osuna, M., Lecuona, M., Castro, E.M., Arellano, J. 1985. Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *E. histolytica*. *Parasite. Immunol.* 7: 527–534.
25. Laarman, A.J., Ruyken, M., Malone, C.L., Van Strijp, J.A., Horswill, A.R. 2011. *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *J. Immunol.* 186: 6445–6453.
26. Lee, L.Y., Hook, M., Haviland, D., Wetsel, R.A., Yonter, E.O. 2004. Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J. Infect. Dis.* 190: 571–579.
27. Lin, J.Y., Chadee, K. 1992. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* 148(12):3999-4005.
28. Martínez-Palomo, A. 1987. The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitol. Today.* 3(4):111-118.
29. Martínez-Palomo, A. 1996. Las amibas enemigos invisibles, México, Fondo de cultura económica.
30. Martínez-Palomo, A. “Amibiasis”. 1ª ed., México, Editorial Médica Panamericana, 1989: 206.

31. Mestas, J., Hughes, C. C. 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* 172: 2731–2738.
32. Michel, T., Feron, O. 1997. Nitric oxide synthases: Which, where, how, and why? *J. Clin. Invest.* 100(9): 2146-2152.
33. Montfort, I., Pérez-Tamayo, R., González-Canto, A., García de León, M.C., Olivos, A., Tello, E. 1993. Role of cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* on the cytopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes *in vitro*. *J. Parasitol.* 79(1):98-105.
34. Morán, P., Ximénez, C., Ramírez, H. O., Ramiro, M. 2008. Amibiasis hepática, en Ramiro, M., Lifshitz, A., Halabe, J., Frati, A. (compiladores). *El internista. Medicina interna para internistas*, México, Nieto Editores.
35. Nathan, C. 1992. Nitric-Oxide as a secretory product of mammalian-cells. *FASEB. J.* 6(12): 3051-3064.
36. Nauck, M., Wölfle, D., Katz, N., Jungermann, K. 1981. Modulation of the glucagon-dependent induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase and tyrosine aminotransferase by arterial and venous oxygen concentrations in hepatocyte cultures. *Eur. J. Biochem.* 119: 657-661.
37. Norris, K. A., Bradt, B., Cooper, N. R., and So M. 1991. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J. Immunol.* 147:2240.
38. Olivos-García, A., Nequiz-Avendaño, M., Tello, E., Martínez, R. D., González-Canto, A., López-Vancell, R., García de León, M.C., Montfort, I., Pérez-Tamayo, R. 2004. Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. *Exp. Mol. Pathol.* 77(1):66-71.
39. Olivos-García, A., Saavedra, E., Luis-García, E.R., Nequiz M., Pérez-Tamayo, R. 2012. Stress Response in *Entamoeba histolytica*. In: Requena JM, editor. *Stress Response in Microbiology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 405-427.

40. Pacheco-Yépez J, Campos-Rodríguez R, Shibayama M, Ventura-Juárez J, Serrano-Luna J, Tsutsumi V. 2001. *Entamoeba histolytica*: production of nitric oxide and in situ activity of NADPH diaphorase in amebic liver abscess of hamsters. *Parasitol. Res.* 87(1):49-56.
41. Pearce, E. J., Hall, B. F., Sher, A. 1990. Host-specific evasion of the alternative complement pathway by schistosomes correlates with the presence of a phospholipase C-sensitive surface molecule resembling human decay-accelerating factor. *J. Immunol.* 144:2751.
42. Perez, L. E., Chandrasekar, B., Saldarriaga, O. A., Zhao, W., Arteaga, L. T., Travi, B. L., Melby, P. C. 2006. Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen. *J. Immunol.* 176: 5519–5528.
43. Pérez-Tamayo, R., Montfort, I., Tello, E., Olivos, A. 1992. Ischemia in experimental acute amebic liver abscess in hamsters. *Int. J. Parasitol.* 22(1):125-9.
44. Pinilla, A. E., López, M. C., Viasus, D. 2008. History of the *Entamoeba histolytica* protozoan. *Rev. Méd. Chile*; 136: 118-124.
45. Ramiro, M., Morán, P., Ximénez, C., y Navarrete, R., 2008. Amibiasis intestinal, en Ramiro, M., A. Lifshitz, J., Halabe y Frati, A. (compiladores), *El internista. Medicina interna para internistas*, México, Nieto Editores.
46. Rigotherier, M.C., Khun, H., Tavares, P., Cardona, A., Huerre, M., Guillén, N. 2002. Fate of *Entamoeba histolytica* during establishment of amoebic liver abscess analyzed by quantitative radioimaging and histology. *Infect. Immun.* 70(6): 3208-3215.
47. Reed, S. L., Ember, J.A., Herdman, D.S., DiScipio R.G., Hugli T.E., Gigli I. 1995. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J. Immunol.* 155(1):266-74.
48. Reed, S. L., Curd, J. G., Gigli, I., Gillin, F. D., Braude A. I. 1986. Activation of complement by pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.* 136:2265.

49. Reed, S.L., Gigli, I. 1990. Lysis of Complement-Sensitive *Entamoeba histolytica* by Activated Terminal Complement Components - Initiation of Complement Activation by an Extracellular Neutral Cysteine Proteinase. J. Clin. Invest. 86(6):1815-22.
50. Reed, S.L., Keene, W.E., McKerrow, J.H., Gigli, I. 1989. Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. J. Immunol. 143: 189–195.
51. Reed, S. L., Sargeant, P. G., Braude, A. I. 1983. Resistance to lysis by human serum of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77:248.
52. Rooijackers, S. H., Ruyken, M., Roos, A., Daha, M.R., Presanis, J.S. 2005. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. Nat. Immunol. 6: 920–927.
53. Rojas-Espinosa. Inmunología de memoria. 2006. 3a ed Panamericana capitulo 9. El sistema del complemento.
54. Salata, R.A., Ahmed, P., Ravdin, J.I. 1989. Chemoattractant activity of *Entamoeba histolytica* for human polymorphonuclear neutrophils. J. Parasitol. 75: 644–646.
55. Seydel, K.B., Smith, S.J., Stanley, S.L. Jr. 2000. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. Infect. Immun. 68(1):400-402.
56. Sharma, S., Jabeen, T., Singh, R.K., Bredhorst, R., Vogel, C.W., Betzel, C., Singh, T.P. 2001. Structural studies on the cobra venom factor: isolation, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis. Acta Crystallogr D. Biol. Crystallogr. 57:596-598.
57. Swe, P.M., Fischer, K.A. 2014. Scabies Mite Serpin Interferes with complement-mediated neutrophil functions and promotes Staphylococcal growth. PLoS Negl. Trop. Dis. 19;8(6): 2928.
58. Tack, B. F., Janatova, J., Thomas, M. L. Harrison, R. A. and Hammer, C. H. 1981. The third, fourth, and fifth components of human complement: isolation and biochemical properties. Methods Enzymol. 80:64.

59. Tannich, E. 1998. Amoebic disease. *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*: comparison of molecules considered important for host tissue destruction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92(6):593-6.
60. Thorburn, A. L. 1971. Fritz Richard Schaudinn, 1871-1906: protozoologist of syphilis. *Br. J. Vener. Dis.* 47(6):459-61.
61. Tsutsumi, V., Martinez-Palomo, A. 1988. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *Am. J. Pathol.* 130(1):112-9.
62. Tsutsumi, V., Shibayama, M. 2006. Experimental amebiasis: A selected review of some *in vivo* models. *Arch. Med. Res.* 37(2):210-20.
63. Tsutsumi, V., Mena-Lopez, R., Anaya-Velazquez, F., Martinez-Palomo, A. 1984. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am. J. Pathol.* 117(1):81-91.
64. Velázquez, C., Shibayama-Salas, M., Aguirre-García, J., Tsutsumi, V., Calderón, J. 1998. Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasite Immunol.* 20(6):255-62.
65. Winterbourn, C.C., Kettle, A.J. 2013. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal* 18: 642-660.
66. Ximénez, C., Morán, P., Rojas, L., Valadez, A., Gómez, A. 2009. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infect. Genet. Evol.* 9(6):1023-32.