



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL COMPUESTO ALFA SOBRE *Entamoeba histolytica* Y ANÁLISIS DE SU EFECTO SOBRE LA ACTINA DEL PARÁSITO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CORIA PAREDES DIEGO MAURIZIO

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LILIÁN YÉPEZ MULIA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

MÉXICO, CD. MX., OCTUBRE, 2017



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.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 03 de abril de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CORIA PAREDES DIEGO MAURIZIO** con número de cuenta **300147935**, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL COMPUESTO ALFA SOBRE *Entamoeba histolytica* Y ANÁLISIS DE SU EFECTO SOBRE LA ACTINA DEL PARÁSITO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LILIAN YÉPEZ MULIA**:

Presidente: DR. ROGELIO AGUILAR AGUILAR
Vocal: DR. HORACIO REYES VIVAS
Secretario: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
Suplente: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
Suplente: DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 21 de junio de 2017



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, por haberme permitido acceder a una educación de calidad. Agradezco cada segundo que he pasado en sus aulas adquiriendo conocimientos y amistades valiosas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado la beca CVU: 629181 para la realización de mis estudios de maestría.

A los miembros del comité tutor: al Dr. Javier Ambrosio Hernández y al Dr. Julio César Carrero Sánchez, por su paciencia y por todas las aportaciones hechas que contribuyeron a darle forma a este trabajo. Muchas gracias por haberme exigido por que con ello me hicieron mejorar.

Agradecimientos a título personal

Al Instituto Mexicano del Seguro Social, lugar donde realicé este proyecto, por haberme otorgado el apoyo FIS/IMSS/PROT/G15/1473 para la conclusión de éste.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia, quien fue la asesora principal de este trabajo, por su paciencia, conocimiento, apoyo y por el tiempo que dedicó a mi formación profesional. Gracias por todo Dra. Lilián.

A los Doctores Rogelio Aguilar Aguilar, Horacio Reyes Vivas y Gladis Fragoso González, por el valioso tiempo que proporcionaron enriqueciendo con sus observaciones y conocimientos el presente trabajo.

A la Biól. Amparo Tapia, por el mantenimiento de los cultivos de *E. histolytica*.

A la Dra. Elizabeth Barbosa de la Escuela Superior de Medicina del IPN, por proporcionarnos los cultivos de parásitos siempre que fueron requeridos.

A mis compañeros del laboratorio, en especial a Paty y a Luz por todo el apoyo, por los consejos y por las palabras de aliento, por hacerme sentir mejor cuando creía que todo iba mal. Muchas gracias!

A mis excompañeros del INP: Aaron, Bere y Laura Soto, por ser cada uno de ustedes un gran ejemplo de superación.

A mis amigos y compañeros de la Facultad de Ciencias, Yoselin, Eréndira, Geras y a toda la banda de las canchas, por los buenos momentos que hemos pasado juntos, por el apoyo y por tantas risas y experiencias.

Dedicatorias.

Con mucho amor, a mi madre y a mi abuela, por el esfuerzo que han realizado para que mi camino siempre fuera más fácil. Muchas gracias por todo.

A mis tíos y tías, especialmente a mi tío Enrique, quien cuidó de mí y me acepto como si fuese su hijo.

A mis hermanitos: Rodrigo, Nico, Vale, Tyari, Santiago y Eli. Espero que esto les motive para conseguir todo lo que se propongan en sus vidas y que éstas estén llenas de amor, paz y mucha ciencia.

A mi abuelo Simón Paredes, por que siempre confió en mí, por compartírnos su hogar y por que sé que se sentirá orgulloso desde donde esté.

A Camilo, Ikkí, Pechan y a Odiseo. Espero que hayan sido muy felices viviendo con nosotros, nos regalaron incontables alegrías y a pesar de que se fueron como un suspiro, su recuerdo aún vive plasmado en todos los rincones de la casa. Hasta siempre.

*La experimentación es el método menos arrogante
para obtener conocimiento. El investigador hace,
humíldemente, una pregunta a la naturaleza*
Isaac Asimov (1920-1992).

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE CUADROS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Amibiasis	3
1.2 <i>Entamoeba histolytica</i>	3
1.2.1 Clasificación taxonómica	4
1.2.2 Morfología	5
1.2.3 Trofozoíto	5
1.2.4 Quiste	7
1.2.5 Ciclo de vida	8
1.2.6 Formas clínicas	10
1.2.7 Epidemiología	12
1.2.8 Patogenia	15
1.3 Citoesqueleto de <i>Entamoeba histolytica</i>	18
1.4 Regulación del citoesqueleto de actina de <i>Entamoeba histolytica</i>	23
1.5 Fagocitosis en <i>Entamoeba histolytica</i>	24
1.6 Tratamiento de la amibiasis	26
1.7 Mecanismo de acción del MTZ	28
1.7.1 Efectos secundarios del MTZ	29
1.7.2 Teratogenicidad y carcinogenicidad del MTZ	30
1.7.3 Sensibilidad al MTZ por diferentes aislados de <i>E. histolytica</i>	30
1.7.4 Mecanismos de resistencia al MTZ en <i>E. histolytica</i>	31
1.8 Desarrollo de nuevos derivados bencimidazólicos con actividad antiparasitaria	32
1.8.1 Análisis por microscopia electrónica de barrido (MEB) de los cambios inducidos por Alfa en adultos de <i>F. hepatica</i>	34
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVO GENERAL	35
4.1 Objetivos particulares	35
5. METODOLOGÍA	36
5.1 Cultivo axénico de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	36
5.2 Determinación de la actividad amebicida de Alfa	37
5.3 Obtención de extracto soluble (ES) de trofozoítos tratados	

y no tratados con compuesto Alfa	
5.4 Cuantificación de los extractos solubles de los trofozoítos	38
5.5 Electroforésis en geles de poliacrilamida	39
5.6 Inmunoelctrotransferencia de los ES de parásitos tratados o no tratados con Alfa	40
5.7 Inmunoelctrotransferencia 2D de ES de parásitos tratados y no tratados con Alfa	41
5.8 Análisis proteómico 2D del ES de trofozoítos tratados y no tratados con Alfa	41
5.9 Análisis comparativo de los mapas proteómicos con el programa PDQuest	42
5.10 Ensayo de eritrofagocitosis	43
6. RESULTADOS	44
6.1 Actividad amebicida del compuesto Alfa y MTZ	44
6.2 Obtención de ES de parásitos tratados y no tratados con Alfa y reconocimiento de actina por C4	45
6.3 Análisis electroforético de los extractos obtenidos de parásitos control y tratados con Alfa y reconocimiento de actina por el anticuerpo C4	45
6.4 Análisis 2D del efecto de Alfa sobre isoformas de actina de <i>E. histolytica</i>	47
6.5 Análisis proteómico 2D de las proteínas contenidas en los ES de trofozoítos con o sin tratamiento	48
6.6 Análisis del efecto de Alfa en la eritrofagocitosis del parásito	53
7. DISCUSIÓN	56
8. CONCLUSIONES	62
9. PERSPECTIVAS	62
10. LITERATURA CITADA	63
11. ANEXO	72
11.1 Medio de cultivo TYI-S-33 para <i>Entamoeba histolytica</i>	72
11.2 Soluciones	72
11.3 Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot	72
11.3 Soluciones para electroforesis en doble dimensión (2D-PAGE)	73
11.4 Soluciones para eritrofagocitosis	74

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. ABP's que participan en la dinámica del citoesqueleto de actina de <i>E. histolytica</i>	21
Cuadro 2. Características de los fármacos empleados el tratamiento de la amibiasis intestinal, extraintestinal y asintomática	26
Cuadro 3. Curva estándar de alúmina sérica bovina	38
Cuadro 4. Actividad amebicida del compuesto Alfa y MTZ	45
Cuadro 5. Concentración de proteínas de las muestras	45
Cuadro 6. Lista de proteínas identificadas por comparación de mapas proteómicos	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas del trofozoíto de <i>E. histolytica</i> .	6
Figura 2. Quiste de <i>E. histolytica</i>	7
Figura 3. Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i>	9
Figura 4. Características patológicas de amibiasis intestinal y extraintestinal	12
Figura 5. Casos de amibiasis intestinal reportados por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica	15
Figura 6. Patogenia de la amibiasis invasiva	17
Figura 7. Estructura de un monómero y un microfilamento de actina	20
Figura 8. Estructuras de actina formadas durante la interacción de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> con FN	23
Figura 9. Estructura básica del núcleo benzimidazólico	32
Figura 10. Diseño del compuesto Alfa a partir del TCBZ por reemplazo bioisostérico	33
Figura 11. Micrografías de barrido de adultos de <i>F. hepatica</i> extraídos de borregos tratados con Alfa a 10 mg/Kg a las 6, 12 y 24 h	34
Figura 12. Perfiles electroforéticos de los ES de trofozoítos tratados y no tratados con el compuesto Alfa	46
Figura 13. Reconocimiento de actina en ES de trofozoítos control, tratados con Alfa y control de actina de músculo de conejo	47
Figura 14. Reconocimiento de isoactinas en ES control y Alfa por anticuerpo C4	48
Figura 15. Proteomas de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> tratados y no tratados con compuesto Alfa a 1 µg/mL	50
Figura 16. Comparación de los proteomas de <i>E. histolytica</i>	51
Figura 17. Imágenes representativas de los ensayos de eritrofagocitosis	54
Figura 18. Capacidad fagocítica	56

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ABP's	Proteínas de unión a actina
ADP	Adenosín difosfato
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AHA	Absceso hepático amibiano
ASB	Albúmina sérica bovina
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BCM	Bencimidazoles
CD	Citocalasina-D
CHAPS	(3-((3-colamidopropil) dimetilamonio)-1-propanosulfato
CRD	Dominio de reconocimiento a carbohidratos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
E-64	N-(trans-Epoxisuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida
EhGPCR	Receptor acoplado a proteínaG de <i>Entamoeba histolytica</i>
EhROM1	Proteasa romboide 1 de <i>Entamoeba histolytica</i>
ES	Extracto soluble
FN	Fibronectina
FS	Fosfatidilserina
Gal	Galactosa
Gal/NAc	N-acetil-D-galactosamina
GEF's	Factor intercambiador de nucleótido de guanina
GDPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HGL	Subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc
IGL	Subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc
KERP1	Proteína rica en serina y ácido glutámico
kDa	Kilodaltones
LC/MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LGL	Subunidad ligera de la lectina Gal/GalNAc
LPS	Lipopolisacáridos
MEB	Microscopia electrónica de barrido
MEC	Matriz extracelular
MDCK	Células epiteliales de riñón canino Madin-Darby
MTZ	Metronidazol
MUC-2	Mucina 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PC's	Proteasas de cisteína
PFOR	Piruvato ferredoxín oxidorreductasa
pI	Punto isoeléctrico
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
SREHP	Proteína rica en serina de <i>Entamoeba histolytica</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
TCBZ	Triclabendazol
TLCK	Tosil-L-lisina-clorometil-cetona
TMK	Cinasas transmembranales
TPCK	Tosil-L-fenilalanina-clorometil-cetona
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1.3-diol

RESUMEN

Entamoeba histolytica causa amibiasis, una infección que mata a 100,000 individuos al año. Este parásito, ocasionalmente invade la mucosa intestinal, degradando la matriz extracelular y diseminándose a órganos extraintestinales. El citoesqueleto de actina del parásito participa activamente en la patogénesis de la amibiasis así como en su comportamiento invasivo. El metronidazol (MTZ) es el medicamento de elección, sin embargo, presenta múltiples efectos secundarios y existe la posibilidad del surgimiento de resistencia. Nuestro grupo de investigación demostró que el derivado bencimidazólico **Alfa**, afecta estructuras ricas en actina del trematodo *Fasciola hepatica*. Considerando que la actina es importante en la patogenia de la amibiasis, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad de **Alfa** sobre el trofozoíto de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS y evaluar su efecto sobre la actina del parásito. Para esto, se incubó al parásito con diferentes concentraciones de **Alfa** por 48h a 37 °C, se contaron los parásitos vivos en cada concentración y por análisis Probit se calculó la concentración del compuesto que inhibe el crecimiento del 50% de parásitos (CI_{50}), se incluyó como control positivo al MTZ. Mediante Western blot 1D y 2D de extractos solubles (ES) de trofozoítos no tratados y tratados con **Alfa** (1ug/mL) y utilizando el anticuerpo C4 se analizó el efecto sobre la actina del parásito. El mecanismo de acción de **Alfa**, se analizó mediante el análisis proteómico de parásitos tratados con el compuesto, con respecto al control. Además, se evaluó la eritrofagocitosis de parásitos tratados con diferentes concentraciones de **Alfa** y a diferentes tiempos. Como inhibidor de la fagocitosis se incluyó a la Citocalasina-D. Los resultados mostraron que **Alfa** tuvo una actividad amebicida 1.5 veces más potente que el MTZ ($CI_{50}=0.023$ vs 0.036 de MTZ). Por Western blot 1D se observó el reconocimiento por C4 de una banda de 45 kDa. El análisis densitométrico empleando el programa Quantity One mostró que el tratamiento con **Alfa** indujo un incremento no significativo en los niveles de actina respecto al control. En cuanto al Western blot 2D, los **ES** fueron separados por su pI en tiras de gradiente de pH de 4 a 7 y, posteriormente, por su peso molecular y los geles 2D se transfirieron a PVDF. El anticuerpo C4 detectó 4 isoformas de actina, y mediante el Programa PDQuest se determinó el pI de las isoformas entre 5.6 y 6.0, registrando un aumento no significativo en todas ellas respecto al control. El análisis de los geles 2D, mediante el programa PDQuest, detectó en los **ES** tratados la expresión diferencial de nueve proteínas con respecto al control, seis de ellas mostraron un incremento en su expresión y tres un decremento; la identidad de las proteínas con expresión diferencial se está actualmente realizando mediante LC/MS/MS. En relación a la eritrofagocitosis, no se observaron cambios significativos respecto al control a los 10, 20 y 30 min de interacción de los trofozoítos con eritrocitos humanos. Estos resultados sugieren que **Alfa** no afecta significativamente a la actina, ni a la eritrofagocitosis del parásito.

ABSTRACT

Entamoeba histolytica causes amoebiasis, an infection that kills 100,000 individuals each year. This parasite invades the intestinal mucosa through the degradation of the extracellular matrix, allowing its dissemination to extraintestinal organs. The actin cytoskeleton actively participates in the pathogenesis of amoebiasis as well as in its invasive behavior. Metronidazole (MTZ) is the drug of choice for the treatment of amoebiasis; however, it causes severe secondary effects and there is the possibility of the emergence of drug resistance. Our research group synthesized the benzimidazole derivative, **Alpha**, that in a previous study was demonstrated to affect the actin of the trematode *Fasciola hepatica*. Considering that actin is important in the pathogenesis of amoebiasis, the aim of the present study was to evaluate the amoebicide effect of **Alpha** and its effect on parasite actin. For this, trophozoites of *E. histolytica* strain HM1:IMSS were incubated with different concentrations of **Alpha** for 48 h at 37°C, live parasites were counted and the concentration that inhibits 50% the parasite growth (CI₅₀) was calculated by Probit analysis. MTZ was included as positive control. To analyze the effect of **Alpha** on the parasite actin, soluble extracts (ES) of parasites untreated or treated with **Alpha** (1ug/mL) were analyzed by 1D and 2D Western blot, using the monoclonal antibody C4. In order to know the mechanism of action of **Alpha**, a proteomic analysis of treated parasites was performed. In addition, the effect of **Alpha** on phagocytosis of human erythrocytes, at different concentrations and times was also evaluated. In these assays, Cytochalasin-D was included as phagocytosis inhibitor. Data obtained showed that **Alpha** was 1.5 times more active than MTZ (CI₅₀ values of 0.023 ug/mL and 0.036 ug/mL, respectively). By 1D Western blot analysis, C4 recognized a band of 45kDa. Densitometric analysis using QuantityOne software showed that treatment with Alpha induced a non-significant increase in actin levels in comparison to control samples. 2D Western blot analysis of SE from non-treated and treated parasites using C4 antibody detected 4 actin isoforms.. Densitometric analysis by PDQuest software showed a non-significative increase of actin isoforms in treated parasites and their calculated pI were between 5.6 and 6.0. The proteomic analysis of SE of treated parasites revealed the differential expression of nine spots in comparison to control, from these, six spots showed an increased expression and three had a decreased in their expression. The identification of the proteins with differential expression by LC/MS/MS is currently performed. In relation to the erythrophagocytosis assays, no significative changes were induced by **Alpha** at the different concentrations and times evaluated. It can be concluded that **Alpha** has not effect on actin cytoskeleton and erythrophagocytosis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Amibiasis

La amibiasis fue definida en 1997 por la OMS como la infección del tracto gastrointestinal humano por el parásito protozooario *Entamoeba histolytica*. (WHO, 1997). Este padecimiento afecta al 10% de la población mundial, presentando cuadros clínicos diversos tanto intestinales como extraintestinales. Su prevalencia es más alta en países tropicales subdesarrollados, aunque también se presenta en países industrializados y en urbes del círculo polar ártico (Olivos-García *et al.*, 2011).

1.2 *Entamoeba histolytica*

Los protozoarios del género *Entamoeba* viven como comensales o parásitos de la cavidad oral y el tubo digestivo de una gran variedad de metazoos, entre los que se incluye al humano (Brusca *et al.*, 2016). Dentro de las especies parásitas *E. histolytica* destaca por su impacto en la salud humana matando a unas 100,000 personas anualmente, lo que coloca a este microorganismo como la tercera causa de mortalidad por enfermedades parasitarias en el mundo (Walsh, 1986). El nombre de éste patógeno se deriva del griego *dys*: “alteración”, y *enteron*: intestino, lo que hace alusión a la potente actividad citolítica hacia las células de su hospedero, destruyendo prácticamente cualquier tejido y órgano del cuerpo, desde recubrimientos epiteliales, hasta tejidos duros como cartílago y hueso (Haque *et al.*, 2003;)

1.2.1 Clasificación taxonómica

Una de las clasificaciones taxonómicas más aceptadas en la actualidad para *E. histolytica* es la siguiente:

Reino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Sarcodina

Clase: Lobosea

Orden: Amoebida

Familia: Entamoebidae

Género: *Entamoeba*

Especie: *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903)

Este microorganismo se encuentra clasificado dentro del Phylum Sarcomastigophora que agrupa a organismos que se desplazan por medio de proyecciones citoplasmáticas denominadas pseudópodos y que se reproducen mediante fisión binaria longitudinal. Contiene algunas amibas desnudas (es decir, sin tecas) y carentes de flagelos ubicadas en la clase Lobosea. Por su parte, el orden Amoebida contiene trofozoítos uninucleados y formas quísticas uni o plurinucleadas, con algunas especies parásitas englobadas dentro de la familia Entamoebidae. Ésta última contiene al género *Entamoeba*, cuyos representantes se caracterizan por poseer un núcleo vesicular (con poca cromatina) que contiene un pequeño cariosoma central rodeado por un complejo de nucleoproteínas que se localiza en la lámina interna de la membrana nuclear y que recibe el nombre de cromatina periférica (Roberts y Janovy 2007).

1.2.2 Morfología

E. histolytica presenta dos estadios principales durante su ciclo de vida: el trofozoíto, responsable de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, y el quiste, estructura de resistencia inmóvil que constituye además la forma infectiva del parásito (Sepúlveda y Martínez-Palomo, 1984).

1.2.3 Trofozoíto

El trofozoíto es la forma vegetativa móvil, proliferativa e invasiva que habita en la mucosa y la luz del colon y el ciego del intestino grueso, donde se divide mediante fisión binaria longitudinal y se alimenta de moco, eritrocitos, bacterias, enterocitos y detritos intestinales. Es pleomórfico, por lo que sus dimensiones varían entre 15 y 60 μm (Bogitsh, 1998). Su examen bajo el microscopio de luz revela una célula cuyo citoplasma se encuentra dividido en dos zonas perfectamente distinguibles: una región externa hialina y retráctil denominada ectoplasma, y una región interna llamada endoplasma (Fig 1c). En el ectoplasma se realizan funciones digestivas, como la incorporación de líquidos por pinocitosis, y de elementos sólidos por fagocitosis. Por ello, en esa zona se encuentran concentradas las proteínas del citoesqueleto actina y miosina que contribuyen a formar los pseudópodos digitiformes responsables de que se lleve a cabo la fagocitosis y el movimiento progresivo (algunas veces explosivo) del parásito (Martínez-Palomo, 1993).

Por su parte, el endoplasma contiene una gran cantidad de inclusiones, vacuolas y todos los organelos amibianos, lo que le da a esta zona del

citoplasma un aspecto granulado (Fig. 1)(Martínez-Palomo, 1988). Contiene un núcleo esférico de 5 a 7 μm de diámetro en cuyo interior hay cromosomas lineales con ploidía variable. Su división se realiza sin disgregación de la membrana nuclear, por lo que la condensación de los cromosomas durante la división celular no es evidente (Edman *et al.*,1990).

Mediante microscopía electrónica y confocal se ha observado que *E. histolytica* carece de mitocondrias, pero presenta un reducto mitocondrial llamado mitosoma. Posee un retículo endoplásmico continuo, con forma de tubos pequeños rellenos de material electrodens. El aparato de Golgi también está presente y su morfología se asemeja a un conjunto de sacos aplanados con luz reducida (Chávez-Munguía *et al.*, 2000; Texiera y Hustos, 2008). El endoplasma consta también de ribosomas, lisosomas y una gran cantidad de partículas de glucógeno, por lo que *E. histolytica* genera ATP mediante glucólisis y fermentación de los carbohidratos obtenidos del ambiente anaeróbico del colon (Saavedra *et al.*, 2005).

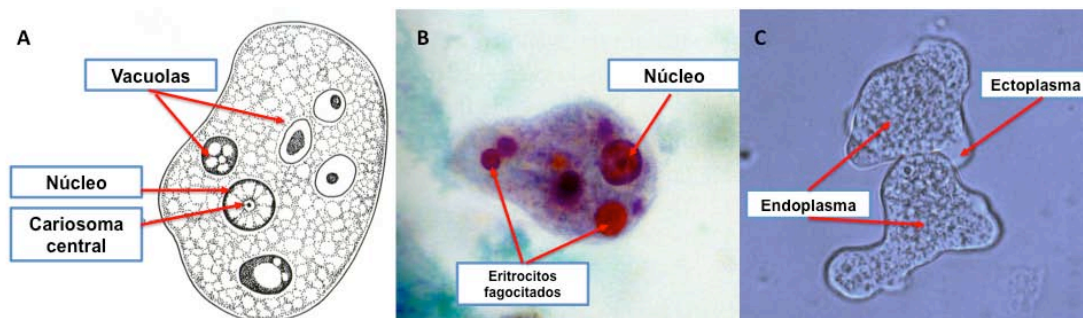


Figura 1. Características morfológicas del trofozoíto de *E. histolytica*. **A)** representación esquemática de un trofozoíto donde se señalan sus partes principales. **B)** trofozoíto teñido con colorante de Gómeri en el cual se aprecian el núcleo y eritrocitos fagocitados en el citoplasma. **C)** Trofozoíto en campo claro donde se aprecian las dos zonas citoplasmáticas principales: el ectoplasma hialino y el endoplasma con aspecto de “vidrio molido”. **A)** tomada de Roberts y Janovy, 2007, **B)** tomada de Ash y Orihel, 2007, **C)** por el autor.

1.2.4 Quiste

El quiste es el estadio infeccioso responsable de la transmisión de la enfermedad. Son estructuras unicelulares esféricas u ovoides con un tamaño de 10 a 20 μm de diámetro con una cubierta quística constituida principalmente por el polisacárido quitina y glicoproteínas, que le confieren gran resistencia a las condiciones adversas que prevalecen fuera del hospedero y al contacto con los jugos gástricos (Aguilar-Díaz *et al.*, 2011). Es resistente por semanas si la temperatura ambiente es menor a 34 °C y es muy resistente a las concentraciones de cloro que se emplean en el agua potable (Radvin, 1988). Son inmóviles, pueden ser uni o binucleados cuando son inmaduros (prequistes) y tetranucleados cuando son maduros e infecciosos (Eichinger, 2001). En los prequistes se observan con frecuencia cuerpos cromatoides alargados con extremos redondeados constituidos de agregados ribosomales, y abundantes vacuolas que constituyen reservas de glucógeno, el cual se va consumiendo conforme el quiste madura. Este proceso de maduración se realiza mediante división esquizogónica, en la cual, se llevan a cabo varias rondas de división nuclear sin división citoplasmática, lo que explica su naturaleza multinucleada (Fig. 2)

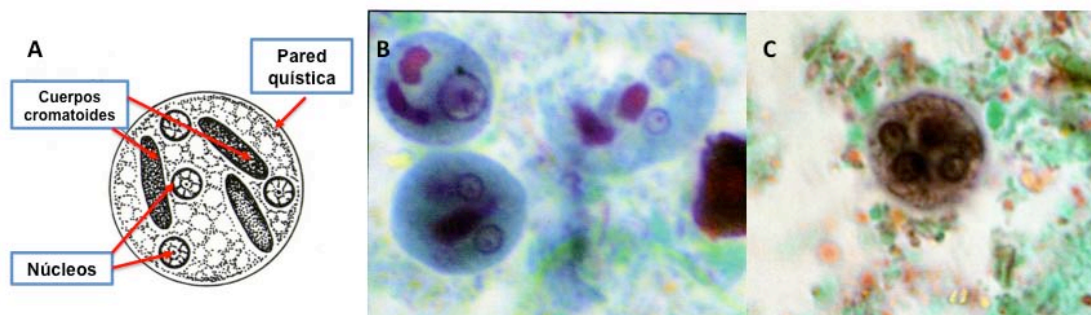


Figura 2. Quiste de *E. histolytica*. **A)** detalles morfológicos de un quiste maduro tetranucleado. **B)** Quistes en diferentes estados de maduración. Se observan quistes uni y binucleados teñidos con colorante de Gomori. **C)** Quiste maduro tetranucleado teñido con colorante de Gomori. **A** tomada de Roberts y Janovy, 2007. **B** y **C** tomadas de Ash y Orihel, 2007

1.2.5 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *E. histolytica* es monoxénico. Las principales fuentes de infección son el agua y alimentos contaminados con quistes tetranucleados del parásito (Fig 3a)(Stanley, 2003). Cuando éstos quistes son ingeridos, alcanzan el estómago donde el pH ácido y las enzimas hidrolíticas del jugo gástrico reblandecen la pared de quitina. Cuando los quistes alcanzan el duodeno, comienzan con el desenquistamiento en el íleon (Fig. 3b). De cada quiste emerge un trofozoíto metacíclico tetranucleado que experimenta una rápida división nuclear y citoplásmica, originando ocho trofozoítos uninucleados pequeños (8µm) denominados amébulas metaquísticas. Éstas amébulas migran al colon ascendente, donde se alimentan y crecen hasta alcanzar el tamaño de un trofozoíto típico (Fig. 3c)(Bruckner, 1992). En éste punto, el ciclo de vida puede seguir dos rutas: la intestinal y la extraintestinal. El resultado de la infección lo determinarán varios factores atribuibles al hospedero (estado nutricional, microbiota, factores de histocompatibilidad) y a la cepa de *E. histolytica* de que se trate (Gilchrist *et al.*, 2015; Marie y Petri, 2014). En la mayoría de las infecciones los trofozoítos se limitan a la fase luminal, en la cual, persisten en el tracto gastrointestinal desplazándose activamente mientras se alimentan de moco, detritos celulares, bacterias y enterocitos, lo que resultará en una infección asintomática (Fig 3d)(McCoy *et al.*, 1994; Stanley, 2003). Cuando las amibas alcanzan el colon descendente, las condiciones ambientales se vuelven más hostiles. El pH se incrementa, el medio se deshidrata y aparecen células efectoras de la respuesta inmunológica del hospedero. Para protegerse, los trofozoítos comienzan el proceso de diferenciación a quiste, activando mecanismos moleculares poco

conocidos hasta el momento (Aguilar-Díaz *et al.*, 2010). El ciclo de vida se completa cuando los prequistes maduran y son excretados al medio en las heces, contaminando alimentos y agua para consumo humano (Fig.3e) (Radvin, 1988).

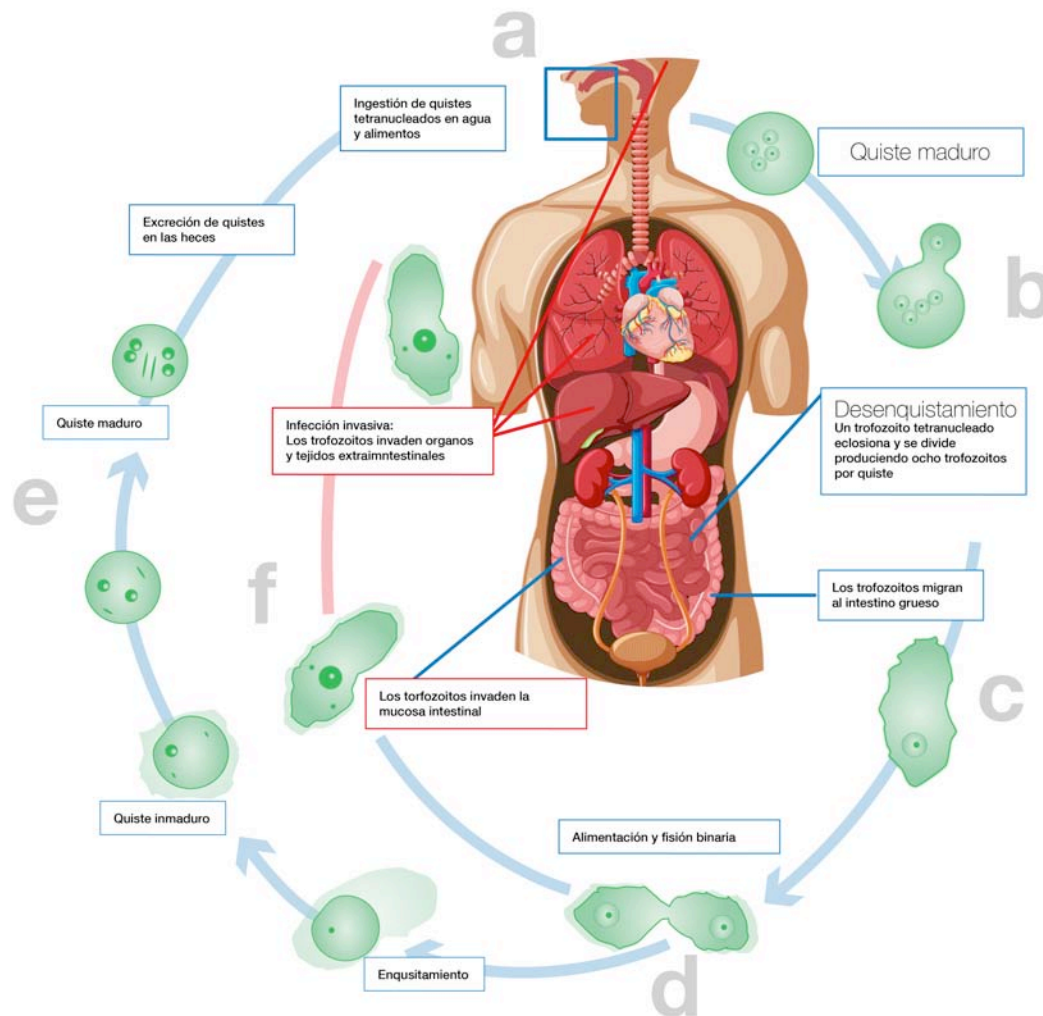


Figura 3. Ciclo biológico de *E. histolytica*. **a)** Los quistes son ingeridos en agua y alimentos contaminados. **b)** Los quistes son activados y ocurre el desenquistamiento **c)** Los trofozoitos crecen y migran al intestino grueso. **d)** Los trofozoitos proliferan y se alimentan en el intestino. **e)** Ocurre el proceso de enquistamiento y la maduración de los quistes hasta que éstos son excretados junto con las heces del hospedero. **f)** Los trofozoitos invaden la mucosa intestinal y migran a órganos extraintestinales como hígado, pulmón y cerebro. Figura hecha por el autor.

En algunos casos, la adhesión de los trofozoitos a la mucosa colonica provocará la lisis del epitelio intestinal mediada por el contacto del parásito con los enterocitos, iniciando la invasión tisular. Esto provoca los síntomas de

disentería. En este punto, los trofozoítos pueden alcanzar el peritoneo, o bien, los vasos sanguíneos, diseminándose a diversos tejidos y órganos, siendo el más frecuente el hígado, causando AHA (Fig 3f) (Stanley, 2003; Haque *et al*, 2003).

1.2.6 Formas clínicas

Desde el punto de vista clínico, la amibiasis intestinal se clasifica en cuatro tipos: disentería amibiana, colitis fulminante, ameboma y apendicitis amibiana; mientras que la amibiasis extraintestinal se clasifica de acuerdo al órgano afectado: hepática (AHA), pulmonar, cerebral, etc (Alcántara *et al* 2008).

La disentería amibiana se caracteriza por dolor cólico moderado y evacuaciones diarreicas escasas (dos a cuatro evacuaciones al día), con abundante material líquido y coágulos mucosanguinolentos. Por otra parte, en la colitis fulminante se presentan veinte o más evacuaciones al día formadas casi exclusivamente por sangre. Hay dolor al evacuar, tenesmo, dolor abdominal que se exagera con la palpación, deshidratación, astenia, mareos y fiebre (Tay-Zavala *et al.*, 2010). El ameboma es una masa pseudotumoral formada cuando el organismo reacciona de manera exagerada contra el parásito y forma tejido de granulación que obstruye parcialmente el colon. Se presenta acompañado de diarrea mucosanguinolenta, dolor abdominal y una masa palpable. Por último, en la apendicitis amibiana el parásito produce lesiones necróticas que conducen a

la formación de úlceras. Lo anterior genera una respuesta inflamatoria de grado y consecuencias variables (Becerril, 2011)(Fig 4-a,b).

Como ya se ha mencionado, la amibiasis extraintestinal se produce cuando los trofozoítos se desplazan hacia otros órganos, siendo el hígado el más frecuentemente afectado. El AHA se produce por la llegada de grandes cantidades de amibas al hígado a través de ulceraciones intestinales, diseminándose por vía mesentérica al sistema portal, estableciéndose en cualquier parte del hígado aunque es más frecuente la infestación del lóbulo derecho. (Becerril, 2011; Radvin, 2000). Cuando los trofozoítos llegan al parénquima hepático, comienzan la lisis de neutrófilos. Los mediadores liberados provocan la lisis de los hepatocitos, extendiendo el daño a las células hepáticas distantes, lo que origina pequeñas lesiones redondas u ovals que al fusionarse forman una cavidad, con dimensiones que van de los 5-15 cm de diámetro (Fig 4-c). En el interior de éstos abscesos es posible encontrar hepatocitos muertos, eritrocitos y células de la respuesta inmune inflamatoria mezcladas con tejido conjuntivo, mientras que los trofozoítos se encuentran en los bordes del absceso, entre el tejido hepático sano y el necrosado (Rodríguez-Perez 2013; Alcántara, 2008). Los pacientes presentan hepatomegalia y dolor agudo intenso en la región hepática y el hipocóndrio derecho, el cual irradia hacia el hombro y escápula del mismo lado; también hay tos seca y dolor pleural, anorexia, astenia y fiebre. Si no es diagnosticado y tratado a tiempo con fármacos eficientes, el absceso hepático se complica debido a que los parásitos pueden alcanzar la cavidad peritoneal, el estómago y los intestinos, pudiendo incluso invadir la piel. Otra

complicación que puede presentarse es una nueva diseminación hematógica hacia pulmón, vaso, corazón y cerebro, con consecuencias casi siempre fatales (Tay-Zavala *et al.*, 2010).

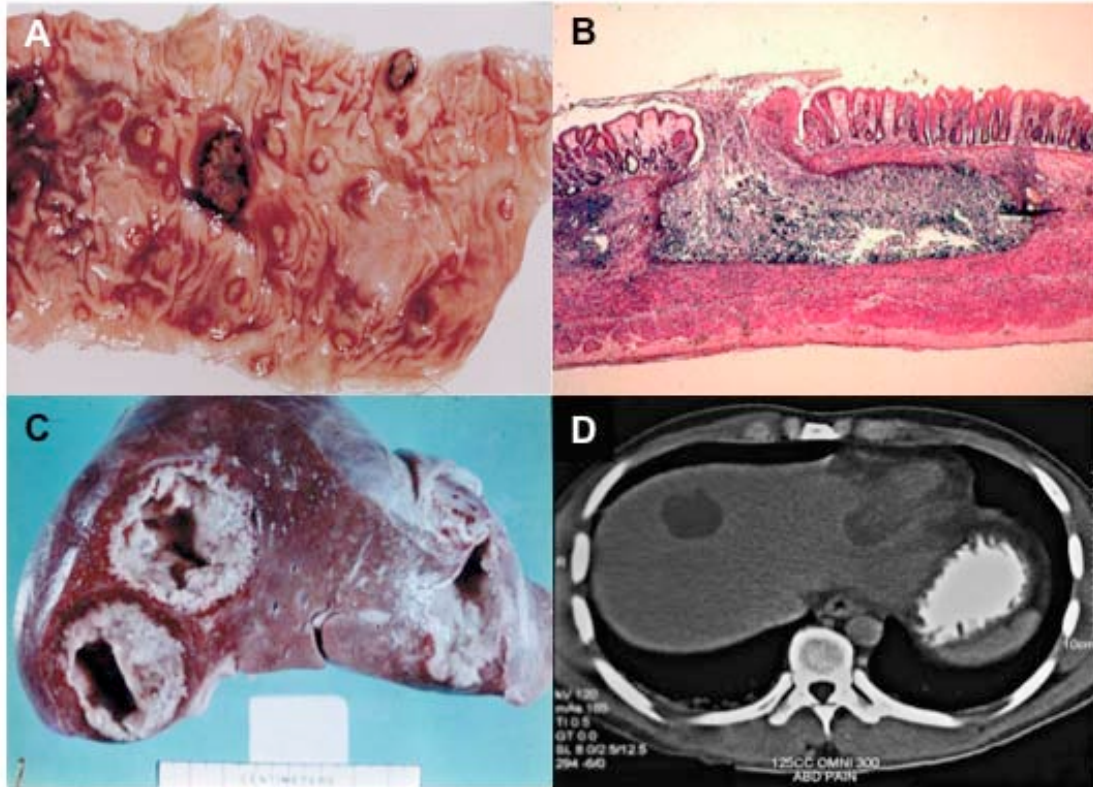


Figura 4. Características patológicas de la amibiasis intestinal (A-B) y extraintestinal (C-D). **A)**, fragmento de intestino extraído de un paciente que presentaba colitis fulminante donde se observan lesiones nodulares con centro necrótico. **B)**, úlcera intestinal con forma de “cuello de botella” característica de las lesiones producidas por *E. histolytica* en la mucosa intestinal. **C)**, fotografía donde se muestran dos abscesos en el lóbulo derecho y uno más en lóbulo izquierdo del hígado de un paciente con AHA. **D)**, tomografía axial computarizada donde se observan abscesos en ambos lóbulos hepáticos. **A**, tomada de Espinoza-Castellano, 2000; **B**, tomada de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibiasis.html>; **C** y **D**, tomadas de Haque *et al.*, 2003.

1.2.7 Epidemiología

Hace 20 años la OMS reportó que la amibiasis tenía una prevalencia anual de 500 millones de casos, una morbilidad de 50 millones y una mortalidad de entre 40,000 y 100,000 personas (WHO, 1997). Históricamente, estas cifras han servido como referencia para el estudio de la amibiasis, sin embargo, podrían estar sobreestimando la frecuencia real de la infección por *E.*

histolytica debido a que fueron calculadas antes de la aplicación de las herramientas moleculares que permitieron reconocer a *E. dispar* como una especie diferente de *E. histolytica* (Diamond y Clark., 1993). A este respecto, otras especies morfológicamente indistinguibles de *E. histolytica/E. dispar* han sido recientemente asociadas a casos de colitis en Asia y, al igual que *E. dispar*, sólo pueden diferenciarse de *E. histolytica* mediante la amplificación de fragmentos de los genes de la subunidad pequeña de ARNr mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Haque *et al.*, 1998). Dichas especies son *E. moshkovskii* y *E. bangladeshi*; la primera capaz de provocar disentería en niños y modelos experimentales de amibiasis en roedores, y la segunda descubierta en muestras de heces diarreicas que contenían quistes amibianos (Shimokawa *et al.*, 2012; Royer *et al.*, 2012). Por su parte, *E. dispar* que siempre se ha considerado una especie avirulenta, fue encontrada en casos de AHA en México, y en casos de colitis en Brasil, donde los trofozoítos fueron aislados y se comprobó su potencial virulento en un modelo experimental de AHA (Dolabella *et al.*, 2012; Shibayama *et al.*, 2007; Ximénez, 2010). Por lo anterior, la epidemiología de la amibiasis se está redefiniendo mediante técnicas moleculares que permiten la diferenciación entre las diversas especies de *Entamoeba*.

Aunque *E. histolytica* tiene distribución cosmopolita, son los países subdesarrollados con clima tropical y condiciones sanitarias deficientes los de mayor endemia, particularmente México, la India, Tailandia, Bangladesh, Sudáfrica y algunos países de Centro y Sudamérica. (Ximénez *et al.*, 2007; 2009). Debido a los movimientos migratorios hacia y desde países

endémicos, este parásito también se encuentra en países industrializados, aunque su prevalencia es baja y el modo de transmisión puede variar como lo que ocurre en algunas partes de Australia y Japón entre hombres homosexuales, donde se ha comprobado que la infección puede transmitirse por contacto sexual (Hung *et al.*, 2012). En Estados Unidos, se reportan prevalencias que van del 1 al 2%, en tanto que en Alemania un estudio prospectivo demostró que sólo un 0.3% de la población presentaba una infección activa por *E. histolytica* (Romero-Cabello, 2007; Weinke *et al.*, 1990).

En México, se han determinado cifras de infección por *E. histolytica* de un 14% (Ximenéz, 2006). Antes de 1994 se atendían en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) casi medio millón de casos de amibiasis intestinal y 2,500 de AHA. Ese mismo año, la Encuesta Nacional Seroepidemiológica reportó 8.41% de seropositividad al parásito, indicando un índice relativamente alto de infección invasiva. (Caballero-Salcedo, 1994). Actualmente, el número de casos y la incidencia de amibiasis intestinal y extraintestinal ha ido disminuyendo, sin embargo, esta parasitosis continúa siendo un grave problema de salud pública, ocupando el sexto lugar como causa de morbilidad a nivel nacional (Fig. 5). Hasta la semana 52 de 2016 el Boletín de Vigilancia Epidemiológica reportó 218,090 casos de amibiasis intestinal distribuidos principalmente en los estados de Chiapas, Guerrero, Estado de México, Hidalgo, Ciudad de México, Veracruz, Tabasco y Yucatán. En cuanto al AHA, se registraron hasta la misma fecha 586 casos principalmente en Sinaloa, Jalisco, Chiapas, Coahuila, Colima, y Zacatecas.

La mortalidad estimada por AHA se estima en 50 a 90 casos por año, siendo más frecuentes en hombres que en mujeres en una relación de 3 a 1 (CENAVECE, 2016).

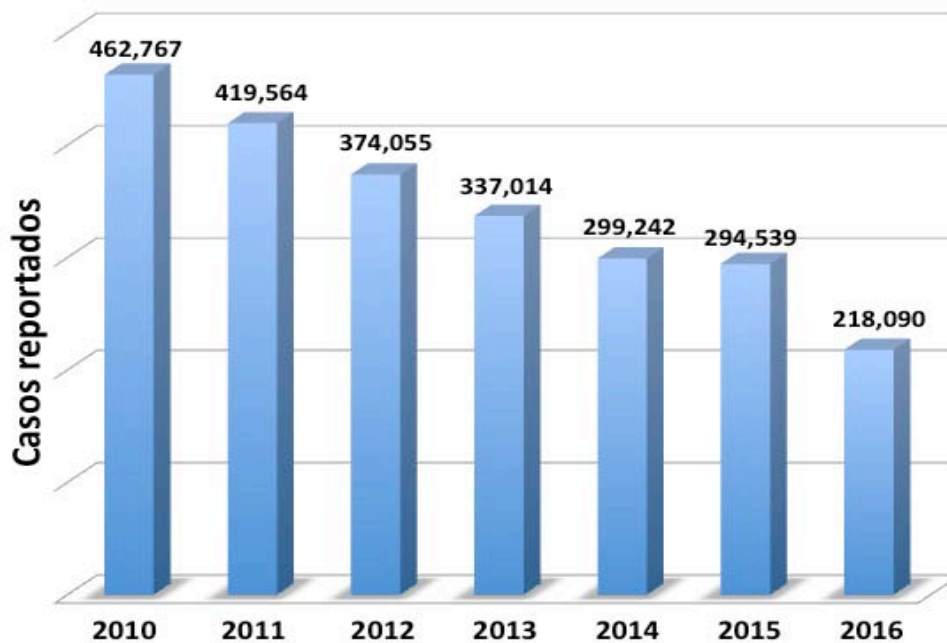


Figura 5. Casos de amibiasis intestinal reportados por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica hasta el año 2016. A pesar de la baja observada en el número de casos, la amibiasis continúa siendo una causa importante de morbilidad a nivel nacional. Fuente: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/>

1.2.8 Patogenia

La patogénesis de *E. histolytica* es compleja y depende de una interacción dinámica entre factores atribuibles tanto al hospedero como al parásito. En relación al hospedero, se ha reportado que la presencia del alelo DBQI*0601 del MHC de clase II está asociada con resistencia a la infección por *E. histolytica* en una población de niños en Bangladesh (Duggal *et al.*, 2010). Por el contrario, el alelo HLA-DR3 y el complotipo SC01 se ha relacionado con mayor frecuencia de AHA en una población de niños mexicanos (Pérez-Rodríguez *et al.*, 1990).

Por otra parte, se ha observado que el efecto citotóxico de *E. histolytica* se modifica debido a la especie bacteriana que coexiste con el parásito en el intestino (Padilla-Vaca *et al.*, 1999). Mediante experimentos *in vitro* se demostró que la incubación simultánea de *E. histolytica* con las bacterias enteropatógenas *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Shigella dysenteriae* aumenta la adherencia y la citotoxicidad del parásito hacia monocapas de células MDCK (Galván *et al.*, 2008).

Dentro de los mecanismos propios de *E. histolytica*, la patogenicidad se atribuye a la expresión de factores de virulencia que participan en procesos de adherencia, citotoxicidad, proteólisis de la matriz extracelular (MEC) y en la motilidad de los trofozoítos entre la MEC y los tejidos humanos. La amibiasis invasiva requiere que los trofozoítos se adhieran a la mucosa y al epitelio intestinal, lo que se logra mediante lectinas de superficie, de las cuales, la lectina Gal/GalNAc es la más estudiada (Fig 6B). Esta molécula reconoce determinantes de galactosa (Gal) y N-acetil-D-galactosamina (Gal/NAc) presentes en la mucina y en las células epiteliales del hospedero (Mann, 2002; Petri *et al.*, 2002). La unión a la mucosa provoca la secreción de hidrolasas y glucosidasas que degradan la mucina colonica, permitiendo el contacto directo de los parásitos con el epitelio. Una vez adheridas, las amibas desencadenan efectos citotóxicos dependientes del contacto con las células blanco, como el aumento súbito en la concentración de Ca^{2+} intracelular, apoptosis, fragmentación del ADN, pérdida de la integridad de la membrana celular, y la exposición en ésta de fosfatidilserina (PS) y

colectinas, que desempeñan una función importante en la fagocitosis por parte del parásito (Christy y Petri, 2011).

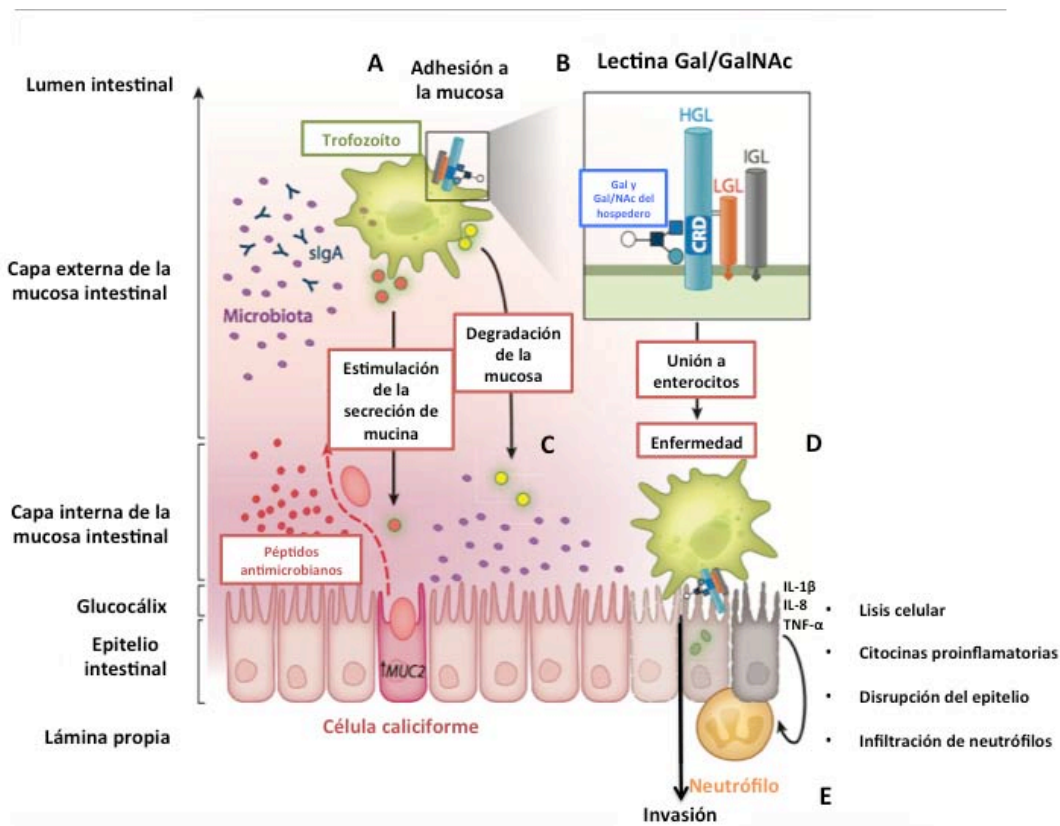


Figura 6. Patología de la amibiasis invasiva. **A)** Los trofozoítos se adhieren a la mucosa intestinal por medio de lectinas de superficie. **B)** esquema de la lectina Gal/GalNAc de *E. histolytica*, constituida por tres subunidades diferentes. Se muestra el reconocimiento de Gal y GalNAc por medio del dominio CRD contenido en la subunidad HGL de la molécula. **C)** la unión del parásito a la mucosa promueve la secreción de enzimas que degradan la matriz de la mucosa, al tiempo que promueven la secreción de moco por parte de las células caliciformes. **D)** El adelgazamiento de la mucosa permite el contacto de los trofozoítos con el epitelio, lo que resulta en su lisis y en la liberación de citocinas proinflamatorias por parte de los enterocitos, atrayendo neutrófilos al sitio de invasión. Abreviaturas: CRD: dominio de reconocimiento a carbohidratos, HGL: subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc, IGL: subunidad intermedia, LGL: subunidad ligera. (Tomado y modificado de Chelsie y Petri., 2014).

E. histolytica también provoca lisis epitelial mediante la secreción de amibaporos y proteasas de cisteína (PC's), Los primeros son péptidos pequeños (5-30 kDa) que forman canales iónicos en la membrana de las células blanco a través de los cuales escapan iones como Na^+ y K^+ (Leippe *et al.*, 1991, 2005). Por su parte, las CP's son enzimas que llevan a cabo la proteólisis de componentes de la MEC, como colágena, elastina, fibrinógeno, laminina y fibronectina (FN), provocando la descamación descontrolada del

epitelio y la membrana basal sobre la cual se apoyan los enterocitos (Que y Reed, 2000; y 2014). Los productos de degradación resultantes pueden ser quimioatrayentes que estimulan el movimiento del parásito (Guillén, 1996). Se ha demostrado que la interacción entre los trofozoítos y componentes de MEC como FN y sus fragmentos proteolíticos resulta en la formación de estructuras ricas en actina, que se forman en el sitio de contacto con el sustrato (Talamás *et al.*, 1994). En este punto, tanto la fagocitosis como la motilidad de los trofozoítos entre la MEC son vitales en el desarrollo de la patogenicidad (Labruyère *et al.*, 2006). Ambos fenómenos dependen del funcionamiento correcto del citoesqueleto amibiano por lo que a continuación, se realizará una descripción detallada de los elementos que lo constituyen.

1.3 Citoesqueleto de *Entamoeba histolytica*.

Como se mencionó anteriormente, la invasión tisular y la fagocitosis de *E. histolytica* dependen de la acción coordinada del citoesqueleto. A pesar de que los trofozoítos son células móviles y realizan la fagocitosis de manera eficiente, sus componentes citoesqueléticos son relativamente simples. El citoesqueleto de éste parásito consta únicamente de dos elementos principales: microtúbulos y microfilamentos (Meza *et al.*, 2006). Análisis genómicos señalan la carencia de proteínas pertenecientes a los filamentos intermedios (Clark *et al.*, 2007). Los microtúbulos de *E. histolytica* están constituidos por heterodímeros de tubulinas α y β , cuyos genes codifican proteínas altamente divergentes (Roy y Lohia, 2004; Sánchez *et al.*, 1994). Un tercer tipo de tubulina, la tubulina- γ , participa en el ensamblaje de los microtúbulos durante la división celular (Gomez-Conde *et al.*, 2004). La

ubicación de éstas estructuras en *E. histolytica* es principalmente intranuclear, y la regulación de su ensamble y desensamble es desconocida (Vayssié *et al.*, 2004).

Por su parte, la actina es el componente efector principal del citoesqueleto en este protozooario. Es una proteína de 376 aa con un peso molecular de 45 kDa y un punto isoeléctrico de 5.4 (Meza *et al.*, 1982). Presenta un residuo inusual de lisina cercano a su extremo N-terminal que podría tener funciones reguladoras pues se ha comprobado que puede ser acetilado, lo que afecta la motilidad y la virulencia del parásito *in vitro* (Huber *et al.*, 1987; López-Contreras *et al.*, 2013). A la fecha, se han encontrado 8 genes de actina en el genoma de *E. histolytica*, sin embargo, sólo se han hallado 5 isoformas que se expresan preferentemente en el estadio de trofozoíto, cuando éste interacciona con proteínas de la MEC. (Clark *et al.*, 2007; Luna-Nácar *et al.*, 2016; Ríos *et al.*, 2008). Al igual que en otros eucariontes, ésta proteína se encuentra en forma de actina monomérica o globular (actina-G), que polimeriza para formar microfilamentos de 7nm de diámetro (actina-F) que son en realidad dos filamentos entrelazados no ramificados que experimentan un rápido y constante ciclo de polimerización/despolimerización a medida que el parásito cambia de forma en respuesta a estímulos externos. En el inicio de la polimerización (también llamado “nucleación”) los monómeros de actina-G forman dímeros y trímeros orientados en la misma dirección, lo que le confiere polaridad a los microfilamentos que crecen mediante la adición de monómeros de actina a ambos extremos del microfilamento, sin embargo, el extremo + se elonga a mayor velocidad que

el extremo de crecimiento lento denominado extremo - (Mitchinson y Cramer, 1996). Ésta transición se facilita cuando se hidroliza ATP durante el ensamblaje de los filamentos (Fig. 7).

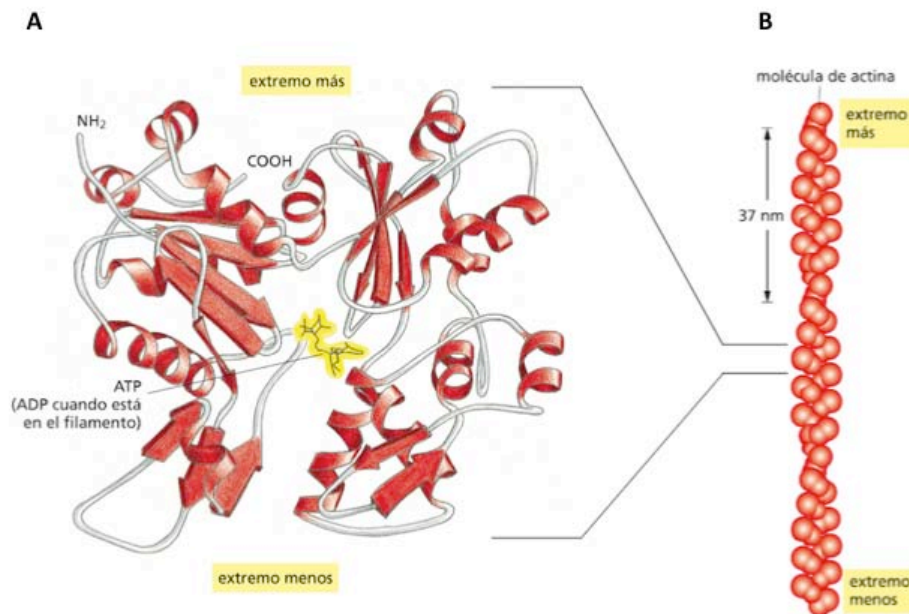


Figura 7. Estructura de un monómero y un microfilamento de actina. **A)** monómero de actina constituido por dos dominios globulares separados por una hendidura con un nucleótido (ATP o ADP) en el centro de la molécula. **B)** Disposición de los monómeros en un microfilamento (Tomado de Alberts *et al.*, 2010).

A pesar de su simplicidad estructural, la actina puede formar estructuras complejas gracias a la participación de las “proteínas de unión a actina” (ABP’s, del inglés: actin binding proteins). Estas proteínas contribuyen con la nucleación y en la formación de haces y redes que pueden unirse a otras proteínas en el citoplasma o a proteínas y lípidos presentes en la membrana plasmática y en membranas vesiculares (Bailey *et al.*, 1985; Cunningham *et al.*, 1992) (Cuadro 1).

Cuadro 1. ABP's que participan en la dinámica del citoesqueleto de actina de <i>E. histolytica</i>			
Proteína	Función	Localización	Referencia
ARP2/3	Complejo de 7 proteínas que nuclea y polimeriza filamentos de actina. Complejo asociado a procesos de formación del fagosoma.	Citoplasmática	Hon et al., 2010 Marion <i>et al.</i> , 2005 Mujamder, 2008 Lohia <i>et al.</i> , 2008
Forminas	Proteína de unión que nuclea y polimeriza filamentos Participan en la nucleación de la actina uniéndose directamente a la proteína	Pseudópodos, fagosomas, ensamble microtubular dentro del núcleo	Marion et al., 2005 Majumder y Lohia <i>et al.</i> , 2008
EhCaBP1	Proteína de unión a calcio que favorece la nucleación de microfilamentos	Citoplasmática. Se enriquece en las copas fagocíticas y pseudópodos durante la eritrofagocitosis.	Sahoo, 2004 Bailey <i>et al.</i> , 1985
α-actinina 1 y 2	Proteínas de unión a Ca^{2+} que entrelazan microfilamentos para formar haces contráctiles. Interactúan con el dominio intracelular de la lectina Gal/GalINAc , por lo que podrían estar implicadas en el mecanismo infeccioso del parásito	Citoplasmática. Translocada a la membranas vesiculares	Virel <i>et al.</i> , 2007 Virel y Beckman, 2006 Addario <i>et al.</i> , 2011
Gelsolina	Separa los filamentos de actina uniéndose al extremo +, dando lugar a filamentos pequeños capaces de llevar a cabo la nucleación	Citoplasmática	Shafer <i>et al.</i> , 1996
Cofilina	Se une a los filamentos de actina-ADP favoreciendo su desensamblaje.	Citoplasmática	Rosenblatt <i>et al.</i> , 1997
ABP-120	Entrecruza filamentos, formando redes y fibras de estrés.	Pseudópodos en extensión. Se enriquece en estructuras como el cap.	Binder <i>et al.</i> , 1995 Díaz-Valencia <i>et al.</i> , 2007 Vargas <i>et al.</i> , 1996
Miosina II	Reclutada alrededor de los fagosomas. Involucrada en el capping y en la formación del uroide	Localización difusa	Arhets <i>et al.</i> , 1995
Miosina IB	Asociada con los fagosomas. Posible papel en el entrecruzamiento de los microfilamentos.	Concentrada en los pseudópodos, bajo la membrana plasmática, en la membrana de las vesículas, en puntos bien definidos en el citosol, y en copas fagocíticas.	Arhets <i>et al.</i> , 1995

Además de las ABP's, se ha comprobado mediante experimentos *in vitro* que diferentes isoactinas están asociadas a diversos tipos de estructuras como haces, redes, fibras de estrés, puntos de actina, anillos y bocas fagocíticas, lo que sugiere que el citoesqueleto de *E. histolytica* puede formar dominios intracelulares con diferentes propiedades funcionales (Fig. 8). Éstos rearrreglos se dan en respuesta a un estímulo externo, como cuando los trofozoítos interactúan con proteínas de la MEC y células blanco (Bailey *et al.*, 1985; Talamás y Ríos., 2000).

La primera evidencia de la existencia de receptores para proteínas de MEC en *E. histolytica* provino de experimentos donde la FN y sus fragmentos proteolíticos se utilizaron como sustratos para la adhesión, demostrando la existencia de una proteína de 37 kDa que se une al dominio amino terminal de la FN (Talamás y Meza, 1988). Cuando los trofozoítos se unen a esta proteína se activan mecanismos regulatorios que dependen de moléculas de señalización como GTPasas, y ABP's, lo que se traduce en la expresión de diferentes isoactinas y en la secreción de PC's, necesarias para llevar a cabo la adhesión, degradación y locomoción observado durante el proceso invasivo realizado por *E. histolytica* (Guillén, 1996; Meza, 2000; Ríos *et al.*, 2008).

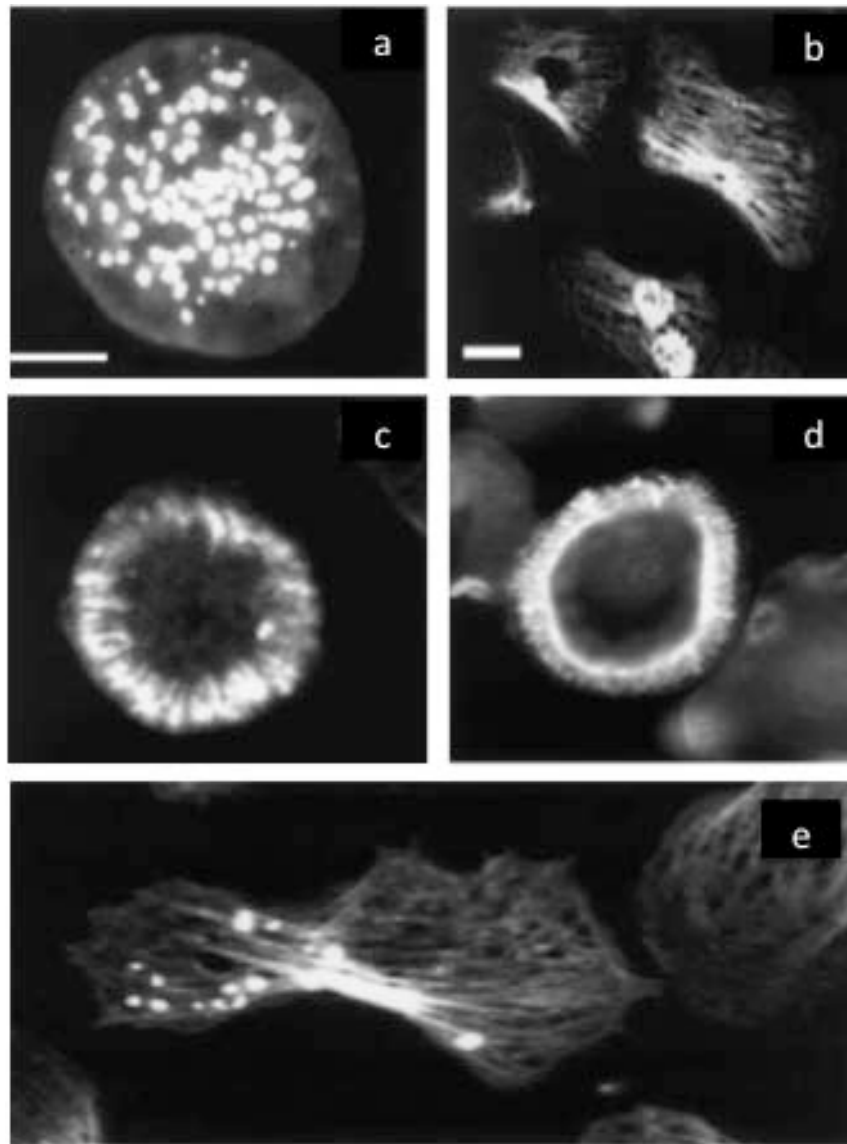


Figura 8. Estructuras de actina formadas durante la interacción de trofozoítos de *E. histolytica* con FN. **a)** puntos de actina, **b)** fibras de estrés, **c)** bocas fagocíticas, **d)** anillos. El parásito puede combinar éstas estructuras como se muestra en **e)** donde se aprecia un trofozoíto con fibras de estrés y puntos de actina en el sitio de interacción con fibronectina. Los trofozoítos fueron teñidos con faloidina rodaminada (Modificado de Ríos *et al.*, 2008).

1.4 Regulación del citoesqueleto de actina de *Entamoeba histolytica*.

Miembros de la subfamilia de Rho de las proteínas de unión a GTP de bajo peso molecular (EhRho, ROCK-2, Rac y Cdc42) estimulan la polimerización de la actina del parásito. Estas proteínas transmiten señales provenientes de los receptores presentes en la membrana de los trofozoítos hacia las proteínas del citoesqueleto, regulando su remodelación (Hall, 1994). Cuando

los trofozoítos del parásito son incubados con FN, la cinasa EhRho activa a la cinasa de serina/treonina ROCK-2, resultando en una cascada de señalización que involucra a otras cinasas como LIMK y a las ABP's ABP-120 y cofilina, que actúan sobre la actina de la amiba (Guillen *et al.*, 1998; Ríos *et al.*, 2008). Por su parte, Rac y Cdc42 estimulan a proteínas pertenecientes a la familia WASP que activan al complejo ARP 2/3 activando el proceso de ramificación de los microfilamentos para formar filopodios (Franco-Barraza *et al.*, 2006).

1.5 Fagocitosis en *E. histolytica*.

Como en otros eucariontes, la fagocitosis en *E. histolytica* es un proceso ordenado que inicia con el reconocimiento de los ligandos fagocitables por receptores específicos expresados en la superficie del parásito. Este acoplamiento inicia rutas de señalización intracelulares que culminan en el remodelamiento del citoesqueleto amibiano. De los receptores de *E. histolytica* que participan en la fagocitosis, la lectina Gal/GalNAc reconoce sólo a una fracción de blancos ingeribles, ya que su inhibición competitiva con Gal no interrumpe la fagocitosis de células de ovario de hámster chino (CHO) (Radvin y Guerrant, 1981). *E. histolytica* también posee receptores acoplados a proteínas G (EhGPCR) que están íntimamente ligados en la formación de copas fagocíticas durante la eritrofagocitosis (Rodríguez *et al.*, 2000; Picazarri *et al.*, 2005). Por su parte, Baxt y cols (2010) encontraron que la proteasa romboide (EhROM1) de *E. histolytica* puede regular la ingestión de células muertas, debido a que la mala transcripción de su gen disminuye la fagocitosis de células CHO en apoptosis. Otras proteínas que podrían

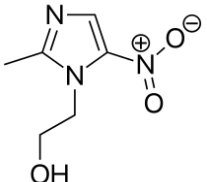
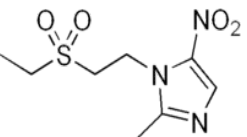
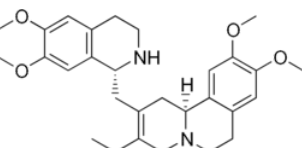
funcionar como receptores durante la fagocitosis son SREHP y KERP1 que reconocen FS y proteínas adaptadoras como colectinas y C1q expuestas en la membrana de las células apoptóticas (Huston *et al.*, 2003; Texeira *et al.*, 2008); y algunos miembros de la familia de cinasas transmembranales (TMK), como TMK-39, que regula la fagocitosis de células muertas, así como la iniciación del reordenamiento del citoesqueleto de actina a través de la fosforilación de varias cinasas citoplasmáticas como PI3P, PI3K, EhC2PK y EhCaBP1 (Jaumouillé *et al.*, 2011).

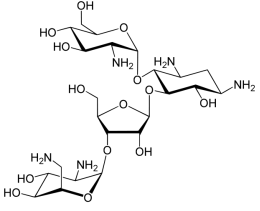
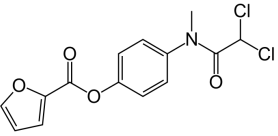
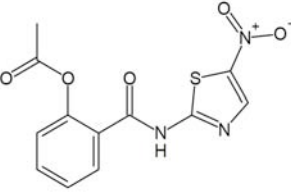
El tráfico vesicular es regulado por un grupo de entre 40 a 45 GTPasas Rab (Saito-Nakano *et al.*, 2001; Temesvari *et al.*, 1999). Las más estudiadas son EhRab5 y EhRab7 que modulan la fusión vesicular con la membrana de la célula blanco, y participan también en la formación de un compartimento llamado vacuola pre-fagosomal durante la eritrofagocitosis. Estas proteínas tienen diferentes localizaciones dentro del parásito. EhRab5 modula el transporte de PC's al interior del fagosoma, mientras que EhRab7 participa en el transporte de hidrolasas, localizándose en vesículas que experimentan fusión heteróloga con los lisosomas (Nakada-Tsukui *et al.*, 2005; Okada *et al.*, 2005; Saito-Nakano *et al.*, 2004).

El extraordinario pleomorfismo de los trofozoítos amibianos en conjunción con la fagocitosis resulta en la destrucción tisular, y la invasión de órganos extraintestinales como el hígado y, a menos que los parásitos sean eliminados con fármacos eficientes, continuarán su migración extraintestinal poniendo en riesgo la vida del enfermo. Debido a su importancia en la biología del parásito, y en el desarrollo de la patogenia, la actina podría utilizarse como blanco terapéutico.

1.6 Tratamiento de la amibiasis

Desde hace más de 50 años la quimioterapia ha sido el método más económico y eficaz para el control de la amibiasis. El objetivo principal de ésta es la erradicación de los parásitos en su localización intestinal y extraintestinal sin que se presenten efectos secundarios indeseables. Para ello, se disponen de fármacos antiámibianos con acción en diferentes niveles tisulares. En el cuadro 2 se resumen los mecanismos de acción así como algunas características importantes de éstos fármacos.

Cuadro 2. Características esenciales de los fármacos empleados en el tratamiento de la amibiasis intestinal, extraintestinal y asintomática.			
Fármaco/ estructura química	Dosis (adultos)	Mecanismo de acción	Efectos secundarios
<p>Metronidazol</p> 	-oral: 750mg/ kg, 3 veces al día/7-10 días.	Activado en organismos anaerobios por reducción del grupo 5-nitro. El fármaco activado daña el DNA del parásito	Sabor metálico en la boca, náusea, vómito, diarrea, cefalea, vértigo. Teratogénico y carcinogénico
<p>Tinidazol</p> 	-Oral: 800mg, 3 veces al día/5 días.		
<p>Dehidroemetina</p> 	-Oral 2g/día/3 días.	Inhibe la síntesis de proteínas	Diarrea, náusea, vómito, debilidad muscular, hipotensión, dolor precordial, taquicardia y disritmia cardíaca

<p>Paromomicina</p> 	<p>-oral, 25-35mg/Kg/3 veces al día/7 días.</p>	<p>Inhibe la síntesis de proteínas</p>	<p>Náusea, vómito, calambres, diarrea.</p>
<p>Furoato de diloxanida</p> 	<p>-500mg/3 veces al día/10 días.</p>	<p>Desconocido</p>	<p>Flatulencia</p>
<p>Nitazoxanida</p> 	<p>-oral, 500 mg/12h/3 días.</p>	<p>Inhibición de la piruvato-ferredoxin-oxido reductasa.</p>	<p>Cefalena, nausea, vómito, daño al nervio óptico y neuropatía periférica.</p>

En la infección intestinal asintomática se emplean medicamentos como furoato de diloxanida y paromomicina que actúan solamente contra los trofozoítos presentes en la luz intestinal (Apt *et al.*, 2013). Para la infección intestinal invasiva puede emplearse la nitazoxanida con buenos resultados, aunque aún se evalúa su uso en AHA (Rossignol *et al.*, 2007). En casos de colitis severas y AHA, se administra por vía subcutánea la dehidroemetina, sin embargo, este alcaloide es relativamente tóxico y debe utilizarse con precaución y monitoreo cardiológico permanente (Apt *et al.*, 2013). Para la infección intestinal sintomática y extraintestinal se utilizan fármacos de acción mixta (es decir, tanto luminal como tisular) como el MTZ el cual es, desde hace más de 40 años, el medicamento de elección para el control de la

amibiasis (Astelbauer *et al.*, 2011; Lofmark *et al.*, 2010). Otro nitroimidazol, el tinidazol es similar al MTZ por su mecanismo de acción y por sus efectos adversos. Como se aprecia en la tabla 2, todos los medicamentos provocan efectos secundarios variados y frecuentes por lo que algunos (como la emetina) se han descontinuado en ciertos países como en México, mientras que el tinidazol no se comercializa en los Estados Unidos (Tay-Zavala *et al.*, 2010). Este inconveniente, aunado a que los diferentes regímenes quimioterapéuticos son muy largos, provoca que muchas personas abandonen de manera prematura el tratamiento lo que es alarmante ya que ésta acción conduce a problemas de falla terapéutica, en la cual, los parásitos no son completamente eliminados y prevalecen en el hospedero, quien continúa diseminando quistes infectivos en su medio (Bansal *et al.*, 2006). Esto es particularmente frecuente en el caso del MTZ por presentar el mayor número de efectos secundarios.

1.7 Mecanismo de acción del MTZ.

Como se mencionó anteriormente, el MTZ es el fármaco de elección para el tratamiento de la amibiasis intestinal y extraintestinal. Este fármaco suele administrarse por vía oral y se distribuye rápidamente por los tejidos, alcanzando concentraciones elevadas en los líquidos orgánicos incluido el líquido cefalorraquídeo (Rang *et al.*, 2011). Este medicamento entra como un pro-fármaco inactivo por difusión pasiva al interior de los trofozoítos donde compete con las enzimas ferredoxina y flavodoxina como un aceptor de electrones por parte de la enzima piruvato-ferredoxin oxidorreductasa (PFOR) (Wassmann, *et al.*, 1999). La activación de esta droga ocurre en el citosol del

parásito donde un electrón es transferido al grupo nitro del fármaco, lo que origina un nitro-radical tóxico llamado N-(2-hidroxietil). Esta reacción se ve favorecida en condiciones anaeróbicas como las que se encuentran en el microhábitat intestinal, ya que la carencia de oxígeno impide que el nitro-radical tóxico se oxide y el fármaco pierda su efectividad (Upcroft y Upcroft., 2001). Una vez activado, el MTZ daña a los parásitos al interactuar con su ADN, oxidándolo y liberando fosfato de timidina el cual induce la desestabilización y la pérdida de la estructura de doble hélice de la molécula, lo que impide la reparación y síntesis posterior del material genético, provocando la muerte de los trofozoítos (Raether *et al.*, 2003; Samuelson, 1999).

1.7.1 Efectos secundarios del MTZ

El MTZ es bien tolerado, sin embargo, frecuentemente se presentan reacciones adversas severas que provocan malestar en los pacientes quienes tienden a abandonar de manera prematura el tratamiento (Redigueri *et al.*, 2011). Los efectos secundarios más comunes son del tipo gastrointestinal: náusea, vómito, diarrea, dolor estomacal y constipación. También se han reportado alteraciones del sistema nervioso central como falta de coordinación, vértigo, cefalea, ataxia y neuropatías sensoriales (Rang *et al.*, 2011). Éstos efectos secundarios son consecuencia de su mecanismo de acción, el cual, a pesar de ser selectivo hacia los patógenos anaeróbicos, puede alterar en algunas ocasiones la estructura tridimensional del ADN de las células del hospedero, provocando aductos en el ADN, así como

sustitución de pares de bases y rompimientos de la doble cadena (Samuelson, 1999).

1.7.2 Teratogenicidad y carcinogenicidad del MTZ

El MTZ atraviesa con facilidad la barrera placentaria, y ha demostrado ser teratogénico y embriogénico en roedores y conejos (Mudry *et al.*, 2001; Eland *et al.*, 2000). No se ha demostrado teratogenicidad en humanos, sin embargo, no se recomienda su uso durante el primer trimestre del embarazo (Williams *et al.*, 2000).

El MTZ es mutagénico en sistemas bacterianos, donde induce sustituciones de pares de bases en el ADN (Trinh *et al.*, 1998). Datos recientes, han demostrado que el MTZ y sus metabolitos hidroxilados tienen la capacidad de inducir daño al ADN en linfocitos humanos mediante rompimientos de la cadena de ADN y aberraciones cromosómicas (Dobiás *et al.*, 1994; Menéndez *et al.*, 2002). Por otra parte, el MTZ ha mostrado actividad carcinogénica en animales de experimentación produciendo linfomas, cáncer pulmonar, fibroadenomas mamarios y adenocarcinomas (Ostrosky-Wegman *et al.*, 1994). Al respecto, ya ha sido prohibido para su uso veterinario en Alemania (Elizondo *et al.*, 1996).

1.7.3 Sensibilidad al MTZ por diferentes aislados de *E. histolytica*.

Existen reportes de casos aislados de AHA donde se ha presentado disminución de la susceptibilidad de *E. histolytica* al tratamiento con MTZ, sin que ello demuestre el surgimiento de resistencia a este fármaco, sin

embargo, un pequeño porcentaje de amibas podrían volverse resistentes debido al abuso del MTZ como antiparasitario. Reportes experimentales han mostrado que es posible inducir *in vitro* el fenómeno de la resistencia al fármaco cuando los trofozoítos de la cepa virulenta HM1:IMSS son expuestos gradualmente a concentraciones subletales de MTZ (Samarawickrema *et al.*, 1997). Al respecto, Agadu y cols (2002) demostraron que la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) del MTZ fue de 18.47 µM para la mayoría de los aislados susceptibles de *E. histolytica*, estableciendo además un valor de 30µM como punto de corte para considerar como resistente a un aislado (Wasmann *et al.*, 1999).

1.7.4 Mecanismos de resistencia al MTZ en *E. histolytica*.

Los modelos experimentales de resistencia al MTZ en *E. histolytica* han demostrado que, a diferencia de lo descrito previamente en otros protozoarios como *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*, la resistencia al MTZ en amibas no se debe ni a la disminución en la expresión de la enzima PFOR ni a la sobre-expresión de glicoproteínas-P encargadas de la expulsión del fármaco al exterior de los trofozoítos, sino a un incremento de tres a cinco veces mayor en la expresión de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (fe-SOD) y peroxirredoxina, así como a un decremento en la expresión de las enzimas flavin reductasa y ferredoxina (Bansal *et al.*, 2006). El papel de fe-SOD y la peroxirredoxina se confirmó mediante la transfección episomal de éstas enzimas en aislados del parásito susceptibles al MTZ, lo que resultó en la disminución en la susceptibilidad a dicho fármaco (Wasmann *et al.*, 1999).

1.8 Desarrollo de nuevos derivados bencimidazólicos con actividad antiparasitaria.

Considerando la problemática que existe en el tratamiento de la amibiasis intestinal y extraintestinal y el riesgo latente del surgimiento de resistencia al MTZ, es de gran importancia contar con nuevas alternativas para el tratamiento de esta parasitosis a corto y mediano plazo. A este respecto, los bencimidazoles (BCM) (Fig. 9), son compuestos heterocíclicos muy importantes en la química medicinal gracias a su versatilidad, bajo costo, baja toxicidad y a su amplio espectro de actividad biológica (antihelmíntica, antiprotozoaria, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, antiinflamatoria, antihipertensiva, antiulcerosa, insecticida y antialérgica) (Gurvinder *et al.*, 2013).

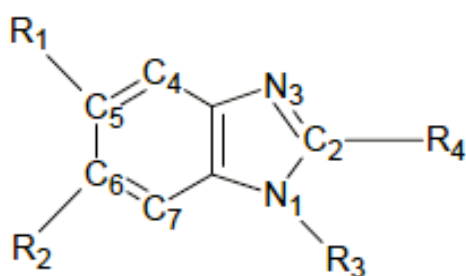


Figura 9. Estructura básica del núcleo bencimidazólico. La estructura de este tipo de fármacos consiste en un sistema aromático formado por la unión de un anillo bencénico unido a un grupo imidazol en sus posiciones 4 y 5.

Desde inicios de la década de 1960 los BCM se han empleado en el tratamiento de las helmintiasis en humanos, sin embargo, estudios recientes han demostrado que diversas modificaciones estructurales efectuadas en las posiciones R1, R2, R3 y R4 del anillo bencimidazólico pueden dar como resultado compuestos con actividad antiparasitaria más amplia. Con el interés de contar con nuevas alternativas en el tratamiento de las parasitosis, incluyendo a la amibiasis, el Departamento de Farmacia de la Facultad de

Química de la UNAM ha diseñado y sintetizado nuevos compuestos a partir de modificaciones estructurales al núcleo bencimidazólico, algunos con actividad contra parásitos protozoarios como *G. lamblia*, *T. vaginalis*, *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma brucei* y a *E. histolytica*. (Navarrete-Vazquez *et al.*, 2001; Valdez *et al.*, 2002; Valdéz-Padilla *et al.*, 2009; Díaz-Chiger *et al.*, 2012;).

Dentro de los compuestos sintetizados hasta ahora, destaca el 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*bencimidazol, denominado como compuesto **Alfa** (Fig. 10). Este compuesto fue diseñado como un bioisótero del triclabendazol (TCBZ) con el objetivo inicial de obtener un compuesto con actividad fasciolicida contra cepas del tremátodo *Fasciola hepática* resistentes al TCBZ.

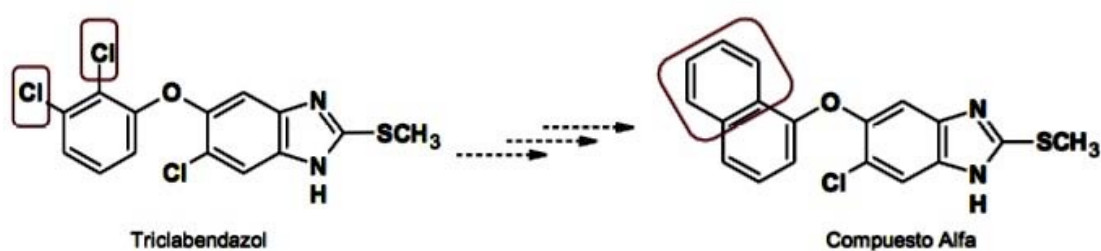


Figura 10. Diseño del compuesto **Alfa** a partir del TCBZ por reemplazo bioisotérico. La sustitución de los dos átomos de cloro en posiciones 5 y 6 por un anillo benceno produjo un compuesto con propiedades fisicoquímicas y biológicas similares al TCBZ. (Tomado de Hernández-Campos, 2014).

Al evaluar la actividad fasciolicida *in vitro* de **Alfa** contra metacercarias de *F. hepática* resistentes al TCBZ, se determinó que **Alfa** es 100% efectivo a una concentración de 9.09 mg/mL (Vera, 1991). En estudios *in vivo*, el compuesto fue efectivo contra todas las fases de desarrollo del tremátodo, y se determinó la dosis de 15 mg/kg como la sugerida para ensayos posteriores en ovinos, donde **Alfa** fue igualmente efectivo contra todas las fases de desarrollo de la *Fasciola* (Ibarra-Velarde *et al.*, 1997; Fernández-Rivera *et al.*,

2002). En bovinos se determinó que la dosis máxima tolerada es 15 veces la dosis efectiva (Vera *et al.*, 2006).

1.8.1 Análisis por microscopia electrónica de barrido (MEB) de los cambios inducidos por Alfa en adultos de *F. hepática*.

Es ampliamente aceptado que los BCM tienen afinidad por la β -tubulina, inhibiendo su polimerización. Estudios *in silico* mostraron que para poder interactuar con la β -tubulina, los BCM requieren un átomo de hidrógeno en la posición 1, y un grupo metoxicarbonilamino en posición 2 (Robinson *et al.*, 2004). Las modificaciones estructurales realizadas en el compuesto **Alfa** pudieran cambiar su blanco proteico, en consecuencia, **Alfa** podría interactuar con proteínas distintas a la tubulina, como se ha demostrado con anterioridad para otros derivados bencimidazólicos (Valdez *et al.*, 2002).

A este respecto, cuando se analizó el efecto a nivel ultraestructural del compuesto **Alfa** sobre adultos de *F. hepática* (Fig. 11), se observó daño progresivo sobre el tegumento, particularmente sobre las espinas presentes en la cutícula (Rivera *et al.*, 2004). Cabe resaltar que estas estructuras estén constituidas casi en su totalidad por actina (Stitt, 1992).

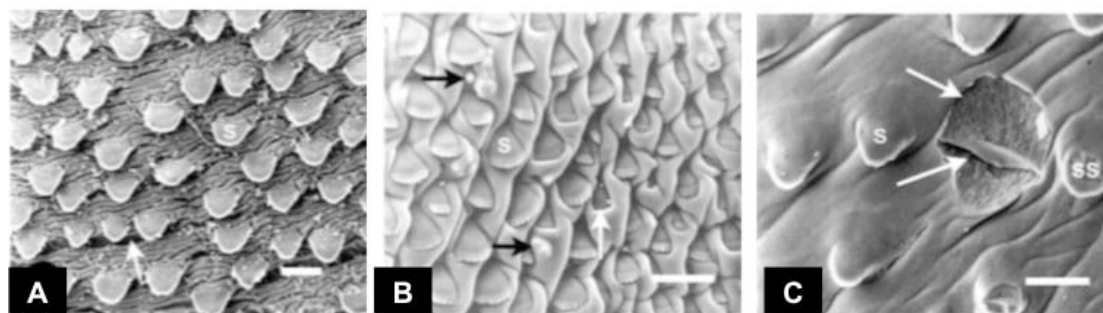


Figura 11. Micrografías de barrido de adultos de *F. hepática* extraídos de borregos tratados con **Alfa** a 10 mg/Kg a las 6, 12 y 24 h (**A**, **B**, **C**, respectivamente), evidenciando el daño a las espinas y al tegumento. **A**) se observan protuberancias en la superficie ventral (flecha). **B**) desorden estructural de los márgenes laterales. **C**) pérdida de las espinas con exposición de la lámina basal. S= espina; SS= espina dorsal. (modificado de Rivera *et al.*, 2004).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La quimioterapia de la amibiasis se basa principalmente en el uso del MTZ. Sin embargo, en la amibiasis extra-intestinal su efectividad se reduce, y por los efectos secundarios severos que éste ocasiona, hay abandono del tratamiento y falla terapéutica. Además, *in vitro* se han obtenido cepas resistentes al metronidazol, lo que sugiere la posibilidad del surgimiento de resistencia a este fármaco. Por lo anterior, es necesario desarrollar nuevos amebicidas, y la actina del parásito constituye un blanco terapéutico de gran interés.

Por otro lado, se cuenta con el compuesto **Alfa** que afecta a las espinas de la cutícula del adulto de *F. hepatica*, estructuras ricas en actina. Tomando en cuenta estas evidencias, es de interés evaluar la actividad amebicida del compuesto **Alfa** y su efecto sobre el citoesqueleto de actina de *E. histolytica*.

3. HIPÓTESIS

El compuesto **Alfa** tendrá actividad amebicida, afectando la expresión de la actina del parásito y la eritrofagocitosis de los trofozoítos de *E. histolytica*.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del compuesto **Alfa** sobre el trofozoíto de *E. histolytica* y la actina del parásito.

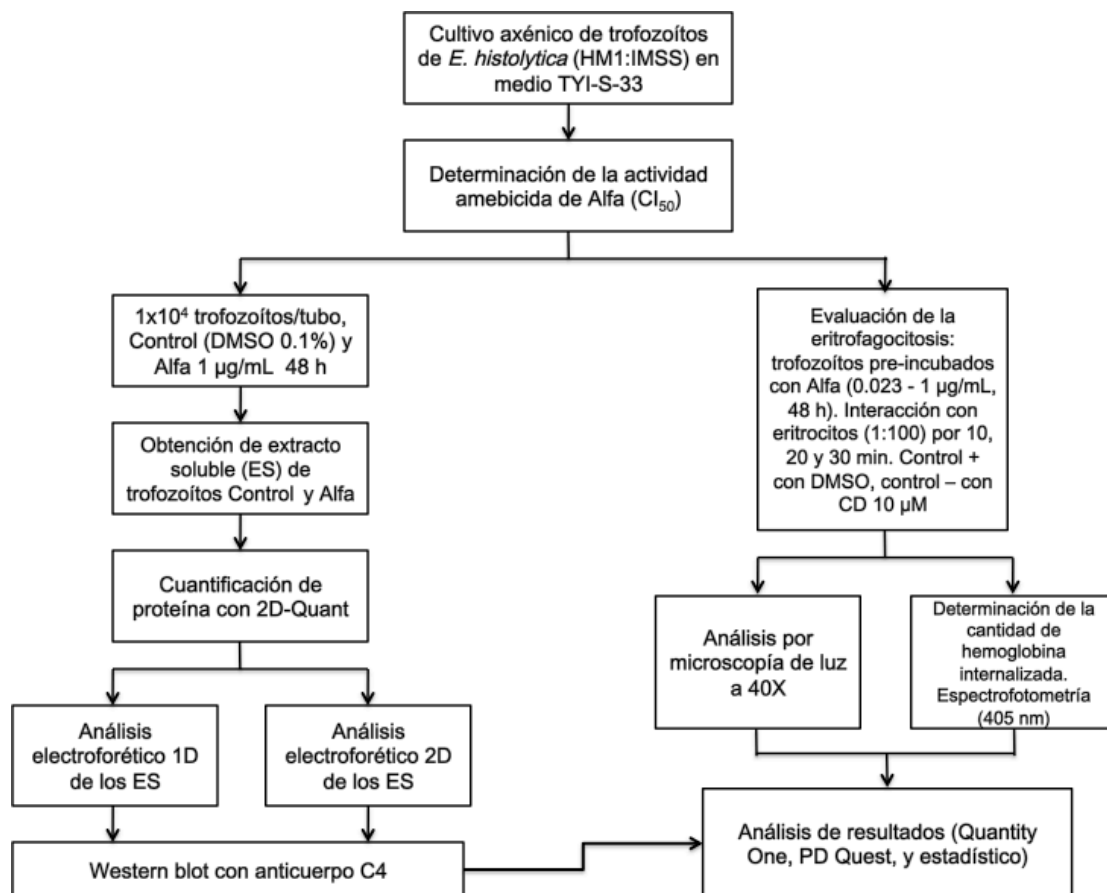
4.1 Objetivos particulares

- Determinar la actividad del compuesto **Alfa** sobre los trofozoítos de *E. histolytica* (CI₅₀).

- Analizar el efecto del compuesto **Alfa** sobre la expresión de la actina y sus isoformas en trofozoitos de *E. histolytica*.
- Analizar el efecto del compuesto **Alfa** en la eritrofagocitosis de los trofozoítos.

5. METODOLOGÍA

La estrategia experimental se presenta en el siguiente diagrama de flujo:



5.1 Cultivo axénico de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

1 X 10⁴ trofozoítos de la cepa HM1-IMSS se cultivaron axénicamente a 37°C durante 48h en medio TYI-S-33 suplementado con 3% de vitaminas y suero de ternera al 10% inactivado previamente a 56°C por 30 min. Antes de la

realización de los experimentos, se verificó la viabilidad de los trofozoítos mediante el método de exclusión de azul Tripano. Sólo se emplearon los cultivos que presentaron una viabilidad superior al 90% (Cedillo *et al.*, 2002).

5.2 Determinación de la actividad amebicida de Alfa

La actividad del compuesto **Alfa** contra los trofozoítos de *E. histolytica* se determinó mediante el método descrito por Cedillo y Muñoz (2002). Se colocaron 6×10^3 trofozoítos en tubos eppendorf con medio de cultivo con **Alfa** a concentraciones de 0.005, 0.01, 0.05, 0,1 y 0,5 $\mu\text{g/mL}$ preparadas a partir de un stock de **Alfa** a 5mg/mL diluído en DMSO. Los tubos se incubaron por 48h a 37°C, incluyendo un control negativo libre del compuesto. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el conteo de los trofozoítos en una cámara de Neubauer y se calculó el número de trofozoítos muertos respecto al control negativo. La CI_{50} fue calculada mediante el análisis Probit y se comparó con la del MTZ a las mismas concentraciones. Se realizaron dos experimentos independientes por triplicado.

5.3 Obtención de extracto soluble (ES) de trofozoítos tratados y no tratados con compuesto Alfa.

Se incubaron 1×10^4 trofozoítos de *E. histolytica* en 30 tubos de vidrio de 8 mL durante 48 h a 37° C conformando dos lotes de 15 tubos c/u: el de parásitos tratados con **Alfa** (1 $\mu\text{g/mL}$) y el lote de no tratados. Después de la incubación, los tubos se colocaron en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 150 x g por 10 min para retirar el medio de cultivo. Los botones de amibas se lavaron tres veces con PBS estéril y se transfirieron por separado a tubos

ependorf donde se les retiró el PBS y se adicionó inhibidores de proteasas (15 μ L de Complete –Roche- , TLCK-HCl 100 mM, TPCK 100 mM y 10 μ M de E-64 –Sigma-). Las muestras se incubaron durante 5 min en hielo. Posteriormente, se agregaron 50 μ L de amortiguador de lisis (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, DTT 40 mM) y se agitaron durante 10 segundos en vórtex. Los ES resultantes fueron aclarados mediante centrifugación a 13,000 x g durante 20 minutos, se tomó el sobrenadante y se transfirió a tubos eppendorf nuevos para posteriormente determinar su concentración.

5.4 Cuantificación de los extractos solubles de los trofozoítos

La cuantificación de proteína total de los ES se realizó con el kit comercial 2-D Quant (GE Healthcare) cuyo principio se basa en la unión específica de iones de cobre a las proteínas previamente precipitadas, y la medición espectrofotométrica del cobre restante en solución. Se preparó por triplicado una curva estándar utilizando la solución patrón de albúmina a 2 μ g/mL incluida en el kit.

Cuadro 3. Curva estándar de albúmina sérica bovina.					
Núm. de tubo	1	2	3	4	5
Vol. BSA (μL)	0	2.5	5	7.5	10
Concentración de BSA (μg)	0	5	10	15	20

La cuantificación de los extractos también se hizo por triplicado. Se transfirió 1 μ L de cada muestra a tubos eppendorf y se agregaron 100 μ L de solución precipitante y 100 μ L de solución co-precipitante. Posteriormente, se

centrifugaron todos los tubos a 13,000 x g por 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 20µL de solución de cobre y 80 µL de agua desionizada. Finalmente, se añadieron 200 µL de reactivo de color y se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. El contenido de los tubos se transfirió a una placa de poliestireno de 96 pozos, midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro para microplacas a 480 nm. La concentración de proteínas se obtuvo mediante el método de regresión lineal con base en la curva patrón obtenida.

5.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para verificar la integridad y la cuantificación de las proteínas contenidas en los extractos, se realizó la separación de éstas en condiciones reductoras con 2-β-mercaptoetanol y SDS al 10% de acuerdo a lo indicado por Laemmli (1970). Se tomaron 30µg de proteína total y se les añadió amortiguador de muestra (Tris-HCl 0.5M pH 6.8, glicerol, SDS al 10%, 2-β-mercaptoetanol al 0.05% v/v y azul de bromofenol al 0.05% p/v) en proporción 1:1. Cada muestra se cargó en geles de gradiente de poliacrilamida NuPAGE 4-12% en una cámara de electroforesis XCell Sure Lock con amortiguador de electroforesis NuPAGE MES SDS 1X (MES 50 mM, Tris Base 50mM, SDS 0.1%, EDTA 1mM, pH7.3) y se corrió a 200 Volts constantes durante 45 min. Se empleó un marcador de peso molecular con rango entre 225 y 10 KDa (Prestained SDS-PAGE Broad Range de PROMEGA). Los geles se tiñeron 90 min. con azul de Coomassie G-250 al 0.06% y se destiñeron con una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10%.

5.6 Inmunoelectrotransferencia de los ES de parásitos tratados o no tratados con Alfa.

La inmunoelectrotransferencia de los ES se realizó en geles de gradiente NuPage de 4 a 12%. Se tomaron 30µg de proteína de los parásitos control o tratados con **Alfa** y se realizó el corrimiento electroforético descrito en el inciso 5.5. Los geles se equilibraron 1h en amortiguador de transferencia (Tris 0.025M, glicina 0.192M metanol al 20% v/v) y se transfirieron a membranas de PVDF en una cámara Mini Trans-Blot Electroforetic Cell (Bio Rad) a 100 Volts durante 1h. Posteriormente, la membrana se bloqueó con ABS al 3% por 12 h a 4°C con agitación constante. Las membranas se cortaron en tiras de 5 mm y se incubaron 12 h por separado con el anticuerpo C4 (AbCAM) en dilución 1:2000 en PBS a 4°C. Paralelamente, se realizó la inmunoelectrotransferencia de la actina de músculo de conejo donada por el Dr. Javier Ambrosio Hernández (Facultad de Medicina, UNAM), que se utilizó como control de reactividad del anticuerpo C4. Se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS y se incubó 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Goat Anti Mouse HRP (AbCam) en dilución 1:2000. El revelado se realizó con 4-cloro-1-naftol en presencia de H₂O₂ durante 20 seg. La reacción se detuvo con agua destilada. Las imágenes se capturaron con un fotodocumentador ChemiDoc XRS (Bio-Rad) y se realizó un análisis densitométrico con el programa Quantity One 4.6.3 (Bio-Rad). Se realizaron dos experimentos independientes y se llevó a cabo una prueba de t-Student (p<0.05) con el programa GraphPad Prism 6.0e para determinar si hubo o no diferencias significativas respecto al ES de trofozoítos sin tratamiento.

5.7 Inmunolectrotransferencia 2D de ES de parásitos tratados o no tratados con Alfa.

Para verificar el efecto del compuesto **Alfa** sobre las isoformas de actina se realizó la inmunolectrotransferencia 2D de los ES de trofozoítos tratados y no tratados con **Alfa**. Para ello, se realizó el isoelectroenfoco y la electroforesis en las condiciones previamente descritas, excepto que la cantidad de proteína utilizada fue de 100 µg. Terminada la separación de las proteínas, los geles fueron incubados 1 h a 4°C en amortiguador de transferencia y se transfirieron a membranas de PVDF en una cámara Mini Trans-Blot Electroforetic Cell (Bio-Rad) a 100 Volts durante 1h. Las membranas se bloquearon toda la noche con ABS al 3% con agitación a 4°C. Luego del bloqueo, las membranas se lavaron 3 veces con PBS estéril y se agregó el anticuerpo C4 en dilución 1:2000 por 12 h, en tanto que el anticuerpo secundario se incubó por 1 h a 37°C en dilución 1:2000. El revelado se realizó con 4-cloro-1-naftol en presencia de H₂O₂ durante 20 seg. La reacción se detuvo con agua destilada. Las imágenes se documentaron en el fotodocumentador ChemiDoc y se analizaron con el programa PD Quest v8.0.1 (Bio-Rad).

5.8 Análisis proteómico 2D del ES de trofozoítos tratados y no tratados con Alfa.

Para separar a las proteínas en una primera dimensión, se sometió a los ES a un isoelectroenfoco utilizando tiras IPG Strip de 7 cm (Bio-Rad) con un gradiente de pH de 4-7 para obtener una buena separación de las isoactinas. Las tiras se hidrataron durante 16h dentro de la IPG Box (GE Healthcare) con

120 µg de los ES contenidos en 125 µL de amortiguador de hidratación DeStreak (GE Healthcare) al cual se le añadió 0.7 µL de una solución de anfolitos 3-10 (Bio-Rad). Después de la hidratación, se realizó el isoelectroenfoque con un equipo Ettan IPGPhor 3 (GE Healthcare) programando el protocolo de acuerdo al tipo de tira. Después del isoelectroenfoque, las tiras se equilibraron durante 15 min en amortiguador de SDS I (Tris-HCl 75mM pH 8.8, Urea 6M, glicerol al 29.3%, SDS 2%, azul de bromofenol al 0.002% y 50 mg de DTT) y posteriormente 15 min más en amortiguador de SDS II (Tris-HCl 75mM pH 8.8, Urea 6M, glicerol al 29.3%, SDS 2%, azul de bromofenol al 0.002% y 125 mg de iodacetamida). Posteriormente, las tiras se colocaron sobre geles de gradiente NuPage 4-12% y se cubrieron con agarosa al 0.5%. Se colocó el marcador de peso molecular con rango de 209 a 7 kDa (Prestained Broad Range de Bio-Rad) y se realizó la separación de las proteínas en doble dimensión a 200 Volts durante 45 min. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie al 0.06% durante 90 min con agitación constante y se destiñeron con una solución de metanol al 50%, ácido acético al 10% hasta la visualización de los spots.

5.9 Análisis comparativo de los mapas proteómicos con el programa PD Quest.

Los mapas proteómicos obtenidos se compararon con el software PD Quest v8.0.1 (Bio-Rad). Se creó un gel maestro a partir de las dos réplicas de las muestras control y tratadas con el bencimidazol. Mediante este análisis se estimó el número de puntos, el peso molecular, el pI y la intensidad en pixeles de las proteínas, seleccionando aquellos puntos que presentaron

expresión diferencial respecto al control. Para la identificación de las proteínas de interés, los spots se mandaron a secuenciar por LC/MS/MS a la Universidad Complutense de Madrid, España. Mientras se obtiene la identificación de las proteínas con expresión diferencial y con el objetivo de obtener una aproximación de qué proteínas se pudiera tratar, se realizó la comparación visual de los mapas proteómicos con el proteoma reportado por Tolstrup. (2007). Se comparó el peso molecular, el pI y la abundancia relativa de cada proteína.

5.10 Ensayo de eritrofagocitosis

La eritrofagocitosis se realizó mediante la evaluación microscópica del número de eritrocitos ingeridos por los trofozoítos, y mediante la determinación espectrofotométrica de la hemoglobina contenida dentro de los trofozoítos. Para el primer experimento se incubaron 1×10^4 trofozoítos con **Alfa** (0.023-1 μ g/mL) durante 48 h a 37°C en placas de cultivo de 96 pozos. Posteriormente, se descartó el medio de cultivo y agregó medio nuevo sin suero y con eritrocitos humanos en proporción 1:100 (trofozoítos:eritrocitos), permitiéndole la interacción de los parásitos con los eritrocitos durante 10, 20 y 30 min. Al finalizar la interacción, se agregó agua destilada fría para despegar a los parásitos de los pozos y para lisar a los eritrocitos no ingeridos. Las muestras se centrifugaron por separado y se fijaron con glutaraldehído al 2.5% por 30 min. Para facilitar la visualización de los eritrocitos ingeridos, éstos se tiñeron mediante el método de Novikoff (1972), agregando 1mL de Tris-HCl 1M pH 9.8 con H₂O₂ al 0.001% v/v, y 3'3'-diaminobencidina (0.1mg/mL) durante 30 min. Se contó el número de eritrocitos fagocitados en

100 trofozoítos y se calculó el índice fagocítico (porcentaje de parásitos que habían ingerido eritrocitos multiplicado por el número promedio de eritrocitos ingeridos por amiba). Como controles se utilizaron trofozoítos incubados en DMSO al 0.1% por 48h, y con Citocalasina-D (CD) 10 μ M, agregada al inicio de los experimentos.

Para el ensayo espectrofotométrico, los parásitos tratados con **Alfa** e incubados con eritrocitos bajo las condiciones descritas previamente fueron centrifugados por separado. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 100 μ l ácido fórmico concentrado para lisar a los trofozoítos. Se determinó la D.O. a 405 nm en un espectrofotómetro para microplacas. Los experimentos se realizaron 2 veces por triplicado y se realizó una prueba de ANOVA ($P < 0.001$) con el programa GraphPad Prism para determinar diferencias significativas entre los tratamientos. Los resultados fueron expresados como promedio \pm DS.

6. RESULTADOS

6.1 Actividad amebicida del compuesto Alfa y MTZ.

En el cuadro 4 se muestra la actividad amebicida de **Alfa** contra los trofozoítos de *E. histolytica* pre-incubados durante 48h a diferentes concentraciones del compuesto. Como control positivo, se empleó MTZ a la misma concentración. El compuesto **Alfa** fue ligeramente más potente (1.5 veces) que el MTZ.

Cuadro 4. Actividad amebicida del compuesto Alfa y MTZ			
Compuesto	CI₅₀ (µg/mL)*	Promedio CI₅₀ (µg/mL)	Intervalo de confianza
Alfa	0.024	0.023	0.021-0.024
	0.022		
MTZ	0.040	0.036	0.032-0.041
	0.032		

*dos ensayos por triplicado

6.2 Obtención de ES de parásitos tratados y no tratados con Alfa

Las proteínas fueron obtenidas mediante lisis de las amibas tratadas y no tratadas con **Alfa** y su concentración se obtuvo mediante cuantificación con el kit 2D-Quant. Los resultados se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Concentración de proteínas de las muestras	
Muestra	Concentración de proteínas (µg/µL)
Control	6.65
Alfa	6.71

6.3 Análisis electroforético de los extractos obtenidos de parásitos control y tratados con Alfa y reconocimiento de actina por el anticuerpo C4.

Para verificar la integridad de los ES, se tomaron 30µg de cada muestra y se corrieron en geles de gradiente de 4 a 12% en condiciones reductoras. De manera general, se puede apreciar la integridad de las muestras (Fig. 12A).

Con el objetivo de realizar un análisis cuantitativo de las bandas de ambos ES, se realizó un análisis densitométrico con el programa Quantity One, el cual reveló la presencia de aproximadamente 21 bandas tanto en los extractos tratados como no tratados con **Alfa**. Como se muestra en la figura 12B, a cada banda se le determinó su intensidad en pixeles (eje vertical) y su peso molecular aproximado.

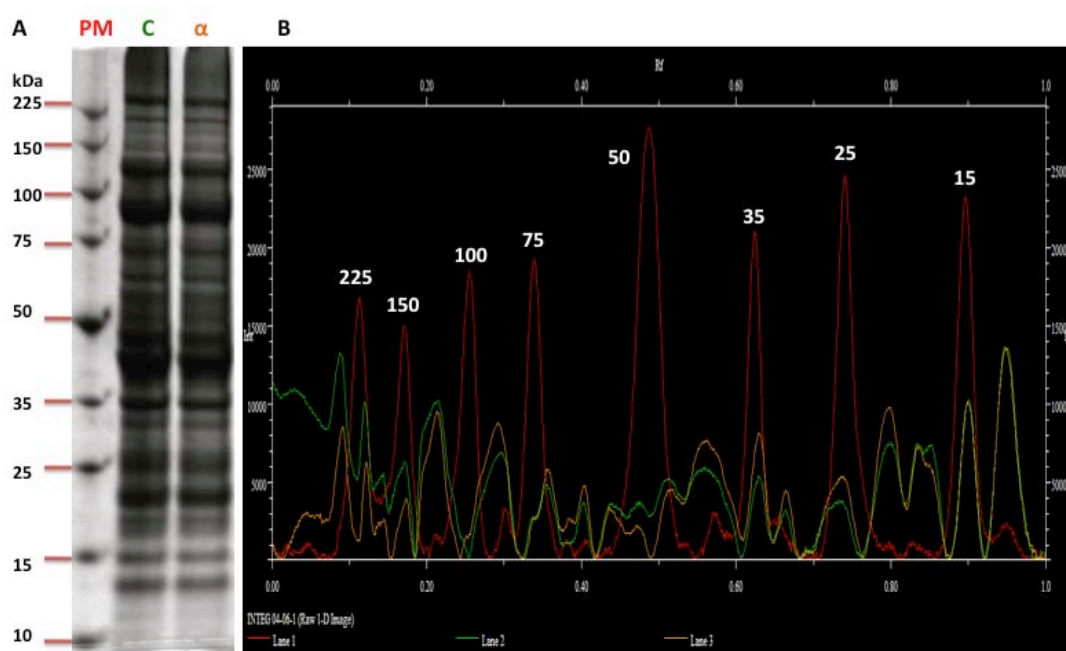


Figura 12. Perfiles electroforéticos de los ES de trofozoítos tratados y no tratados con el compuesto Alfa. A) La tinción con azul de Coomassie reveló la integridad de las proteínas. B) El análisis densitométrico muestra que la cantidad de proteína corrida en ambas muestras fue muy similar. (Rojo: marcador de peso molecular con los valores indicados en kDa, verde: **ES** control, naranja: **ES** tratado con **Alfa** (1µg/mL).

El efecto de **Alfa** sobre la actina de los trofozoítos de la amiba se analizó en 1D mediante Western Blot con el anticuerpo C4 que reconoce actina. En la figura 13A se muestra el reconocimiento de actina en los ES de los parásitos control y tratados con **Alfa**. Con el fin de tener datos cuantitativos del reconocimiento del anticuerpo en ambos ES, se realizó el análisis cuantitativo con el programa Quantity One. En ambos extractos el anticuerpo C4

reconoció una banda con un peso aproximado de 45 kDa, siendo más intensa en la muestra tratada con **Alfa** (Fig 13B). C4 también reconoció a la actina purificada de músculo de conejo. No hubo diferencias significativas entre el extracto control y **Alfa**.

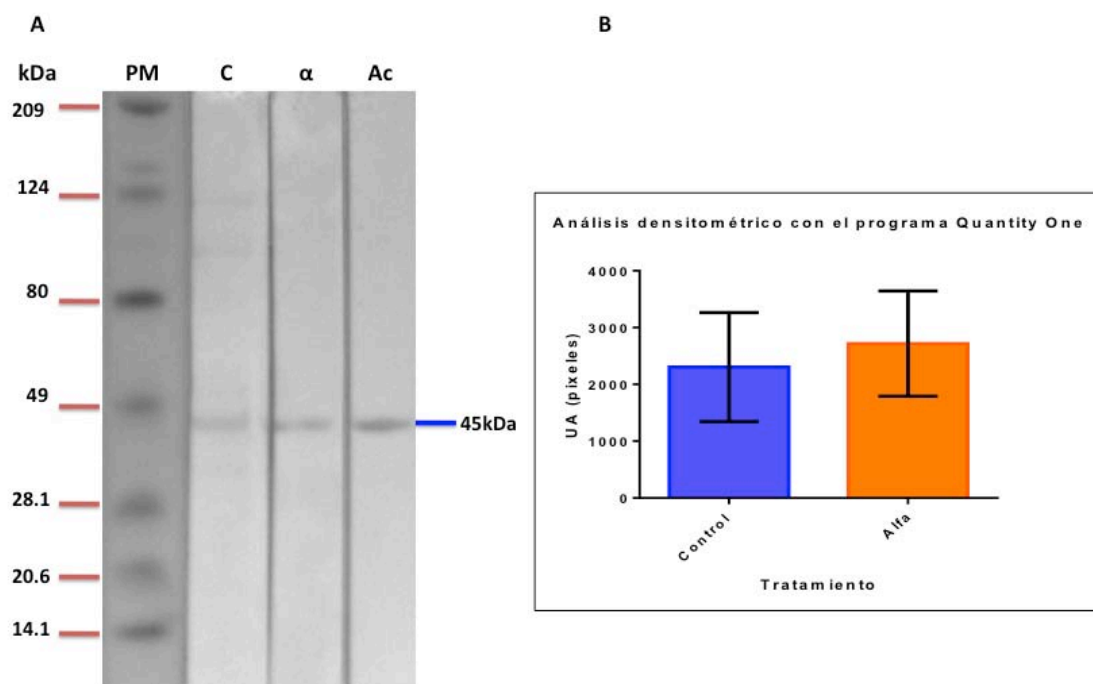


Figura 13. A) Reconocimiento de actina en **ES** de trofozoítos control (**C**), tratados con **Alfa** (α) y control de actina de músculo de conejo purificada (**Ac**). En ambos **ES** el anticuerpo C4 reconoció una banda con un peso aproximado de 45 kDa, siendo más intensa en la muestra tratada con **Alfa**. **B)** Análisis densitométrico donde se muestra el promedio de pixeles de dos muestras independientes. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar (DS) de dos experimentos independientes.

6.4 Análisis en 2D del efecto de Alfa sobre isoformas de actina de *E. histolytica*.

Para analizar el efecto del compuesto **Alfa** sobre las isoactinas del parásito se realizó una inmunoelectrorransferencia 2D de los ES con y sin tratamiento, empleando el anticuerpo monoclonal C4. En la figura 14 se aprecia que el anticuerpo C4 reconoció 4 spots con pI entre 5.6-6.0 y un peso molecular aproximado de 45 kDa, que corresponden a isoformas de la actina de la ameba. Como se aprecia en la figura 14B, se presentó una mayor

reconocimiento del anticuerpo C4 por las isoactinas de los parásitos tratados con el compuesto. El análisis densitométrico se presenta en la figura 14C, el análisis estadístico reveló que no existe una diferencia estadísticamente significativa en el reconocimiento de las isoformas de actina por C4 del control y del tratado con **Alfa**.

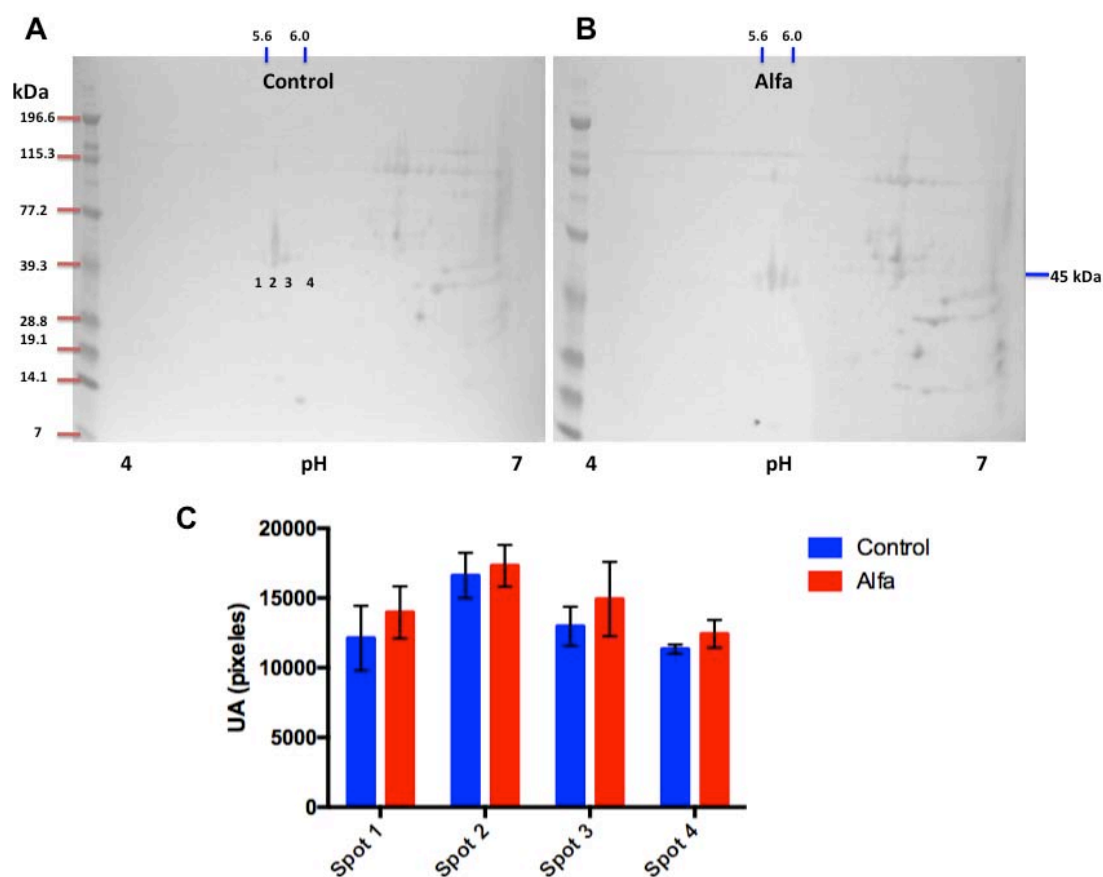


Figura 14. Reconocimiento de isoactinas en **ES** control (A) y **Alfa** (B) por el anticuerpo C4. Se utilizaron 100 μ g de proteína separada por su *pI* y su peso molecular bajo las mismas condiciones que los proteomas de trofozoítos. **C)** Análisis densitométrico de los spots reconocidos por el anticuerpo C4.

6.5 Análisis Proteómico 2D de las proteínas contenidas en los ES de trofozoítos con o sin tratamiento.

En la figura 15 se muestra una réplica biológica de las proteínas de trofozoítos con o sin tratamiento. El análisis se realizó con la misma cantidad de proteína para ambas muestras. Se puede observar que hubo una buena

separación de los spots según muestra la tinción con azul de Coomassie G-250. El análisis realizado con el programa PDQuest señala la presencia 111 spots en el ES de los parásitos control, y de 112 en los parásitos tratados con **Alfa**. Se detectaron 9 spots que presentaban una expresión diferencial respecto al control, de éstos 6 tuvieron un incremento en su expresión y 3 un decremento. Para la identificación de las proteínas con expresión diferencial, los geles se enviaron a la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, España. Sin embargo, con el objetivo de inferir la identidad de los spots de interés presentes en los geles 2D-PAGE se utilizó como referencia el mapa proteómico obtenido por Tolstrup (2007). Los autores realizaron la separación de las proteínas en condiciones similares a las utilizadas en este trabajo (Fig. 16). La comparación se realizó con base en el peso molecular, pI y abundancia relativa de cada proteína. Bajo estos criterios se llegó a la probable identificación de 18 proteínas, incluidas las isoactinas del parásito. Además se identificaron 2 proteínas que presentaron cambios en su expresión debido al tratamiento con el compuesto **Alfa**. Una de ellas, la fosfofructocinasa (spot 1), participa en el metabolismo energético del parásito, mientras que la proteína restante, la subunidad beta de una proteína de unión a GTP (spot 9), participa en procesos de señalización intracelular (Bosch y Siderovsky, 2013; Saavedra *et al.*, 2005) (cuadro 6).

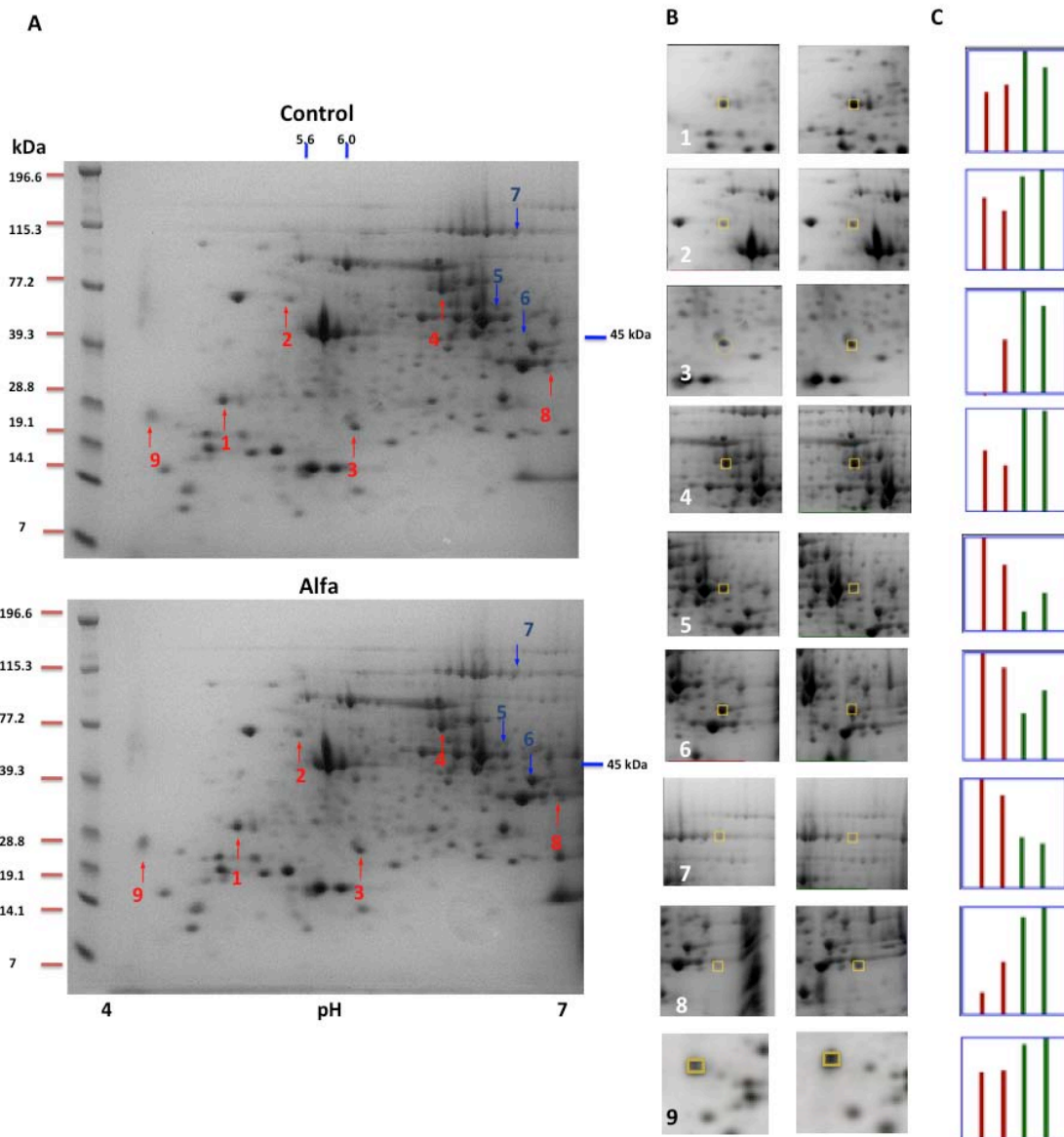


Figura 15. A) Proteomas de los trofozoítos de *E. histolytica* tratados y no tratados con compuesto **Alfa** a $1\mu\text{g/mL}$. Se observa la expresión diferencial de diferentes proteínas con respecto al control sin tratamiento. Se señalan con azul aquellas proteínas que disminuyeron su expresión, y con rojo aquellas que aumentaron. **B)** Aumento de los 9 spots señalados en **A**, con los controles a la izquierda, y el tratamiento con **Alfa** a la derecha. **C)** Análisis densitométrico de los spots seleccionados en cada condición, se indica en rojo la densitometría de los spots del **ES** control y en verde la correspondiente al tratamiento con **Alfa**. Los experimentos se realizaron por duplicado (Rojo: control, Verde: Alfa a $1\mu\text{g/mL}$).

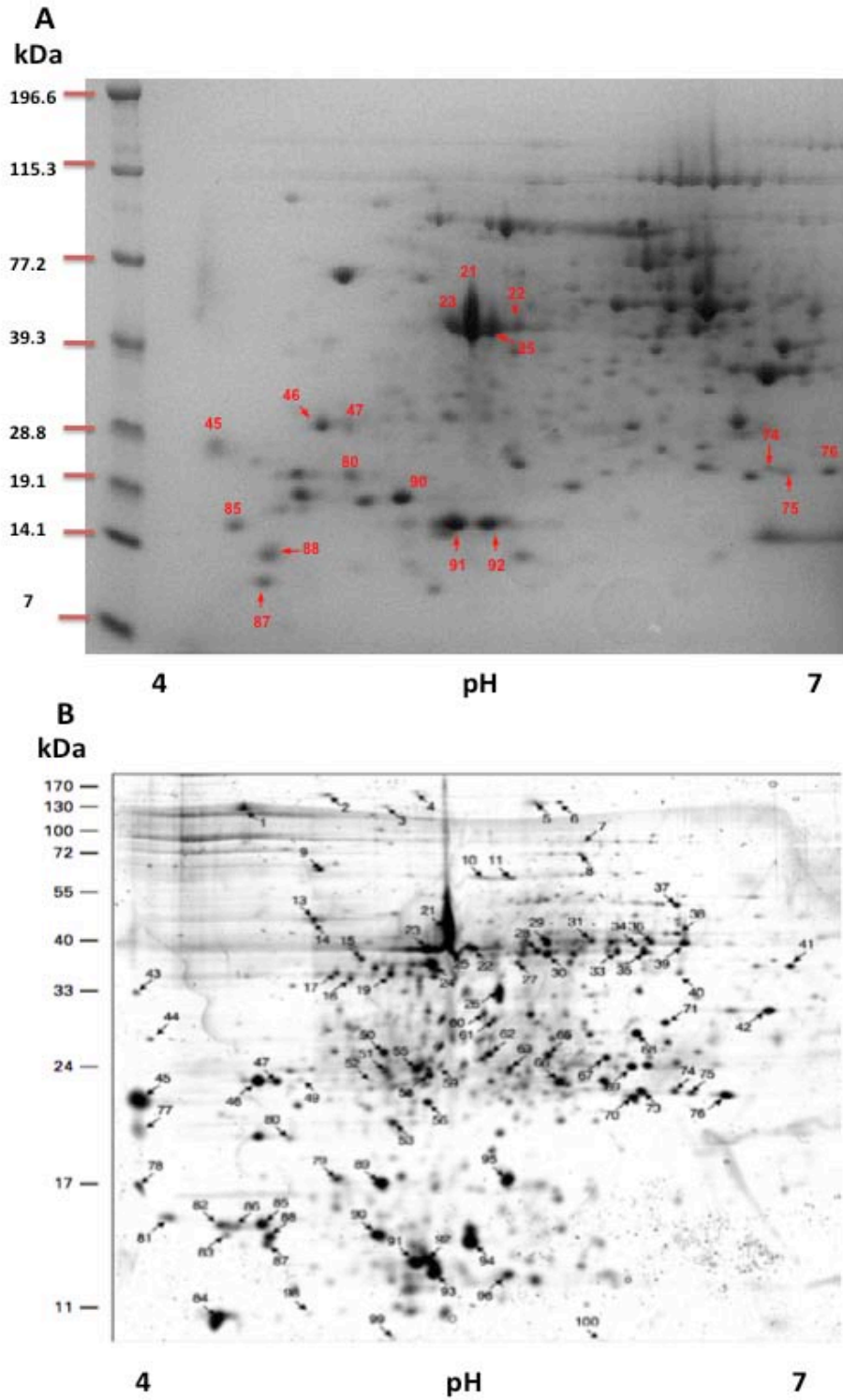


Figura 16. Comparación de los proteomas de *E. histolytica*. **A)** Proteoma del ES control donde se muestra en rojo la numeración asignada a cada spot. **B)** Mapa proteómico de Tolstrup y cols (2007), donde se muestra la numeración dada a cada punto. De manera general, se aprecia una similitud con el proteoma del ES control.

Cuadro 6. Lista de proteínas identificadas por comparación de mapas proteómicos					
Spot¹	Proteína	PM T/E(kDa)	pI/T/E	No. de acceso NCBI	Función
21	Actina	41.7/47	5.0/5.7	XP_656738	Citoesqueleto
22	Actina	41.7/42	5.0/5.7	XP_656738	
23	Actina	33.3/40	5.3/5.5	XP_656610	
25	Actina	42.0/39	5.2/5.8	XP_656738	
87	Cadena ligera de miosina	16.9/14	4.7/4.8	XP_657577	
90	Coactosin	16.1/15	5.0/5.3	XP_650926	
91	Factor de despolimerización de actina	15.2/13	5.4/5.5	XP_654122	
85	Motivo de dedo de zinc	45.4/16	8.5/4.9	XP_655068	
47	Proteína rica en leucina similar a BspA	19.7/24	5.0/5.9	XP_652259	Proteína de superficie
46	Fosfofructocinasa	47.7/23	6.9/4.7	XP_653373	Glucólisis
75	Piruvato cinasa	36.4/22	6.5/6.5	XP_649089	
79	Proteasa de cisteína 3	33.9/20	6.9/5.7	XP_653254	Proteólisis
76	GTPasa RabK1	24.4/22	5.0/6.6	XP_652298	Tráfico vesicular
53	GTPasa RabX28	21.7/21	5.6/5.4	XP_650164	
74	GTPasa RabX28	21.7/22	5.6/6.4	XP_650164	
45	Subunidad beta de proteína de unión a GTP	35.0/23	7.1/5.2	XP_657050	Señalización intracelular
80	Proteína 14-3-3	27.5/20	4.8/4.9	XP_654465	
92	Proteína ribosomal L27	15.8/13	10.4/5.5	XP_65438	Síntesis de proteínas

¹= de acuerdo a Tolstrup *et al.*, 2007. T=teórico, E=experimental.

6.6 Análisis del efecto de Alfa en la eritrofagocitosis del parásito.

Una característica de la virulencia de las amibas asociado al citoesqueleto de actina es la eritrofagocitosis. Por ello, se evaluó el efecto del compuesto **Alfa** en la capacidad fagocítica de los parásitos a los 10, 20 y 30 min. En la figura 17 se presentan algunas imágenes tomadas de la eritrofagocitosis por los parásitos tratados con **Alfa** a las concentraciones 0.023, 0.5 y 1 $\mu\text{g/mL}$, control positivo y parásitos tratados con CD. El examen con el microscopio óptico mostró de 1 a 4 eritrocitos en el citoplasma de los parásitos tratados con CD, y de 6 a más de 20 en los parásitos tratados con DMSO y **Alfa**.

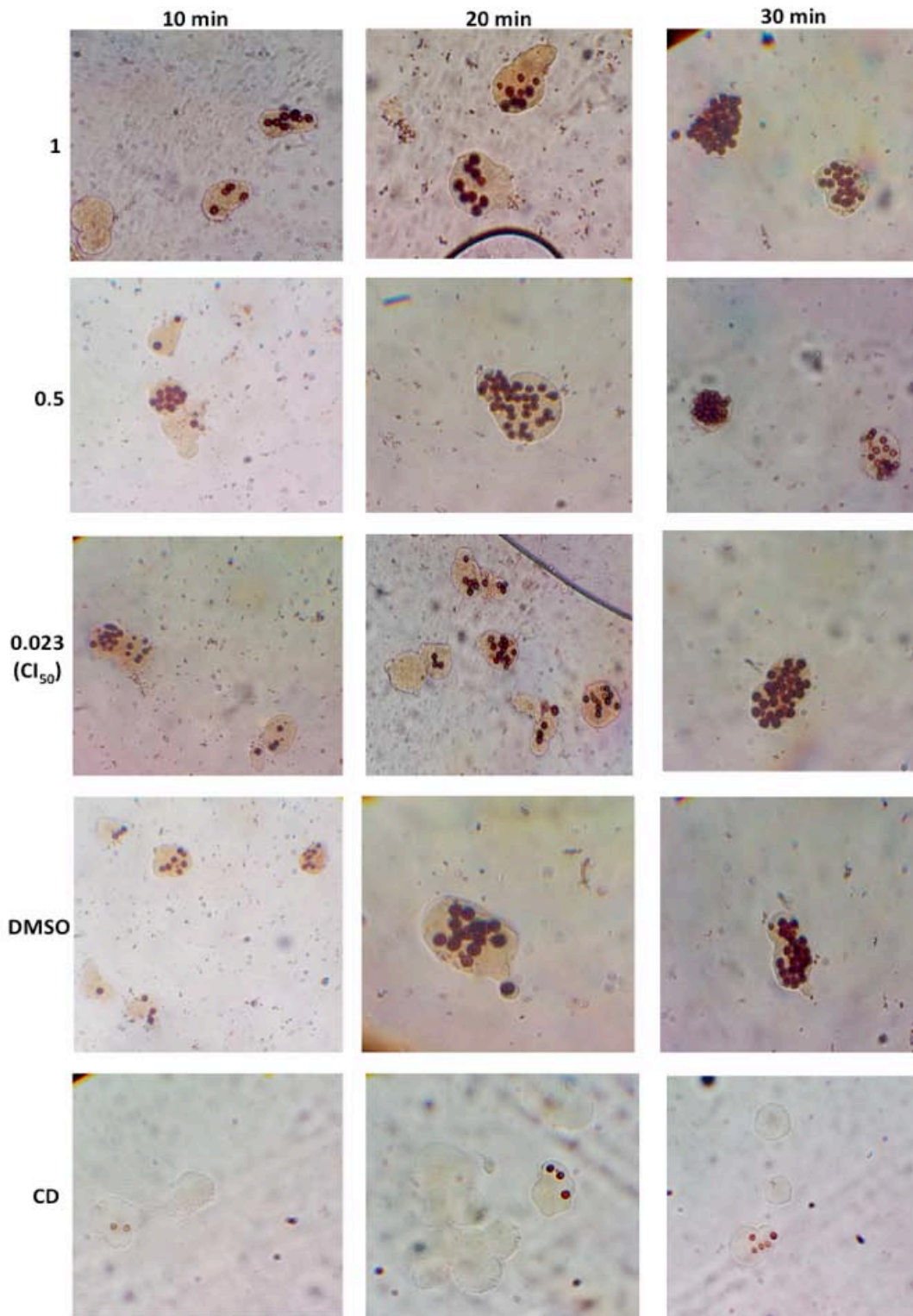


Figura 17 Imágenes representativas de los ensayos de eritrofagocitosis. Se muestran los eritrocitos fagocitados a los 10, 20 y 30 min. de interacción con trofozoítos pre-incubados 48h con Alfa a concentraciones de 0.023 – 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como controles se emplearon trofozoítos cultivados en medio TYI-S-33 con DMSO al 0.1% y citocalasina-D (CD) 10 μM agregada al inicio de los experimentos. Se realizaron dos ensayos independientes por triplicado.

En la Figura 18A se presentan graficados los índices fagocíticos calculados para los parásitos tratados con **Alfa** a las diferentes concentraciones, control positivo y CD. Como se puede apreciar, el índice fagocítico aumentó con el tiempo, sin embargo no se observan diferencias significativas entre el control y los parásitos tratados a las diferentes concentraciones. Por otro lado, el índice fagocítico de los parásitos tratados con CD si fue significativamente diferente con respecto al control ($P \leq 0.001$).

Para corroborar los resultados obtenidos por conteo directo, se realizó la medición espectrofotométrica de la hemoglobina internalizada por las amibas a los tiempos de interacción mencionados. Como se observa en la figura 18B, los valores de absorbancia a 405 nm se incrementaron en todos los tratamientos con **Alfa** y en el control positivo conforme el tiempo de observación aumentó, sin mostrar diferencias significativas entre éstos grupos ($P \geq 0.001$). Sólo el control negativo con CD mantuvo valores de absorbancia constantes, sin incrementos notables de la D.O. en función del tiempo, estadísticamente diferente con respecto al control ($P \leq 0.001$).

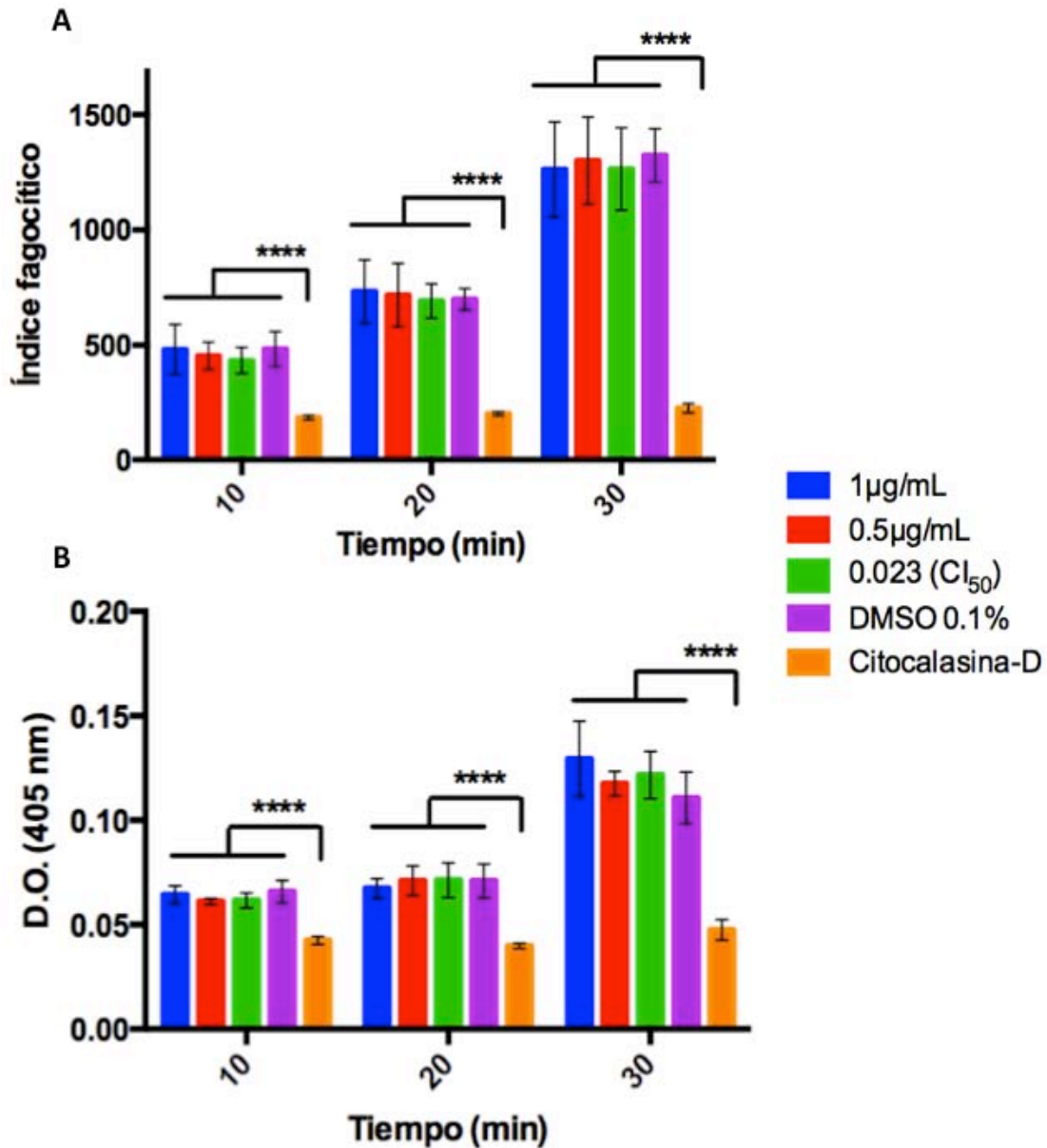


Figura 18. A) capacidad fagocítica. Trofozoítos previamente tratados con **Alfa** a concentraciones de 0.023-1µg/mL fueron incubados con eritrocitos humanos por 10, 20 y 30 minutos y se analizaron con un microscopio óptico a 40x. Se calculó el índice fagocítico para cada condición. **B)** cuantificación espectrofotométrica de la hemoglobina internalizada por los trofozoítos. Los parásitos fueron lisados con ácido fórmico, se determinó su absorbancia a 405 nm. En todos los experimentos se incluyeron parásitos tratados con DMSO al 0.1% y **CD** 10µM como controles positivo y negativo, respectivamente. Los experimentos se realizaron dos veces por triplicado y los resultados fueron expresados como promedio ± DS

7. DISCUSIÓN

La amibiasis continúa siendo un problema de salud pública y en su tratamiento se emplea al MTZ, fármaco que se ha usado desde hace más de cuarenta años durante los cuales se ha reportado falla terapéutica, efectos

secundarios severos, y la obtención *in vitro* de cepas de *E. histolytica* resistentes al MTZ (Bansal *et al.*, 2006). Lo anterior refleja la necesidad de buscar nuevos fármacos para el control de esta enfermedad. Nuestro grupo de investigación diseñó y sintetizó con anterioridad el derivado bencimidazólico **Alfa**, el cual presentó actividad *in vitro* e *in vivo* contra *F. hepatica*, afectando a las espinas del tremátodo que son ricas en actina (Stitt, 1992). Considerando que el citoesqueleto de actina de la amiba participa de manera importante en la patogenia de la enfermedad, en este estudio se investigó la actividad de **Alfa** contra *E. histolytica* y su efecto sobre la actina del parásito.

Los resultados obtenidos demuestran que el compuesto **Alfa** tuvo actividad amebicida *in vitro*, siendo 1.5 veces más activo que el MTZ. Estudios de diseño *in silico* de compuestos amebicidas mostraron que la molécula de **Alfa** cumple con los requerimientos estructurales necesarios para presentar actividad amebicida como es la presencia de un grupo funcional grande en la posición 5/6, y un grupo funcional no carbamato con baja densidad electrónica en la posición 2 del anillo bencimidazólico, que en el caso de **Alfa** corresponde a un grupo metiltio (López-Vallejo *et al.*, 2007). La citotoxicidad de **Alfa** en líneas celulares no fue evaluada en este estudio, sin embargo, el compuesto tuvo en borregos una dosis máxima tolerada 15 veces más alta que la dosis efectiva (Vera *et al.*, 2006).

Con el interés de analizar el efecto de **Alfa** sobre la actina de *E. histolytica*, ES de parásitos tratados con **Alfa** (1 µg/mL) se analizaron mediante Western blot 1D y 2D empleando el anticuerpo monoclonal C4 que reconoce

específicamente actina. Los ES obtenidos de parásitos no tratados y tratados con **Alfa** se obtuvieron a una buena concentración y con alto grado de integridad. El análisis densitométrico de los geles 1D y 2D muestra que la cantidad de proteína empleada fue muy similar para ambas muestras, por lo que las diferencias observadas en los ensayos son atribuibles al tratamiento con **Alfa** y no a diferencias en la cantidad de proteína utilizada.

En el ensayo por Western blot 1D, C4 reconoció en los ES del control y de los parásitos tratados con **Alfa**, bandas de 45 kDa que coinciden con el peso molecular reportado previamente para la actina de la amiba (Meza *et al*, 1982). Además, se detectó un incremento en el reconocimiento de la actina de los parásitos tratados con **Alfa**, aunque este no fue significativamente diferente con respecto al control. Este incremento en el reconocimiento de actina también se observó en el Western blot 2D, donde C4 reconoció 4 isoactinas con pesos moleculares de 45 kDa y pI entre 5.6 y 6.0. Cabe mencionar que bajo las condiciones experimentales de este trabajo se encontraron cuatro isoformas de actina, a diferencia de lo reportado en estudios previos donde se observa la expresión de solo dos isoactinas cuando las amibas son cultivadas en superficies de vidrio (Ríos *et al.*, 2008). Lo anterior sugiere la existencia de estímulos y/o mecanismos de regulación que inducen la expresión de isoactinas en este parásito. Se ha reportado en la literatura que algunos componentes del suero son capaces de inducir rápidamente la formación de estructuras ricas en actina, lo que podría explicar la presencia de más isoactinas cuando las amibas se adhieren a vidrio (Nobes y Hall, 1995; Talamás y Meza, 1988). El uso de anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra cada una de las isoactinas, o

bien, la obtención de las mismas y su secuenciación, serán herramientas necesarias para identificar las isoformas presentes en el parásito o bien, determinar si las diferencias en el pI de las isoactinas encontradas se debe a modificaciones post-traduccionales.

En el análisis del efecto de **Alfa** en la actina del parásito mediante Western blot 1D y 2D, se observó un ligero incremento en la expresión de la proteína, sin significancia estadística con respecto al control. Es importante mencionar en este punto, que en el análisis proteómico no se detectó un aumento en la expresión de la actina. Lo anterior pudiera deberse a pequeñas diferencias en la cantidad de anticuerpo C4 agregado a los blots de parásitos tratados o a diferencias en el tiempo de revelado.

Por otro lado, con la finalidad de conocer el mecanismo de acción del compuesto **Alfa**, se realizó el análisis proteómico de parásitos tratados con el compuesto. Los mapas proteómicos obtenidos de los parásitos con y sin tratamiento, mostraron que para ambas condiciones, la separación bidimensional fue buena, y es posible visualizar con claridad todos los spots. Se detectó la expresión diferencial de 9 proteínas en el ES de parásitos tratados con respecto al control; de éstas, 6 tuvieron un incremento en su expresión y 3 más un decremento. Ninguna de las proteínas con expresión diferencial corresponde por PM y pI a la actina. La secuenciación e identificación de estas proteínas con expresión diferencial está llevándose a cabo. Es importante mencionar, que el compuesto **Alfa** podría estar afectando proteínas de baja abundancia imposibles de detectar mediante la tinción con azul de Coomassie, por lo que el futuro podrían emplearse

colorantes como plata o Sypro Ruby que pueden detectar proteínas en el orden de nanogramos (Barret *et al.*, 2004).

Mientras tanto, con el objetivo de darnos una idea de qué proteínas se expresaron diferencialmente, se realizó la comparación visual con el proteoma obtenido por Tolstrup y cols. (2007), empleando condiciones similares a las de este trabajo. Los proteomas son semejantes, y se logró en el proteoma reportado por Tolstrup y cols. (2007) la identificación de dos proteínas que en el proteoma de los parásitos tratados con **Alfa** tuvieron un incremento en su expresión: la fosfofructocinasa (spot 1) y la subunidad β de una proteína de unión a GTP (spot 9).

La confirmación de la identidad de estas 2 proteínas, es de gran importancia, dado que la fosfofructocinasa participa en la glucólisis catalizando la fosforilación de glucosa-6-fosfato para formar fructosa 1,6-bisfosfato y difiere con su equivalente en mamíferos, por lo que se considera un blanco terapéutico (Saavedra *et al.*, 2005). Por otra parte, la subunidad β de la proteína de unión a GTP forma parte de las proteína G triméricas asociadas a membrana cuya función principal es la transmisión de señales intracelulares a partir de GPCR (Lodish *et al.*, 2013). El aumento en los niveles de esta proteína inducido por **Alfa** puede estar relacionado con el ligero aumento en la expresión de actina, ya que se sabe que las proteínas G juegan un papel importante en la regulación del citoesqueleto (Bosh y Siderovski, 2013). Mediante la secuenciación por LC/MS/MS de los spots de interés y posterior identificación se corroborará la identidad de las proteínas encontradas. Además, se identificaron otras 16 proteínas compartidas entre

los dos proteomas que participan en procesos de señalización, metabolismo energético, citoesqueleto, proteólisis, entre otros.

Por otra parte, en este estudio también se abordó el posible efecto del compuesto **Alfa** en el proceso de eritrofagocitosis, un rasgo virulento característico de la amibiasis invasiva, que depende de la integridad del citoesqueleto amibiano. Como se muestra en los resultados, el tratamiento con el derivado bencimidazólico a concentraciones de 0.023-1µg/mL no presentó diferencias significativas en la eritrofagocitosis de los trofozoítos en relación al control sin tratamiento. El análisis espectrofotométrico del contenido de hemoglobina resultó ser una técnica más sensible que permitió analizar las muestras tratadas como poblaciones totales, superando las variaciones individuales en el contenido de eritrocitos obtenidas en el conteo con microscopio óptico, con desviaciones estándar más bajas que las observadas en el cálculo del índice eritrofagocítico.

Los estudios de cambios ultraestructurales inducidos en *F. hepática* por **Alfa**, sugerían que el compuesto tenía efecto sobre la actina del parásito, sin embargo, en el caso de *E. histolytica* nuestros resultados muestran que **Alfa** no afecta al menos de manera importante la expresión de la actina. Debido a que la secuencia de la actina de *F. hepatica* no ha sido reportada, no fue posible realizar el alineamiento de las secuencias de actina correspondientes para determinar su porcentaje de identidad.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demuestran que el efecto amebicida del compuesto **Alfa** no está relacionado directamente con la actina. La secuenciación e identificación de las proteínas de la muestra

tratada con **Alfa** que mostraron expresión diferencial permitirá determinar el mecanismo de acción de **Alfa**.

8. CONCLUSIONES

- El compuesto **Alfa** presentó actividad amebicida ($CI_{50} = 0.023\mu\text{g/mL}$) superior a la del metronidazol ($CI_{50} = 0.036\mu\text{g/mL}$).
- El tratamiento con **Alfa** ($1\mu\text{g/mL}$) indujo un aumento no significativo en el reconocimiento de las 4 isoactinas por el anticuerpo C4.
- El tratamiento con el compuesto **Alfa** ($1\mu\text{g/mL}$) indujo la expresión diferencial de 9 proteínas en relación a los parásitos sin tratamiento.
- El tratamiento de *E. histolytica* con el compuesto **Alfa** ($1\mu\text{g/mL}$) no inhibió la eritrofagocitosis de *E. histolytica*.
- El efecto amebicida del compuesto **Alfa** no está relacionado directamente con la actina.

9. PERSPECTIVAS

- Espectrometría de masas para determinar la identidad de las proteínas afectadas en su expresión por el tratamiento con el compuesto **Alfa**.
- Estudios *in silico* para determinar la posible unión del compuesto **Alfa** a las proteínas afectadas en su expresión.

10. LITERATURA CITADA

- Adagu IS, Nolder D, Warhurst DC, Rossignol JF. 2002. *In vitro* activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 49: 103-111.
- Addario B, Hunag S, Sauer UH, Backman B. 2011. Crystalization and preliminary X-ray analysis of the *Entamoeba histolytica* α -actinin 2 rod domain. Acta Crystallographica Section F. 67:1214-1217.
- Aguilar-Díaz JH, Díaz-Gallardo M, Laclette JP, Carrero JC. 2010. *In vitro* induction of *Entamoeba histolytica* Cyst-like Structures from Trophozoites. PLoS Neglected Tropical Diseases. 4(2):1-9.
- Aguilar-Díaz JH, Carrero JC, Argüello-García R, Laclette JP, Morales-Montor J. 2011. Cyst and encystation in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies?. Trends in Parasitology. 27(10):450-458.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2010. Biología Molecular de la Célula. 5a Edición, Ediciones Omega, Barcelona.
- Alcántara-Vázquez A. 2008. Fisiopatología de la amibiasis. En Amibiasis en el siglo XXI. Sociedad Mexicana de Parasitología. México. pp 78-86.
- Apt W. 2013 Tratamiento y tablas terapéuticas. En *Parasitología Humana*. McGraw-Hill, México. pp 749-752.
- Astelbauer F, Walochnik J. 2011. Antiprotozoal compounds: state of the art and new developments. International Journal of Antimicrobial Agents 38(2):118-124.
- Arhets P, Gounon P, Sansonetti P, Guillén N. (1995). Myosin II is involved in capping and uroid formation in the human pathogen *Entamoeba histolytica*. Infection and Immunity 63(11): 4358.
- Azam A, Peerzada MN, Ahmad K. 2015. Parasitic diarrheal disease: drug development and targets. Frontiers in Microbiology. 6:1183.
- Baxt LA, Rastew E, Bracha R, Mirelman D, Singh U. 2010. Downregulation of an *Entamoeba histolytica* rhomboid protease reveals roles in regulating parasite adhesion and phagocytosis. Eukariotic Cell. 9(8): 1283-1293.
- Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Malla N, Mahajan RC. 2006. Multidrug resistance in amoebiasis patients. Indian Journal of Medical Research. 124:189-194
- Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Mahajan RC, Malla N. 2004. *In vitro* activity of antiamoebic drugs against isolates of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 21;3:27.
- Bailey GB, Day DB, Gasque JW. (1985). Rapid polymerization of *Entamoeba histolytica* actin induced by interaction with target cells. The Journal of Experimental Medicine. 162(2): 546-558.
- Barret J, Brophy PM, Hamilton JV. 2004. Analysing proteomic data. International Journal for Parasitology. 35:543-553.
- Becerril MA. 2011. Parasitología Médica, 5ta edición. McGraw-Hill Interamericana, México. pp 21-29.
- Binder M, Ortner S, Erben H, Scheiner O, Wiedermann G, Valenta R, Duchéne M. 1995. The basic isoform of profilin in the pathogenic *Entamoeba histolytica* cDNA cloning, heterologous expression, and actin-binding proteins. European Journal of Biochemistry. 233:976-981
- Bogitsh J. (1998). Human Parasitology. Academic Press, Atlanta, USA. pp. 61-71.
- Brusca G, Moore W, Shuster SM. 2016. Invertebrates. 3rd Edition. Sinauer Associates Inc, USA.

- Bruckner D. 1992. Amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 5(4): 356-369.
- Caballero-Salcedo A, Viveron-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepúlveda-Amor J, Gutierrez G, Ortiz-Ortiz L. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in México. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 50: 412-419.
- Cedillo-Rivera R, Chávez M, Gonzalez-Robles A, Tapia A, Yépez-Mulia L. 2002. *In vitro* Effect of Nitazoxanide Against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Journal of Eukariotic Microbiology*. 49(3): 201-208.
- Chávez-Munguía B, Espinoza-Castellano M, Castañón G, Martínez-Palomo A. 2000. Ultrastructure Evidence of Smooth Endoplasmic Reticulum and Golgi-Like Elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Archives of Medical Research*. 31 S165-167.
- Christy NCV, Petri WA Jr. 2011. Mechanisms of adherence, cytotoxicity and phagocytosis modulate the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiology*. 6(12):1501-19.
- Clark CG, Alsmark UCM, Tazreiter M, Saito-Nakano Y et al. 2007. Structure and Content of the *Entamoeba histolytica* Genome. *Advances in Parasitology* 65: 51-190.
- Cunningham CC, Gorlin JB, Kwiatkowski D, Hartwig J, Janney P, Stossel T. 1992. Requirement for actin-binding proteins for cortical stability and efficient locomotion. *Science*. 255:325-327.
- Czekanska EM. 2011. Assessment of cell proliferation with Resazurin-based fluorescent dye. *Mammalian Cell Viability Methods and Protocols*. 740:27-32
- Dolabella SS, Serrano-Luna J, Navarro-García F, Cerritos R, Ximénez C, Galván Mayorquí G, Silva EF, Tsutsumi V, Shibayama M. 2012. Amoebic liver abscess production by *Entamoeba dispar*. *Annals of Hepatology*. 11(1):107-117.
- Diamond LS, Clark CG. 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Shaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 40:340-344.
- Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. 1978. A new médium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 72(4): 431-432.
- Díaz-Chiger DL, Márquez-Navarro A, Noguera-Torres B, de la Luz León-Ávila G, Pérez-Villanueva J, Hernández-Campos A, et al. 2012 *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of some benzimidazole derivatives against two strains of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 122(1):108-112.
- Dobiás L, Cerná M, Rössner P. 1994. Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. *Mutation Research*. 317: 177-194.
- U, Meraz M, Rausser MA, Agabian S, Meza I. 1990. Characterization of an immuno-dominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Journal of Experimental Medicine*. 172(3):879-888.
- Duggal P, Haque R, Roy S, Mondal D, Sack RB, Farr BM, Beaty TH, Petri WA Jr. 2004. Influence of human leukocyte antigen class II alleles on susceptibility to *Entamoeba histolytica* infection in Bagladeshi children. *Journal of Infectious Diseases*. 189: 520-526.
- Edman U, Meraz MA., Rausser S, Agabian N, Meza I. 1990. Characterization of an immuno-dominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Experimental Medicine*. 172(3):879-888.
- Eichinger D. 2001. Encystation in parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology* 4(4):421-426.

- Eland IA, van Puijenbroeck EP, Sturkenboom MJ, Wilson JH, Stricker BH. 1999. Drug-associated acute pancreatitis: twenty-one years of spontaneous reporting in The Netherlands . The American Journal of Gastroenterology. 94:2417-2422.
- Elizondo G, Gonsebatt ME, Salzar AM, Lares I, Santiago P, Herrera J, Hong E, Ostrosky-Wegman P. 1996. Mutation Research. 370: 75-80.
- Faust DM, Guillén N. 2012. Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. Microbes and Infection. 14: 1428-1441.
- Fernández-Rivera N, Ibarra-Velarde F, Olazarán-Jenkins S, Vera-Montenegro Y, Castillo R, Hernández-Campos A. 2002. Efficacy of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylthio)-benzimidazole against different stages of *Fasciola hepatica* in Pelibuey sheep. Veterinaria México. 33(1): 55-61
- Franco-Barraza J, Zamudio-Meza H, Franco E, del Carmen Dominguez-Robles M, Villegas-Sepúlveda N, Meza I. 2006. Rho signalling in *Entamoeba histolytica* modulates actomyosin-dependent activities stimulated during invasive behavior. Cell Motility and the Cytoskeleton. 63:117-131.
- Ghosh SK, Samuelson J. (1996). Involvement of p21racA, phosphoinositide 3-kinase, and vacuolar ATPase in phagocytosis of bacteria and erythrocytes by *Entamoeba histolytica*: suggestive evidence for coincidental evolution of amebic invasiveness. Infect Immun Gene. 173:205-208.
- Gilchrist CA, Petri SE., Schneider BN, Reichman DJ et al. 2015. Role of the gut microbiota of children in diarrhea due to the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The Journal of Infectious Diseases. 213(10):1579-1585.
- Gómez-Conde E, López-Robles MC, Hernández-Rivas R. Hernández-Jáuregui P, Vargas-Mejía M. 2000. Structural Organization of Gamma-Tubulin in the Microtubule Organizing Center (MTOC) During the Nuclear Division of *Entamoeba histolytica* Trophozoites. Archives of Medical Research 31:S205-206
- Guillén N. 1996. Role of signalling and cytoskeletal rearrangements in the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. Trends in Microbiology. 4(5): 191-197
- Guillén N, Boquet P, Sansonetti P. 1998. The small GTP-binding protein RacG regulates uroid formation in the protozoan *Entamoeba histolytica*. Journal of Cell Science.111:1729-1739
- Gurvinder S, Kaur M, Chander M. 2013 Benzimidazoles:the latest information on biological activities. International Journal of Pharmacy. 4:82-87
- Hall A. 1994. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. Annual Review of Cell Biology. 10:31-54.
- Haque R, Ali IKM, Akther S, Petri WA Jr. 1998 Comparison of PCR, Isoenzyme Analysis, and Antigen Detection for Diagnosis of *Entamoeba histolytica* Infection. Journal of Clinical Microbiology. 36(2): 449-452
- Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. (2003) Amebiasis. The New England Journal of Medicine. 348:1565-73.
- Hernández-Campos A. 2014 Síntesis y actividad biológica de análogos del triclabendazol. Tesis de Doctorado, Posgrado en Ciencias Químicas. UNAM. pp 32-40.
- Hon CC, Nakada-Tsukui K, Nozaki T, Guillen N. 2010. Dissecting the actin cytoskeleton from genomic perspective. En anaerobic parasitic protozoa. Caister Academic Press, Norwich. pp 81-118.
- Hou Y, Mortimer L, Chadee K. 2010 *Entamoeba histolytica* Cysteine Proteinase 5 Binds Integrin on Colonic Cells and Stimulates NFκB-mediated Pro-inflammatory Responses. The Journal of Biological Chemistry. 285(46): 35497-35504.

- Hung CC, Chang SY, Ji DD. 2012. *Entamoeba histolytica* infection in men who have sex with men. *The Lancet Infectious Diseases*. 12:729-736.
- Huston CD, Boettner DR, Miller-Sims V, Petri WA. 2003. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*. 71(2): 964-972.
- Ibarra VF, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. 1997. Eficacia fasciolicida del compuesto "alfa" contra estadios juveniles y adultos en ovinos. *Veterinaria México*. 28(4): 297-301.
- Ibarra VF, Vera MY, Quiroz H, Cantó J, Castillo R, Hernández A, Ochoa P. 2004 Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in naturally and experimentally infected cattle. *Veterinary Parasitology*. 120:65-74.
- Jaumouillé V, Grinstein S. 2011. Receptor mobility, the cytoskeleton, and particle binding during phagocytosis. *Current Opinion in Cell Biology*. 23(1): 22-29
- Labryère E, Guillén N. 2006. Host Tissue Invasion by *Entamoeba histolytica* Is Powered by Motility and Phagocytosis. *Archives of Medical Research*. 37: 253-258.
- Lacey E. 1990. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*. 6(4):112-115
- Laemmli, UK. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-685.
- Leippe M, Bruhn H, Hecht O, Grötzinger J. 2005. Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. *Trends in Parasitology*. 21(1):5-7.
- Leippe M, Ebel S, Schoenberger OL, Horstmann RD, Muller-Eberhard HJ. 1991 Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 88:7659-7663.
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A, Scott MP. 2013. *Molecular Cell Biology*. 7th Edition. WH Freeman and Company. New York USA.
- Löfmark S, Edlund C, Nord CE. 2010. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clinical Infectious Diseases*. 50:S16-23.
- López-Contreras L, Hernandez-Ramirez VI, Lagunes-Guillén AE, Montaña Sarita, Chávez-Munguía B, Sanchez-Ramírez B, Talamás-Rohana P. 2013 Exploring the Possible Role of Lysine Acetylation on *Entamoeba histolytica* Virulence: A focus on the Dynamics of Actin Cytoskeleton. *VioMed Research International*. 2013:757392.
- López-Vallejo F, Medina-Franco JL, Hernández-Campos A, Rodríguez Morales S, Yépez-Mulia L, Cedillo R, Castillo R. 2007. Molecular modeling of some 1*H*-benzimidazole derivatives with biological activity against *Entamoeba histolytica*: A comparative molecular field analysis study. *Bioorganic & Medical Chemistry* 15:1117-1126.
- Luna-Nácar M, Navarrete Perea J, Moguel B, Bobes RJ, Laclette JP, Carrero CC. 2016. Proteomic study of *Entamoeba histolytica* trophozoites, cyst and cyst-like structures. *PLoS ONE*. 11(5).
- Majumder S, Lohia A. 2008. *Entamoeba histolytica* encodes unique formins, a subset of which regulates DNA content and cell division. *Infection and Immunity*. 76(6):2368-2378
- Manning-Cela R, Meza I. 1997. Up regulation of actin mRNA and reorganization of the cytoskeleton in *Entamoeba histolytica*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 44(1):18-24.
- Marie C, Petri WA Jr. 2014 Regulation of Virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annual Review of Microbiology*. 68: 493-520.
- Marion S, Laurent C, Guillén N. 2005. Signalization and cytoskeleton activity

- through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cell Microbiology*. 7(10):1504-1518.
- Marion S, Wilhelm C, Voigt H, Bacri JC, Guillén N. 2004. Overexpression of myosin IB in living *Entamoeba histolytica* enhances cytoplasm viscosity and reduces phagocytosis. *Journal of Cell Science*. 117:3271-3279
 - Martínez-Palomo A. 1988. Biology of amebiasis: progress and perspectives. En *The Biology of Parasitism*. Englund PT, Sher A. (Editores). Alan L. Liss. New York. pp. 61-76.
 - Martínez-Palomo A. 1993. Parasitic amebas of the intestinal tract. En *Parasitic Protozoa*. Academic Press, New York, USA. pp 65-141.
 - McCoy JJ, Mann BJ, Petri WA Jr. 1994. Adherence and Cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or How Lectins Let Parasite Stick Around. *Infection and Immunity*. 62(8): 3045-3050.
 - Menéndez D, Bendesky A, Rojas E, Salamanca F, Ostrosky-Wegman P. 2002. Role of p53 function in the genotoxicity of metronidazole and its hydroxi metabolite. *Mutation Research*. 501:57-67.
 - Meza I. 2000. Extracellular matrix-induced signaling in *Entamoeba histolytica*: its role in invasiveness. *Parasitology Today*. 16(1): 23-28
 - Meza I, Sabanero M, Cazares F, Bryan J. 1982. Isolation and Characterization of Actin from *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Biological Chemistry*. 285 (6): 3936-3941.
 - Meza I, Talamás-Rohana P, Vargas MA. 2006. The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: Structure, Function, and Regulation by Signaling Pathways. *Archives of Medical Research*. 37: 234-243.
 - Mitchinson TJ, Cramer LP. 1996. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*. 84:371-379.
 - Moncada D, Keller K, Chadee K. 2005. *Entamoeba histolytica* secreted products degrade colonic mucin oligosaccharides. *Infection and Immunity*. 73(6): 3709-3793.
 - Mortimer L, Chadee K. 2010. The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology*. 126: 366-380.
 - Mortimer L, Moreau F, Cornick S, Chadee K. 2014 Gal-lectin independent contact activates the inflammasome by invasive *Entamoeba histolytica*. *Mucosal Immunology*. 7:829-841.
 - Mudry MD, Martínez-Flores I, Palermo AM. 2001 Embryo lethality induced by metronidazole (MTZ) in *Rattus norvegicus*. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 63: 186-192.
 - Nakada-Tsukui K, Nozaki T. 2016. Immune Response of Amebiasis and Immune Evasion by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Immunology*. 12;7:175.
 - Nakada-Tsukui K, Okada H, Mitra BN, Nozaki T. 2009. Phosphatidylinositol-phosphates mediate cytoskeletal reorganization during phagocytosis via a unique modular protein consisting of RhoGEF/DF and FYVE domains in the parasitic protozoa *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology*. 11(10): 1471-1491
 - Nakada-Tsukui K, Saito-Nakano Y, Ali V, Nozaki T. 2005. A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular Biology of the Cell*. 16(11):5294-303.
 - Nobes C, Hall A. 1995. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia. *Cell* 81:53-62.
 - Novikoff AB, Novikoff PM, Davis C, Quintana N. 1972. Studies on microperoxisomes II. *Cytochem*. 20(12):1006-1023.

- Olivos-García A, Saavedra E, Néquiz-Avendaño M, Pérez-Tamayo R. 2011. Amibiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM Marzo-Abril 2011;54(2):10-20
- Ostrosky-Wegman P, Asseff IL, Santiago P, Elizondo G, Montero R. 1994. Metronidazole hprt mutation induction in sheep and the relationship with its elimination rate. Mutation Research. 307:253-259.
- Padilla-Vaca F, Ankri S, Bracha R, Koole LA, Mirelman D. 1999. Down regulation of *Entamoeba histolytica* virulence by monoxenic cultivation with *Escherichia coli* 055 is related to a decrease in expression of the light (35-kilodaltons) subunit of the Gal/GalNAc lectin. Infection and Immunity. 65:2096-102.
- Pérez-Rodríguez M, Arellano J, López-Osuna M, Velásquez J, Granados J, Justiniani N. 1997. Increased frequency of HLA-DR3 and complotype SC01 in Mexican mestizo children with amebic abscess of the liver and summary of our overall HLA-SC01 experience in invasive amebiasis. Archives of Medical Research. 28. Supple:S245-S247.
- Petri WA Jr. 2002. Pathogenesis of amebiasis. Current Opinion in Microbiology. 5:443-447.
- Petri WA Jr, Haque R, Mann BJ. 2002. The bittersweet interface of the parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. Annual Review of Microbiology. 56:39-64.
- Picazzari K, Luna-Arias JP, Carrillo E, Orozco E, Rodríguez MA. 2005. *Entamoeba histolytica*: identification of EhGPCR-1, a novel putative G protein-coupled receptor that binds to EhRabB. Experimental Parasitology. 110(3):253-258.
- Radvin JI. 1988. Amebiasis: Human infection by *Entamoeba histolytica*. New York, USA. Wiley Medical Publication. pp 7-26.
- Radvin JI. 2000. Amebiasis. En *Series on Tropical Medicine: Science and Practice. Vol 2*. London. Imperial College Press.
- Radvin JI, Guerrant RL. 1981. Role of the adherence in cytopathogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. The Journal of Clinical Investigation. 68(5), 1305-1313.
- Raether W, Hanel H. 2003. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. Parasitology Research. 90:19-39.
- Ralston KS, Petri WA Jr. 2011. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. Trends in Parasitology. 27(6): 254-263.
- Ramakrishnan G, Petri WA Jr. 2000. Pathogenesis and Molecular Biology. En *Amebiasis, Series on Tropical Medicine: Science and Practice. Vol 2*. London. Imperial College Press. pp 90-112.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. 2011. Rang & Dale's Pharmacology. 7th Edition. Elsevier. USA.
- Rediguieri CF, Porta V, Nunes DS, Nunes TM, Junginger HE, Kopp S, Midna KK, Shah VP, Stavchansky S, Dressman JB, Barends DM. 2011. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: metronidazole. The Journal of Pharmaceutical Sciences. 100: 1618-1627.
- Ríos A, Hernández-Ramírez V, Moguel M, Zárate A, Rosales-Encina J, Vargas M, Talamás-Rohana P. 2008. Participation of Rho, ROCK-2 and GAP activities during actin microfilament rearrangements in *Entamoeba histolytica* induced by fibronectin signaling. Cell Biology International. 32:984-1000.
- Rivera N, Ibarra F, Zepeda A, Fortoul T, Hernández-Campos A, Castillo R, Cantó G. 2004. Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment *in vitro* and *in vivo* with an experimental fasciolicide.

- Parasitology Research. 93:283-286.
- Roberts LS, Janovy J. 2005. Foundations of Parasitology. 7th edition. McGraw-Hill. USA.
 - Robinson MW, McFerran N, Trudgett A, Hoey L, Fairweather I. 2004. A possible model of benzimidazole binding to β -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. Journal of Molecular Graphics and Modelling. 23:275-284.
 - Rodríguez-Pérez EG. 2013. Parasitología médica. Manual Moderno, México. pp 13-24.
 - Rodríguez MA, García-Pérez RM, García-Rivera G. 2000. An *Entamoeba histolytica* Rab-like encoding gene and protein: function and cellular location. Molecular and Biochemical Parasitology. 108(2):199-206.
 - Romero-Cabello R. 2007. *Entamoeba histolytica*. En *Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Médica Panamericana, México. pp 747-761.
 - Rossignol J, Kabil S, El-Gohary Y, Younis A. 2007. Nitazoxanide in the treatment of amoebiasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 101: 1025-1031.
 - Roy D, Lohia A. 2004. Sequence divergence of *Entamoeba histolytica* tubulin is responsible for its altered tertiary structure. Biochemical and Biophysical Research Communications. 319(3):1010-1016
 - Royer TL, Gilchrist C, Kabir M, Arju T, Ralston KS. 2012. *Entamoeba bangladeshi* nov. sp., Bangladesh. Emerging Infectious Diseases Journal. 18(9):1543-1544.
 - Saavedra E, Encalada R, Pineda E, Jasso-Chávez R, Moreno-Sánchez R. 2005. Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. The FEBS Journals. 272: 1767-1783.
 - Sahoo N. 2004. Calcium binding protein 1 of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* interacts with actin and is involved in cytoskeleton dynamics. Journal of Cell Science. 117:3625-3634.
 - Samuelson J. 1999. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 43: 1533-41.
 - Sánchez MA, Peattie DA, Wirth D, Orozco E. 1994. Cloning, genomic organization and transcription of the *Entamoeba histolytica* α -tubulin-encoding gene. Gene. 146: 239-244.
 - Saito-Nakano Y, Nakazawa M, Shigeta Y, Takeuchi T, Nozaki T. 2001. Identification and characterization of genes encoding novel Rab proteins from *Entamoeba histolytica*. Molecular and Biochemical Parasitology. 116: 223-228.
 - Saito-Nakano Y, Yasuda T, Nakada T, Tsukui K, Leippe M, Nozaki T. 2004. Rab-5 associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Journal of Biological Chemistry. 19;279(47):49497-49507.
 - Sánchez MA, Peattie DA, Wirth D, Orozco E. 1994. Cloning, genomic organization and transcription of the *Entamoeba histolytica* α -tubulin-encoding gene. Gene. 146(2): 239-244.
 - Samarawickrema NA, Brown DM, Upcroft JA, Thammapalerd N, Upcroft P. 1997. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistant in *Entamoeba histolytica*. Antimicrobial agents. 40:833-840.
 - Shafer DA, Jennings PB, Cooper JA. 1996. Dynamics of capping protein and actin assembly *in vitro*: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. The Journal of Cell Biology. 135: 169-179.
 - Schezov G, Loyd C, Gunning P. 1992. High level expression of transfected

- beta and gamma actin genes differentially impacts on myoblast cytoarchitecture. *Journal of Cell Biology*. 117:775-785.
- Sepúlveda B, Martínez-Palomo A. 1984. Amebiasis. En *Tropical and Geographical Medicine*. McGraw-Hill. New York. pp 305-318.
 - Seydel KB, Stanley SL Jr. 1998. *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis. *Infection and Immunity*. 66:2980-2983.
 - Shibayama M, Dolabella SS, Silva E. 2007. A Brazilian species of *Entamoeba dispar* (ADO) produces amoebic liver abscess in hamsters. *Annals of Hepatology*. 6(2):117-118.
 - Shimokawa C, Kanir M, Taniuchi M, Mondal D, Kobayashi S. 2012. *Entamoeba moshkovskii* is associated with diarrhea and colitis in mice. *The Journal of Infectious Diseases*. 206(5):744-751.
 - Stanley SL. 2003. Amoebiasis. *Lancet*. 361(9362):1025-1034.
 - Stitt AW, Fairweather I, Trudgett AG, Johnston CF, Anderson SML. 1992. Localisation of actin in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*. 78(2):96-102.
 - Talamás-Rohana P, Hernández-Ramírez V, Rosales Encina JL. 1994. A β_1 integrin-like molecule in *Entamoeba histolytica*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 88:596-599.
 - Talamás-Rohana P, Meza I. 1988 Interaction between Pathogenic Amebas and Fibronectin: Substrate Degradation and Changes in Cytoskeleton Organization. *The Journal of Cell Biology*. 106(5): 1787-94.
 - Tay-Zavala J. 2010. Amibiasis. En *Parasitología Médica de Tay*. Méndez-Editores, México. pp 61-63.
 - Temesvari LA, Harris En, Stanley SL Jr, Cardellia JA. 1999. Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab GTPases. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 103:225-241.
 - Texeira JE, Huston CD. 2008. Evidence of a Continuous Endoplasmic Reticulum in the Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukariotic Cell*. 7(7):1222-1226.
 - Thibeaux R, Avé P, Bernier M, Morcelet M, Pascal Frieux, Guillén N, Labruyère E. 2014. The parasite *Entamoeba histolytica* exploits the activities of human matrix metalloproteinases to invade colonic tissue. *Nature Communications*. 7;5:5142.
 - Thibeaux R, Weber C, Hon, C-C, Dillies M-A, Avé P, Coppée Y, Labruyère E, Guillén N. 2013. Identification of the virulence landscape essential for *Entamoeba histolytica* invasion of the human colon. *PLoS Pathogens*. 9(12): e1003824
 - Tolstrup J, Krause E, Tannich E, Bruchhaus I. 2007. Proteomic Analysis of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology*. 134(2): 289-298.
 - Trinh S, Reysset G. 1998. Mutagenic action of 5-nitroimidazoles: in vivo induction of GCAECG transversions in two *Bacteroides fragilis* reported genes. *Mutation Research*. 398:55-65
 - Upcroft P, Upcroft JA. 2001. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. *Clinical Microbiology Reviews*. 14(1): 150-164.
 - Valdéz J, Cedillo R, Hernández-Campos A, Yépez-Mulia L, Hernández-Luis F, Navarrete-Vázquez G, Tapia-Contreras A, Cortés R, Hernández M, Castillo R. 2002. Synthesis and antiparasitic activity of 1H-benzimidazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 12(16):2221-2224.
 - Valdéz-Padilla D, Rodríguez-Morales S, Hernández-Campos A, Hernández-Luis F, Yépez-Mulia L, Tapia-Contreras A et al. 2009 Synthesis and

- antiprotozoal activity of novel 1-methylbenzimidazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17(4):1724-1730.
- Vargas M, Sansonetti P, Guillén N. 1996. Identification and cellular localization of the actin. Binding proteins ABP-120 from *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology*. 22:849-857.
 - Vera EM. 1991. Síntesis de derivados del bencimidazol con acción fasciolicida potencial. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
 - Vera Y, Ibarra F, Cantó GJ, Soria O, Castillo R, Hernández-Campos A- 2006. Determination of the maximum tolerate dose and the safety index of an experimental fasciolicide in cattle. *Journal of Veterinary Medicine. Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 53(3):153-149.
 - Vayssie L, Vargas M, Weber C, Guillén N. 2004. Double-stranded RNA mediates homology-dependent gene silencing of gamma-tubulin in the human parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 138(1):21-28.
 - Virel A, Addario B, Backman L. 2007. Characterization of *Entamoeba histolytica* alpha-actinin 2. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 154:82-89
 - Virel A, Backman L. 2006. Characterization of *Entamoeba histolytica* alpha-actinin. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 145(1):11-17
 - Walsh JA. 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Reviews of Infectious Diseases*. 8(2):228-238.
 - Wassmann C, Hellberg, A, Tannich E, Bruchhaus I. 1999. Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increase expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decrease expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(37): 26051-26056.
 - Weinke T, Friedrich-Jänicke B, Hopp P, Janitschke K. 1990. Prevalence and clinical importance of *Entamoeba histolytica* in two high-risk groups: travelers returning from the tropics and male homosexuals. *J Infect Dis*. 161(5):1029.
 - Williams CS, Woodcock KR. 2000. Do ethanol and metronidazole interact to produce a disulfiram-like reaction? *Annals Pharmacotherapy*. 34: 255-257.
 - World Health Organization. 1997. Amoebiasis, an expert consultation. *The Weekly Epidemiological Record*. 72:97-100.
 - Ximénez C. 2006. Epidemiology of Amebiasis in México: A Molecular Approach. *Archives of Medical Research*. 37:263-265.
 - Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Morán P, Shibayama M, González E, Valadez A, Hernández E, Valenzuela O, Limón A, Partida O, Silva EF. 2010. Human amebiasis: breaking the paradigm? *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 7(3): 1105-20.
 - Ximénez C, Morán P, Ramos F, Ramiro M. 2007. Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Medicina Interna de México*. 23(5): 398-407.
 - Ximénez X, Morán P, Rojas L, Valadéz A, Gómez A. 2009. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of art. *Infection, Genetics and Evolution*. 9: 1023-1032.

11. ANEXO

10.1 Medio de cultivo TYI-S-33 para *Entamoeba histolytica* (1000 mL) (Diamond, 1978).

NaCl	2g
KH ₂ PO ₄	1g
K ₂ HPO ₄	1g
D-(+)-glucosa	10g
Biosate	30g
L-cisteína	1g
L-ácido ascórbico	0.2g
Citrato férrico	0.022g
Agua bidestilada	1L

Disolver cada uno de los compuestos en 800 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1N. Aforar a 1L con agua bidestilada. Esterilizar por autoclave y colectar en frascos estériles de 500 mL. Complementar al 10% v/v con suero de ternera (Microlab) descomplementado (56°C por 30 min), y al 3% v/v con una mezcla de vitaminas-tween 80 Diamond (Sigma-Aldrich).

10.2 Soluciones

1. PBS 10x (Concentrado)

NaCl	80g
KH ₂ PO ₄	2g
NaH ₂ HPO ₄	11.5g
KCl	2g

Disolver las sales en 800 mL de agua bidestilada. Aforar a 1000 mL y esterilizar por autoclave.

2. PBS 1x (1000 mL)

Tomar 100 mL de la solución anterior y agregar 800 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1000 mL. Esterilizar por autoclave.

3. Inhibidores de proteasas (TPCK, TLCK 1mg/mL)

Pesar 10 mg de TPCK y TLCK. Diluir por separado en 10 mL de metanol. Guardar a -20°C.

10.3 Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot

1. Acrilamida 30%-bis-acrilamida 0.8%

Pesar 29.2g de acrilamida (99.9% de pureza) y 1g de bis-acrilamida. Disolver y aforar a 100 mL con agua bidestilada. Filtrar con papel Whatman 1 y guardar en frasco ámbar a 4 °C.

2. Amortiguador del gel separador (tris-base 1.5M, pH 8.8)

Pesar 18.7g de Tris-Base y disolverlos en 85 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N. Aforar a 100 mL y guardar a 4°C.

3. Amortiguador del gel concentrador (Tris-HCl 0.5M, pH 6.8)

Pesar 6.05g de Tris y disolverlos en 85 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1N. Aforar a 100 mL y guardar a 4°C.

4. Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%

Pesar 10g de SDS y disolverlos en 100 mL con agua bidestilada.

5. Persulfato de amonio al 10%

Pesar 100 mg de persulfato de amonio y disolverlos en 1 mL de agua bidestilada.

6. Amortiguador de muestra 4x

Agua bidestilada	250µl
Tris-HCl 0.5M, pH 6.8	250µl
Glicerol	400µl
SDS	80 mg
Azul de bromofenol	4 mg
2-β-mercaptoetanol	400µl

7. Amortiguador para electroforesis 5x (tris-glicina-SDS)

Tris-Base	15.1g
Glicina	94g
SDS al 10%	50 mL
Agua bidestilada	900 mL

Disolver todos los componentes y aforar a 1000 mL con agua bidestilada. Guardar a 4°C.

8. Amortiguador de transferencia (Tris 0.025M, glicina 0.192M, Metanol 20%).

Pesar 12.11g de Tris-base y 57.68g de glicina. Diluir en 800 mL de metanol. Aforar a 4L con agua bidestilada. Guardar a 4°C.

9. Azul de Coomassie al 0.06%

Pesar 250 mg de azul de Coomassie R-250 y disolver en 90 mL de metanol al 50%. Agregar 10 mL de ácido acético glacial. Filtrar con papel Whatman 1.

10. Solución decolorante para geles de acrilamida

Medir 500 mL de metanol absoluto. Añadir 100 mL de ácido acético glacial Aforar a 1000 mL con agua bidestilada. Guardar en frasco ambar a temperatura ambiente.

11. Solución de bloqueo (albúmina sérica bovina al 3% en PBS)

Pesar 3g de albúmina sérica bovina. Diluir en 90 mL de PBS 1X estéril. Aforar a 100 mL y refrigerar a 4°C.

12. Amortiguador de trietanolamina.

Pesar 7.5g de NaCl. Medir 2.8 mL de trietanolamina y 17 mL de HCl 1N. Disolver todos los componentes en 800 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 7.5 y aforar a 1000 mL.

13. Solución cromógeno/sustrato para Western Blot.

Diluir una tableta de 4-cloro-1-naftol (Sigma®) en 10 mL de metanol frío. Medir 2 mL de esta solución y mezclar con 10 mL de amortiguador de trietanolamina. Agregar 5µl de H₂O₂ al 30%. Proteger de la luz.

10.4 Soluciones para electroforesis en doble dimensión (2D-PAGE)

1.Solución de lisis (1 mL)

Urea 7M	0.42 g/mL
---------	-----------

Tiourea 2M	0.1522 g/mL
CHAPS 4%	0.04%
DTT 10mM	0.0025 g/mL

Disolver todos los componentes en 1 mL de agua desionizada estéril. Hacer alícuotas de 250 μ L y guardar a -20°C hasta su uso.

2. Solución de equilibrio (20 mL)

Urea 6M	7.21g
Tris-HCl, 1.5 M pH 8.8	1 mL
Glicerol al 30%	6.9 mL
SDS al 10% (w/v)	4.0 mL
Azul de bromofenol 1% (w/v)	400 μ L
Agua desionizada	Aforar a 40 mL

10.4 Soluciones para eritrofagocitosis

1. Solución salina isotónica 0.9% (1L)

Pesar 9 g de NaCl. Aforar a 1L con agua destilada estéril.

2. Glutaraldehído al 2.5% (100mL)

Agregar 2.5 mL de glutaraldehído a 100 mL de PBS 1X estéril. Agitar y guardar a temperatura ambiente en frasco ámbar.

3. Solución de para tinción de eritrocitos Tris-HCl 1.5 M (100 mL)

Pesar 18.7g de Tris-Base y disolverlos en 85 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N. Aforar a 100 mL. Agregar 0.01 μ L de H₂O₂ al 30% por cada 10 mL de solución al momento de realizar la tinción.