



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

MECANISMOS MOLECULARES EN LA FORMACIÓN DE
REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs)
INDUCIDOS POR *E. histolytica* Y *E. dispar*

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

ZAYDA YURLEY FONSECA COBOS

TUTOR PRINCIPAL

DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. JULIO CÉSAR CARRERO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

Ciudad de México, Noviembre, 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.

Declaración de autenticidad

Por la presente declaro que, salvo cuando se haga referencia específica al trabajo de otras personas, el contenido de esta tesis es original y no se ha presentado total o parcialmente para su consideración para cualquier otro título o grado en esta o cualquier otra Universidad. Esta tesis es resultado de mi propio trabajo y no incluye nada que sea el resultado de algún trabajo realizado en colaboración, salvo que se indique específicamente en el texto.

ZAYDA YURLEY FONSECA COBOS. CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE, 2017

Mecanismos moleculares en la formación de redes extracelulares de neutrófilos (NETs) inducidos por *E. histolytica* y *E. dispar*

Resumen

La amibiasis es una enfermedad infecciosa causada por el parásito protozoario *E. histolytica*. Existen principalmente dos especies de amibas que pueden colonizar a los humanos: *E. histolytica* que es patogénica y *E. dispar* no patogénica, son indistinguibles al microscopio. *E. histolytica* induce la liberación de redes extracelulares de neutrófilos (NETs). Sin embargo los mecanismos moleculares necesarios para que ocurra este proceso son poco conocidos, y no se ha determinado si *E. dispar* induce la liberación de NETs.

En este trabajo se estimularon los neutrófilos con trofozoítos de *E. dispar*, durante esta estimulación no se observó liberación de NETs, ni degranulación, ni formación de especies reactivas de oxígeno. Por otra parte cuando los neutrófilos fueron estimulados con trofozoítos de *E. histolytica* ocurre la liberación de NETs desde los primeros minutos de contacto. Las NETs atrapan los trofozoítos de *E. histolytica* y parecen impedir el movimiento y propagación de parásito. Para que los neutrófilos liberen NETs en presencia de *E. histolytica* la viabilidad y movilidad de la amiba son requisitos importantes, el contacto directo entre *E. histolytica* y los neutrófilos también es fundamental para que se produzca la liberación de NETs.

En este trabajo se encontró que la adición de monosacáridos como manosa y galactosa en el medio donde interaccionan las dos células inhibe la formación de NETs, lo que sugiere la participación de un receptor tipo lectina en el reconocimiento entre el parásito y el neutrófilo y en la formación de NETs. Finalmente se estableció que la vía de transducción de este proceso es Raf/MEK/ERK y la activación de NF- κ B. Otras moléculas como: PKC, Syk, TAK1, PI3K y p38 no participan en esta vía de señalización. También se pudo establecer que las NETs inducidas por *E. histolytica* son independientes de la formación de especies reactivas de oxígeno.

Molecular mechanism in the formation of Neutrophils extracellular traps (NETs) induced by *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*.

Abstract

Amoebiasis is an infectious disease caused by the protozoan parasite *E. histolytica*. There are mainly two species of amoebae that can colonize humans: *E. histolytica* which is pathogenic and non-pathogenic *E. dispar*, are indistinguishable under the microscope. *E. histolytica* induces the release of extracellular neutrophil networks (NETs). However, the molecular mechanisms necessary for this process to occur are poorly understood, and it has not been determined if *E. dispar* induces the release of NETs.

In this work neutrophils were stimulated with trophozoites of *E. dispar*, during this stimulation no release of NETs, no degranulation, or formation of reactive oxygen species was observed. On the other hand, when the neutrophils were stimulated with trophozoites of *E. histolytica* the release of NETs occurs from the first minutes of contact. The NETs trap the trophozoites of *E. histolytica* and appear to impede parasite movement and propagation. To release NETs neutrophils in the presence of *E. histolytica* viability and mobility are important requirements amoeba, direct contact between *E. histolytica* and neutrophils is essential for the release occurs of NETs.

Here was found that the addition of monosaccharides as mannose and galactose in the medium where they interact both cells inhibits the formation of NETs, indicating the participation of a type lectin receptor on the recognition between a parasite and the neutrophil and the NETs training. Finally, it was established that the transduction pathway of this process is Raf/MEK/ERK and the activation of NF- κ B. Other molecules such as: PKC, Syk, TAK1, PI3K and p38 do not participate in this signaling pathway. It could also be established that the NETs induced by *E. histolytica* are independent of the formation of reactive oxygen species.

Índice general

Índice de figuras	x
Lista de abreviaturas	xv
1. Introducción	1
2. Marco teórico	5
2.1. Amibiasis	5
2.2. Ciclo de vida de la amiba	5
2.3. Epidemiología	6
2.4. Tipos de entamoeba	7
2.4.1. <i>E. histolytica</i>	7
2.4.2. <i>E. dispar</i>	8
2.4.3. <i>E. moshkowskii</i>	8
2.4.4. Amibas de vida libre	9
2.5. Factores de virulencia de <i>E. histolytica</i>	9
2.6. Respuesta inmune a amibiasis	13
2.6.1. Liberación de citocinas	13
2.6.2. Producción de anticuerpos	13
2.6.3. Función de macrófagos	14
2.6.4. Atracción y papel de neutrófilos	14
2.7. Neutrófilos	17
2.8. Estrategias antimicrobianas de los neutrófilos	17
2.8.1. Degranulación	17
2.8.2. Fagocitosis	18
2.8.3. Redes extracelulares de neutrófilos (NETs)	18
2.9. Liberación de NETs por <i>E. histolytica</i>	19
3. Hipótesis	20
3.1. Objetivo general	20
3.1.1. Objetivos específicos	20

4. Metodología	21
4.1. Purificación de neutrófilos	21
4.2. Cultivo de amibas	21
4.3. Cuantificación de NETs por estimulación con <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> .	21
4.4. Degranulación de neutrófilos en presencia de <i>E. dispar</i> y <i>E. histolytica</i> .	22
4.5. Microscopía de fluorescencia de NETs	22
4.6. Toma de videos	23
4.7. Medición de especies reactivas de oxígeno (ROS)	23
4.7.1. Cinética de fluorescencia	23
4.7.2. Citometría de flujo	23
4.7.3. Microscopía de fluorescencia	23
4.8. Western blot	24
4.9. Ensayos de viabilidad de <i>E. histolytica</i>	24
5. Resultados	26
5.1. Formación de NETs inducidas por <i>Entamoeba histolytica</i>	26
5.2. Respuesta de neutrófilos a <i>E. dispar</i>	32
5.2.1. <i>Entamoeba dispar</i> no induce la liberación de NETs	32
5.2.2. <i>E. dispar</i> no induce la formación de especies reactivas de oxígeno	35
5.2.3. <i>E. dispar</i> no induce degranulación en los neutrófilos	35
5.3. La viabilidad es importante en la formación de NETs	37
5.4. La movilidad de la amiba es determinante en la formación de NETs . . .	41
5.5. Efecto de azúcares en la formación de NETs	44
5.5.1. Efecto de galactosa	44
5.5.2. Efecto de manosa	48
5.5.3. Efecto de Glucosa	51
5.6. NETs inducidas por <i>E. histolytica</i> son independiente de la formación de ROS.	52
5.6.1. El Cloruro de difenileno yodonio (DPI) inhibe formación de NETs inducidas por <i>E. histolytica</i>	52
5.6.2. <i>E. histolytica</i> no induce especies reactivas de oxígeno en el neutrófilo.	54
5.7. Vía de señalización	56
5.7.1. Proteína cinasa C (PKC) no participa en la formación de NETs inducida por <i>E. histolytica</i>	57
5.7.2. Raf participa en la liberación de NETs	59
5.7.3. ERK participa en la formación de NETs inducidas por <i>E. histolytica</i>	60
5.7.4. NF- κ B participa en la formación de NETs inducida por <i>E. histolytica</i>	64
5.7.5. β 2-integrinas y Syk no participan en la liberación de NETs indu- cida por <i>E. histolytica</i>	68
5.7.6. TAK-1, fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) y p38 MAPK no son requere- ridos en la formación de NETs inducida por <i>E. histolytica</i>	71
6. Discusión	77

7. Conclusiones	82
8. Perspectivas	83
Bibliografía	84

Índice de figuras

2.1. Ciclo de vida de la amiba	6
2.2. Principales factores de virulencia de <i>E. histolytica</i> . Imagen tomada y modificada de Laughlin, R et al. (74)	12
2.3. Atracción de neutrófilos hacia <i>E. histolytica</i> en modelos animales inducidos por la inoculación de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> . a y b) 1 h después de la inoculación, c) 3 h después de la inoculación, d) 6 h después de la inoculación y e) 6 h después de inoculación a un mayor aumento. Imagen tomada de TSUTSUMI et al. 1984 (120).	15
2.4. Biopsias de epitelio del colon de pacientes con amibiasis. a) Amibas rodeadas de exudado necrótico de células inflamatorias (flecha), b) sección de la periferia del colon con mayor contenido de amibas y mayor número de células inflamatoria. Imagen tomada de GRIFFIN JOE L. 1972. (52)	16
5.1. Formación de NETs inducidas por <i>Entamoeba histolytica</i> . Neutrófilos en presencia de estímulo durante 4 horas a 37 °C en medio RPMI y SYTOX GREEN (500 nM). Los neutrófilos no se estimularon, se estimularon forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (20 nM) o con trofozoítos viables de <i>Entamoeba histolytica</i> . Relación de amibas: neutrófilos fue de 1:20. (n=3)	27
5.2. Microscopia en campo claro y fluorescencia usando tinción con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). a) neutrófilos sin estímulo. b) neutrófilos estimulados con PMA. c, d, y e) neutrófilos estimulados con <i>E. Histolytica</i> a aumento de 10 X, 20X y 40X, respectivamente	28
5.3. Formación de NETs inducidas por <i>E. histolytica</i> en el tiempo, tinción de Ácido desoxirribonucleico (ADN) con SYTOX GREEN (500 nM). Aumento 10x. a) 0 minutos (flechas indican la formación de rosetas sobre las amibas), b) 15 minutos, c) 30 minutos, d) 45 minutos, e) 1 hora, f) 1 hora y 30 minutos, g) 2 horas, h) 2 horas y 30 minutos. (Las fechas indicas la liberación de ADN sobre los trofozoítos)	30
5.4. Formación de NETs inducidas por <i>E. histolytica</i> diferentes etapas. Tinción de ADN con SYTOX GREEN (500 nM) y aumento de 40 x. (las fechas muestran la liberación de ADN sobre el trofozoíto.	31

5.5. Formación de NETs inducidas por <i>E. histolytica</i> en diferentes etapas. Tinción de ADN con SYTOX GREEN (500 nM) y aumento de 40 x. (las fechas muestran la liberación de ADN sobre el trofozoíto	32
5.6. Formación de NETs inducidas por <i>Entamoeba dispar</i> . Neutrófilos en presencia de estímulo durante 4 horas a 36 °C en medio RPMI y SYTOX GREEN (500 nM). Los neutrófilos no se estimularon, se estimularon PMA (20 nM), con trofozoitos viables de <i>E. histolytica</i> , con trofozoitos viables de <i>E. dispar</i> o en conjuntos con trofozoitos de <i>E. dispar</i> y <i>E. histolytica</i> . Relación de amibas: neutrófilos fue de 1:20. (n=3).	33
5.7. Microscopia en campo claro y fluorescencia usando tinción con DAPI. Neutrófilos estimulados con <i>E. dispar</i> a un aumento de 20X (a) y 40X (b). Neutrófilos estimulados con <i>E. Histolytica</i> junto con <i>E. dispar</i> , a un aumento de 10x (c).	34
5.8. Formación de Especies reactivas de oxígeno (ROS) en presencia de <i>E. dispar</i> usando como marcador fluorescente 2',7'-diclofluoresceína (DCFDA) 15 µM	35
5.9. Porcentaje de degranulación de neutrófilos en presencia de <i>E. dispar</i> , <i>E. histolytica</i> y N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLF).	37
5.10. Formación de NETs en presencia de: PMA, <i>E. histolytica</i> viable, homogenado de <i>E. histolytica</i> , <i>E. histolytica</i> fijada y medio en donde creció <i>E. histolytica</i> . 4 horas de estímulo. n=3	38
5.11. Microscopia en campo claro y fluorescencia usando tinción con DAPI. a) neutrófilos estimulados con <i>E. histolytica</i> viable, b y c) neutrófilos estimulados con <i>E. histolytica</i> fijada a un aumento de 20X Y 40X. d) neutrófilos estimulados con homogenado de <i>E. histolytica</i> . e) neutrófilos estimulados con medio donde creció <i>E. histolytica</i>	39
5.12. Formación de NETs inducidas por <i>E. histolytica</i> fijada, tinción de ADN con SYTOX GREEN (500 nM). Aumento 10x. a) 0 minutos, b) 15 minutos, c) 30 minutos, d) 45 minutos, e) 1 hora, f) 1 hora y 30 minutos, g) 2 horas, h) 2 horas y 30 minutos	40
5.13. Formación de NETs en presencia de trofozoitos pretratados con citocalasina b (1,3 mg/ml). a) Cuantificación de NETs después de 4 horas de estimulación. b) Viabilidad de <i>E. histolytica</i> pretratada con citocalasina B (1,3 mg/ml)	41
5.14. Imágenes de fluorescencia de neutrófilos estimulados con <i>E. histolytica</i> pretratados con citocalasina b(1,3 mg/ml), tinción de ADN con DAPI. a) aumento 10 x, b) aumento 20x	42
5.15. Formación de NETs inducidas por <i>E. histolytica</i> pretratada con citocalasina, tinción de ADN con SYTOX GREEN (500 nM). Aumento 10x. a) 0 minutos, b) 15 minutos, c) 30 minutos, d) 45 minutos, e) 1 hora, f) 1 hora y 30 minutos, g) 2 horas, h) 2 horas y 30 minutos. (Las flechas muestran a aquellas amibas que se desplazaron por el campo y tienen más neutrófilos sobre su superficie)	43

ÍNDICE DE FIGURAS

5.16. Efecto de Galactosa en formación de NETs. a) Cuantificación de NETs en presencia de Galactosa 220 mM y 110 mM. b) viabilidad de <i>E. histolytica</i> en presencia de galactosa (220 mM).	44
5.17. Formación de NETs en presencia o no de galactosa (220 mM). Neutrófilos estimulados durante 4 horas con PMA (20 nM) o con <i>E. histolytica</i> . . .	46
5.18. Formación de NETs inducidas por <i>E. histolytica</i> en presencia de galactosa 220 mM, tinción de ADN con SYTOX GREEN (500 nM). Aumento 10x. a) 0 minutos, b) 15 minutos, c) 30 minutos, d) 45 minutos, e) 1 hora, f) 1 hora y 30 minutos, g) 2 horas, h) 2 horas y 30 minutos (la flecha muestra a la amiba que más se desplazó en el campo. Los neutrófilos no se le adherieron)	47
5.19. Efecto de manosa en formación de NETs. a) Cuantificación de NETs en presencia de Manosa 220 mM y 110 mM. b)viabilidad de <i>E. histolytica</i> en presencia de Manosa (220 mM).	48
5.20. Formación de NETs en presencia o no de manosa (220 mM). Neutrofilos estimulados durante 4 horas con PMA (20 nM) o con <i>E. histolytica</i> . . .	49
5.21. Formación de NETs inducidas por <i>E. histolytica</i> en presencia de manosa 220 mM, tinción de ADN con SYTOX GREEN (500 nM). Aumento 10x. a) 0 minutos, b) 15 minutos, c) 30 minutos, d) 45 minutos, e) 1 hora, f) 1 hora y 30 minutos, g) 2 horas, h) 2 horas y 30 minutos (las flechas muestras ADN liberado sobre algunos trofozoítos)	50
5.22. Efecto de glucosa en formación de NETs. a) Cuantificación de NETs en presencia de glucosa 220 mM y 110 mM. b)viabilidad de <i>E. histolytica</i> en presencia de glucosa (220 mM).	51
5.23. Formación de NETs en presencia de DPI (10 μ M). a) Cinética de formación de NETs usando SYTOX GREEN como marcador fluorescente. b) viabilidad de <i>E. histolytica</i> en presencia de DPI (10 μ M)	52
5.24. Imágenes de NETs en presencia de DPI, tinción con DAPI. Neutrófilos estimulación con PMA o con <i>E. histolytica</i> en presencia de DPI.	53
5.25. Cinética de formación de ROS en neutrófilos inducidas por <i>E. histolytica</i> . Marcador fluorescente DCFDA 15 μ M	54
5.26. Histogramas de citometría de flujo de formación de ROS en neutrófilos inducidas por <i>E. histolytica</i> . Marcador fluorescente Dihidrorodamina-123 (DHR 123) 123 (15 μ M)	55
5.27. Microscopia de fluorescencia y campo claro, usando como marcador fluorescente Dihidroetidium (DHE) 15 μ M. a) Células sin estímulo, b) células estimulados con PMA, c) neutrófilos estimulados con <i>E. histolytica</i>	56
5.28. Formación de NETs estimuladas por PMA o <i>E. histolytica</i> en presencia de inhibidor de PKC (GÖ6976 1 μ M, GÖ6983 1 μ M	57
5.29. Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI . Neutrofilos estimulados en presencia o ausencia de GÖ6976. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con <i>E. histolytica</i>	58

5.30. a. Formación de NETs estimuladas por PMA o <i>E. histolytica</i> en presencia del inhibidor de Raf (GW5074 a 100 μ M). b. Viabilidad de <i>E. histolytica</i> en presencia de GW 5074.	59
5.31. Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI. Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de GW 5074 100 μ M. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con <i>E. histolytica</i>	60
5.32. Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de U0126 75 μ M. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con <i>E. histolytica</i> . a) Cuantificación de NETs, b) Viabilidad de <i>E. histolytica</i> en presencia del inhibidor.	61
5.33. Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI. Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de U0126 75 μ M. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con <i>E. histolytica</i>	62
5.34. Fosforilación de ERK en neutrófilos estimulados con <i>E. histolytica</i> . a) Western blot b) Cuantificación de Western blot.	63
5.35. Fosforilación de ERK en neutrófilos estimulados con <i>E. histolytica</i> en presencia de inhibidor de Raf-1 GW5074. a) Western blot b) Cuantificación de Western blot.	63
5.36. Fosforilación de ERK en neutrófilos estimulados con <i>E. histolytica</i> en presencia de inhibidor de MEK U0126. a) Western blot b) Cuantificación de Western blot.	64
5.37. Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de BAY 11-7082 5 μ M. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con <i>E. histolytica</i> . a) Cuantificación de NETs, b) Viabilidad de <i>E. histolytica</i> en presencia del inhibidor.	65
5.38. Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI. Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de BAY 11-7082 5 μ M. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con <i>E. histolytica</i>	66
5.39. Fosforilación de NF- κ B en neutrófilos estimulados con <i>E. histolytica</i> . a) Western blot b) Cuantificación de Western blot.	67
5.40. Fosforilación de NF- κ B en neutrófilos estimulados con <i>E. histolytica</i> en presencia del inhibidor de IKK BAY 11-7082. a) Western blot b) Cuantificación de Western blot	67
5.41. Fosforilación de NF- κ B en neutrófilos estimulados con <i>E. histolytica</i> en presencia del inhibidor de IKK MEK U0126. a) Western blot b) Cuantificación de Western blot	68
5.42. Cuantificación de NETs inducidas por PMA o <i>E. histolytica</i> realizando tinción con SYTOX GREEN. a) Cuantificación de NETs en presencia de mAb IB4, b) Cuantificación de NETs en presencia de inhibidor iSyk 1 μ M).	69
5.43. Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI. Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de iSyk 1 μ M. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con <i>E. histolytica</i>	70
5.44. Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI. Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de anticuerpo anti CD18 (IB4). Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con <i>E. histolytica</i>	71

ÍNDICE DE FIGURAS

5.45. Cuantificación de NETs inducidas por PMA o <i>E. histolytica</i> realizando tinción con SYTOX GREEN. a) Cuantificación de NETs en presencia de inhibidor de TAK-1 (LLZ 1640-2), b) Cuantificación de NETs en presencia de inhibidor de PI3K (wormanina), c) Cuantificación de NETs en presencia de inhibidor de P38 MAP (SB 203580).	73
5.46. Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI . Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de LLZ 1640-2 10 nM. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con <i>E. histolytica</i>	74
5.47. Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI . Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de wormanina 50nM. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con <i>E. histolytica</i>	75
5.48. Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI . Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de Sb 202191 0,2 μ M. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con <i>E. histolytica</i>	76

Lista de abreviaturas

- ADN: Acido desoxirribonucleico.
BPI: Proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad.
C3: Componente 3 del complemento.
C5: Componente 5 del complemento.
CP: Proteasas de cisteína.
CXCL: Ligando de quimiocina.
DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.
DCFDA: 2',7'-diclofluoresceína.
DHE: Dihidroetidium.
DHR 123: Dihidrorodamina-123.
DPI: Cloruro de difenileno yodonio.
EDTA:Ácido etilendiaminotetraacético
EhCP: Proteasas de cisteína de *Entamoeba histolytica*.
EhADH112: Adhesina de *Entamoeba histolytica*.
EhCPADH112: Complejo de Adhesina y proteasa de cisteína de *Entamoeba histolytica*
fMLF:N-formilmetionil-leucil-fenilalanina
Gal: Galactosa.
GalNAc: N-Acetil-D-Galactosamina.
GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos.
IgA: Interleucina-8.
IgG: Inmunoglobulina G.
IL-8: Interleucina-8.
IFN- γ :Interferon γ .
L220: Lectina 220 KDa.
LPPG: lipopeptidofosfoglicano.
LPS: Lipopolisacarido.
MAP: Proteasa ácida de membrana.
MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos-1.
MCP-4: Proteína quimioatrayente de monocitos-4.
MPO: Mieloperoxidasa.
NETs: Redes extracelulares de neutrófilos.
NGAL: Lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos.

Lista de abreviaturas

NF- κ B: Factor nuclear kappa B .
PAD4: peptidil arginasa desaminasa 4.
PAMP: Patrones moleculares asociados a patogenos.
PBS: Solución buffer de fosfato
PFA: Paraformaldehído
PGRP: Proteína de reconocimiento de peptidoglicanos.
PI3K:fosfoinositol 3-cinasa
PKC: Proteína cinasa C.
PMA: forbol-12-miristato-13-acetato.
PMN: polimorfonucleares.
PVDF: Fluoruro de polivinilideno
ROS: Especies reactivas de oxígeno.
SAP: Proteasa ácida secretada.
SDS: Dodecilsulfato sódico
SREHP: Proteína rica en serina.
TLR:Receptor tipo toll
TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .
TTBS: solución salina tamponada con Tris y tween .

Introducción

La amibiasis o entamoebosis es una infección intestinal generada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica*. EL ciclo de vida de la amiba es relativamente simple, consta de dos estadios: trofozoítos y quistes. La ingestión de los quistes maduros presentes en agua o en comida contaminada puede generar la infección y posterior desarrollo de amibiasis. Al llegar al intestino los quistes liberan a los trofozoítos que es un estadio en donde la amiba tiene mayor movilidad y capacidad invasiva (60). Esta enfermedad afecta entre y 50 millones de personas al año y causa alrededor de 100,000 muertes anuales (129). En zonas de Suramérica y África el porcentaje de infección puede llegar hasta el 50 %. En México la amibiasis aparece entre las primeras 20 causas de morbilidad ubicándose en sexto puesto (132). La personas que desarrollan la enfermedad invasiva a nivel intestinal normalmente están infectadas con *E. histolytica* ya que los otros tipos de amibas como *E. dispar* aunque pueden colonizar no poseen capacidad invasiva y por tanto no inducen una patología(92).

La gran actividad destructiva que tiene *E. histolytica* al entrar en contacto directo con la células blanco ha inspirado una variedad de enfoques experimentales que tienen como fin comprender la patogénesis de la amibiasis invasiva. Entonces, es así que muchos estudios se basan en entender los mecanismos por los cuales este parásito puede generar la destrucción de tejidos. La capacidad de invasión y de infección de *E. histolytica* está relacionada con sus factores de virulencia que han sido descritos desde 1975 (60) (66) (41). Entre estos factores se encuentran proteasas, amebaporos, fosfolipasa A, moléculas de adhesión como la adhesina 112 (EhADH112) y la lectina de *E. histolytica* que reconoce residuos Galactosa (Gal) y N-Acetil-D-Galactosamina (GalNAc) (41).

El reconocimiento de moléculas glicoconjugadas por parte del trofozoíto juega un papel importante en la interacción entre el parásito y las células del hospedero y por tanto en el desarrollo de la patología. Se ha propuesto a la lectina de *E. histolytica* Gal/GalNAc como la molécula involucrada en la adhesión y posterior inducción de lisis de las células blanco (101) (66). Al adicionar Gal o GalNAc, la adherencia de *E. histolytica* hacia células blanco se inhibe y también la posterior muerte de las células.

1. INTRODUCCIÓN

Esta inhibición no ocurre con otros aminoácidos o azúcares como manosa o galactosa. Incluso cuando se aumenta el contacto entre células y trofozoítos de *E. histolytica* por centrifugación, la presencia de Gal y GalNAc impide la lisis de células blanco (99). Además células mutadas deficientes de glicosilaciones N u O-terminal son resistentes a la actividad citolítica de la amiba, mientras células con mayor número de glicosilaciones aumentan su susceptibilidad a la lisis inducida por la amiba (101) (118) (26). Estos aportes indican que las moléculas glicoconjugadas son necesarias en la adherencia y capacidad citolítica de la amiba.

Otro enfoque para entender la patogénesis de *E. histolytica* ha sido tratar de entender el papel del sistema inmunológico en la infección por *E. histolytica* comparada con una amiba no patogénica como *E. dispar*. Ambas amibas atraen a los neutrófilos tanto en modelos in vivo como in vitro (23). *E. histolytica* puede fagocitar neutrófilos y cuando tiene contacto membrana-membrana con los neutrófilos induce la lisis y la muerte de los mismos (111). Esto no ocurre con *E. dispar* (54). Además la lisis de neutrófilos por *E. histolytica* puede aumentar el daño en el tejido circundante (106) (15). Así mismo en biopsias humanas de tejido de colon de pacientes con amibiasis y en modelos animales se ha observado que en las primeras etapas de infección los neutrófilos son las primeras células del sistema inmunológico en llegar y rodear al parásito impidiendo el contacto del trofozoíto con el tejido del huésped. Aquellos neutrófilos que tienen contacto membrana-membrana con la amiba sufren cambios morfológicos como la pérdida de la forma nuclear, hinchamiento del núcleo, la pérdida de los gránulos y la ruptura de la membrana plasmática. Todos estos cambios se han interpretado durante muchos años como lisis del neutrófilo inducido por el parásito. Sin embargo cuando no hay contacto directo membrana-membrana estos cambios morfológicos en el neutrófilo no se observan (52) (119) (29) (28). En el mismo tipo de ensayos usando a *E. dispar*, *E. coli*, *Acanthamoeba*, o *E. histolytica* inactivada se observa atracción de los neutrófilos hacia el parásito pero no hay cambios morfológicos que lleven a la lisis de neutrófilo (66) (40) (66). Otra importante observación es la disminución en el efecto en la lisis de neutrófilo al inhibir el citoesqueleto y restringir la movilidad de *E. histolytica* (54). Todos estos reportes en conjunto indican que el efecto de la lisis de neutrófilos sólo ocurre con la especie patogénica y con la capacidad invasiva de la amiba.

Por otra parte ensayos en que se usan anticuerpos para eliminar los neutrófilos en cepas de ratones resistentes a la infección por *E. histolytica*, la neutropenia produce la disminución parcial de la resistencia innata, lo que sugiere que los neutrófilos tienen un papel protector en la infección por *E. histolytica* (9). Esta protección está relacionada con facilitar la limpieza de amibas en el intestino en las primeras etapas de la infección (103). Ya que en condiciones de neutropenia el número de amibas aumenta y se producen abscesos significativamente mayores y mayor daño hepático en comparación con el grupo control. En ensayos del mismo tipo se concluye que los neutrófilos parecen jugar un papel protector en la etapas tempranas de la infección, y además que al rodear la amiba forman una barrera que contiene los abscesos amebianos hepáticos y evitan

propagación del parásito (109) (124).

Todos los reportes de daño a neutrófilos por *E. histolytica*, de aumento de citotoxicidad en tejido circundante por lisis del neutrófilo, de fagocitosis del neutrófilo por parte del parásito y del papel protector de neutrófilos en la primera etapa de infección, no dejan claro cuál es el papel de los neutrófilos en la amibiasis.

Los neutrófilos son la primera línea de defensa del organismo frente a cualquier infección. En una infección o proceso inflamatorio los neutrófilos salen de la circulación sanguínea y se dirigen al sitio afectado para atacar a los microorganismos (8). Para combatir las infecciones los neutrófilos utilizan estrategias como la fagocitosis y posterior eliminación del patógeno internalizado; la degranulación que implica la liberación de sustancias antimicrobianas presentes en los gránulos; la liberación de estructuras fibrilares de ácido desoxiribonucleico (ADN) denominadas redes extracelulares de neutrófilos (NETs) (21).

Las NETs son estructuras formadas por un esqueleto de ADN que contienen componentes antimicrobianos provenientes de los gránulos de los neutrófilos (122). Las NETs pueden combatir a los agentes patógenos de dos maneras: actúan como una barrera física que evita la libre propagación de los microorganismos y favorecen un microambiente con mayor concentración de sustancias antimicrobianas. Se han descrito dos rutas en que los neutrófilos pueden liberar NETs. La primera se caracteriza por una muerte celular lenta la cual se denomina NETosis y ocurre en un periodo de tiempo comprendido entre 3 y 4 horas. La segunda por una liberación rápida del ADN, un proceso que puede ocurrir en los primeros minutos después de estimular los neutrófilos (94).

En la NETosis el primer cambio que sufre el neutrófilo es la pérdida de la forma lobulada del núcleo, seguido de una ruptura de la membrana nuclear y la liberación de la cromatina en su forma no condensada. Cuando las NETs son liberadas al medio extracelular se da el rompimiento de la membrana plasmática (21). La liberación de NETs depende en muchos casos de la activación de NADPH oxidasa y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (115). Existen diferentes moléculas que tienen la capacidad de inducir la liberación de NETs entre las que se encuentran la interleucina-8 (IL-8), lipopolisacárido (Lipopolisacárido (LPS)) y el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). El PMA es un fuerte inductor de NETs que se puede usar como modelo comparativo in vitro al inducir NETs con otros agentes como microorganismos. La vía de traducción de señales para la formación de NETs por PMA inicia en la activación de la proteína cinasa C (PKC), seguido de la activación del proto-oncogen c-Raf, que posteriormente activa a MEK y ésta a su vez fosforila a ERK. Esta cascada se conecta con la NADPH oxidasa que induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (por las siglas en inglés reactive oxygen species) y la posterior liberación de NETs (por las siglas en inglés neutrophils extracellular traps) (71). La lista de microorganismos que inducen la formación de NETs va en aumento. Se han descrito bacterias, virus, hongos y algunos

1. INTRODUCCIÓN

protozoarios. Las NETs pueden matar o inhibir el crecimiento de una variedad de bacterias Gram-negativas, Gram-positivas y también algunos hongos, parásitos protozoarios y virus (21) (53) (123) (2).

Hasta el momento, el papel que tienen los neutrófilos en la amibiasis no es del todo claro. Sin embargo recientemente se describió que *E. histolytica* induce la liberación NETs, un proceso que ocurre desde los primeros minutos de estimulación con el parásito (12) (125). Este reporte cambia la visión de lo reportado durante varios años. Pero aún no existen reportes que indiquen que los neutrófilos pueden liberar NETs en presencia de *E. dispar*, una amiba morfológicamente idéntica a *E. histolytica* pero sin capacidad invasiva.

Además aunque se han identificado diferentes receptores que reconocen patrones moleculares asociados a microorganismos, no se ha reportado que la interacción de los microorganismos con estos receptores esté implicada con la liberación de NETs. Dos receptores de neutrófilos se han identificado como directamente inductores de la liberación de NETs: el receptor Fc alfa (6) y el receptor Fc γ RIIIb (4) (16). Pero ninguno de estos dos receptores lo hace por una interacción directa con el microorganismo, sino a través de anticuerpos.

Muchos de los microorganismos descritos hasta el momento como inductores de NETs son agentes infecciosos patogénicos. Para ninguno de ellos se ha descrito una vía de señalización en el neutrófilo que lleve a la formación de NETs. En este proyecto se pretende estudiar si *E. dispar* tiene la capacidad de inducir NETs como lo hace *E. histolytica*. De esta manera se podría verificar si células de sistema inmune como los neutrófilos responden de la misma forma a microorganismos patogénicos que a microorganismos no patogénicos. Además de observar si las NETs aún se producen cuando *E. histolytica* pierde su capacidad invasiva al restringir su movilidad y afectar su viabilidad. Los resultados obtenidos pueden ayudar a responder que componentes de las amibas están implicados en la formación de NETs y quizás se pueda relacionar estos componentes con los receptores de neutrófilos que desencadenan la liberación de NETs. También se pretende verificar si las vías de señalización reportadas para la formación de NETs por PMA son las mismas que se inducen en el neutrófilo *E. histolytica* y por *E. dispar*.

Marco teórico

Amibiasis

La amibiasis es un patología causada por la infección del parásito protozoario *Entamoeba histolytica* que es capaz de invadir la mucosa del intestino grueso e invadir otros órganos, como hígado, pulmones o incluso cerebro formando abscesos, microémbolos o infartos. Esta infección es la causante de 100,000 muertes en el año en el mundo, ubicándose en segundo lugar de mortalidad por parásitos protozoarios y siendo superado únicamente por la malaria. Dependiendo del órgano infectado las manifestaciones clínicas pueden ser intestinales o extraintestinales. Las manifestaciones clínicas de amibiasis intestinal incluyen: disentería o diarrea con sangre, colitis fulminantes, apendicitis amebiana y ameboma del colon. La disentería es el síntoma que se presenta en el 90 % de los casos de amibiasis intestinal (41). Aunque *E. histolytica* puede invadir diferentes órganos, la amibiasis extraintestinal más común es la hepática, la cual resulta de la migración de los trofozoítos desde el colon hasta el hígado a través del sistema vena porta. La amibiasis hepática es 10 veces más común en adultos que en niños y tres veces más común en hombres que en mujeres (41) (60).

El proceso de invasión de *E. histolytica* es muy complejo, va desde la expresión de proteínas que le permite adherirse al epitelio, hasta la liberación de proteínas que degradan la matriz extracelular y producen citólisis de células epiteliales para finalmente penetrar dentro de la mucosa, este proceso requiere básicamente de tres etapas: la colonización, la disrupción de la mucosa y la citólisis (118) (11)

Ciclo de vida de la amiba

EL ciclo de vida de la ameba es relativamente simple, consta de dos estadios: trofozoítos y quistes. La ingestión de los quistes maduros, presentes en agua o en comida

2. MARCO TEÓRICO

contaminada, puede generar la infección y posterior desarrollo de amibiasis. Al llegar al intestino, los quistes liberan a los trofozoítos que es un estadio en donde la amiba tiene mayor movilidad y son los que poseen la capacidad invasiva en la mucosa intestinal pudiendo llegar al hígado u otros órganos y formar abscesos. Finalmente cuando la amiba es excretada del individuo lo hace en el estadio de quiste y el ciclo de infección puede iniciar de nuevo (60) (Fig. 2.1).

El quiste tiene 4 núcleos claramente definidos cuando está maduro y sólo uno en estado inmaduro. Cuando la exquistación ocurre, cada quiste puede producir 8 trofozoítos. Los quistes son resistentes a la desecación en el suelo y pueden sobrevivir durante varias semanas en ambientes húmedos o en el agua (134).

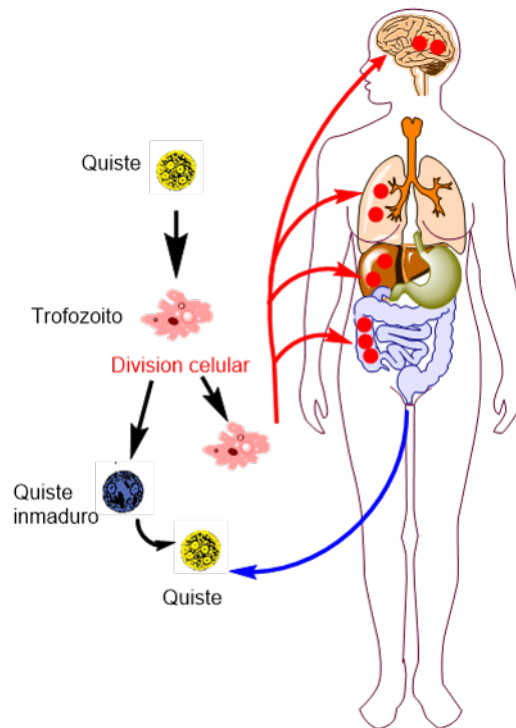


Figura 2.1: Ciclo de vida de la amiba

Epidemiología

E. histolytica causa a nivel mundial aproximadamente 100 000 muertes al año (organización mundial salud), colocándose en el segundo lugar dentro de las parasitosis que causan más muertes a nivel mundial, superada únicamente por la malaria (130).

Esta infección es bastante común en países en desarrollo, áreas altamente endémicas para *E. histolytica* incluyen a India, el oeste y sur de África y ciertas regiones de Sur y Centro América en donde más del 50 % de las poblaciones de alto riesgo pueden estar infectadas (10).

Actualmente en México, la amebiasis es una de las 20 principales causas de enfermedad, ubicándose en el sexto lugar (133). Esta cifra puede ser similar en otros países en desarrollo, donde esta enfermedad es una de las principales causas de mortalidad (114). Los valores de amebiasis entre los años 2002 a 2006 fueron de 1128.8 a 615.85/ 100,000 habitantes por año. Como en otros países en desarrollo, la población más afectada son los menores de 15 años de edad, con un aumento notable en niños de 5 a 9 años (133)

El reporte más reciente de seroepidemiología contra *E. histolytica* realizado en las 32 entidades federales de la República Mexicana mostró que el 8,41 % de los participantes habían sufrido la infección. Estos resultados indicaron que la amebiasis es endémica en México. La exposición al contacto infeccioso con *E. histolytica* se produjo a todas las edades, con mayor frecuencia en la edad escolar (25).

Tipos de entamoeba

A lo largo de tiempo, se ha observado que no todas las personas que adquirían el parásito desarrollaban síntomas de esta infección indicando que el parásito variaba de virulencia. Fue hasta 1925 cuando Emile Brumpt propuso que existían dos especies de amiba, una capaz de generar la enfermedad y la otra que nunca podía inducir la enfermedad y a esta última se le llamo *Entamoeba dispar*. Después de esta época se avanzó en estudios bioquímicos, inmunológicos y genéticos hasta que en 1993 se realizó una descripción formal de *Entamoeba histolytica* separándola como especie de *Entamoeba dispar* y diferenciándose a la primera como una especie patogénica y a la segunda como otra especie no patogénica (34).

Principalmente son tres especies las que más causan infección en humanos: *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkowskii*.

E. histolytica

Es la especie patogénica dentro de las entamoeba. Esta amiba puede vivir en el intestino grueso o invadir la mucosa intestinal causando daños e invadiendo otros órganos. El órgano más afectado es el hígado particularmente el lóbulo derecho que es la zona más cercana a la vena porta por donde viajan los trofozoítos. Los abscesos en órganos diferentes al hígado son extremadamente raros y con altas tasas de mortalidad (134).

La patogenicidad de *E. histolytica* se atribuye a ciertas características como la capacidad de fagocitar bacterias, algunas células y restos celulares, que utilizan como alimento; la capacidad de resistir al sistema de complemento; la expresión de adhesinas, de proteasas de cisteína y serina, de fosfolipasa, de proteínas formadoras de poros o amebaporos y de colágenas; y a su actividad lítica (41). Durante el proceso de invasión de la ameba múltiples citocinas proinflamatorias y quimioatrayentes son liberadas por las células epiteliales, lo que puede iniciar una respuesta inflamatoria (96).

E. dispar

E. dispar es microscópicamente indistinguible de *E. Histolytica*, pero es genéticamente diferente y aunque tiene la capacidad de colonizar el intestino no tiene potencial invasivo. Esta especie de ameba que es muy cercana a *E. histolytica* tiene importantes implicaciones en la epidemiología de la amebiasis ya que muchas infecciones asintomáticas podrían atribuirse a *E. dispar*. Se estima que aproximadamente 10 % de población mundial puede estar contagiada de *E. dispar*/*E. histolytica*, aunque la prevalencia de *E. dispar* es mayor. Una de las diferencias más importantes de esta ameba comparada con *E. histolytica* es que mientras en *E. histolytica* se han identificado más de 40 genes que codifican proteasas de cisteína en *E. dispar* sólo se han identificado 8 que se expresan moderadamente en cultivo. *E. dispar* codifica genes homólogos a los genes que expresan las proteasas de cisteína 1 y 4 (EdCP1 a EdCP4) de *E. Histolytica*. Sin embargo los genes homólogos de *E. histolytica* para EhCP1 y EhCP5 están ausentes en especies no patógenas (64). Además la expresión de proteasas de cisteína en *E. dispar* es más baja que en *E. histolytica*. La actividad de proteasas de cisteína de *E. histolytica* es entre 10 y 1000 veces mayor que la de *E. dispar*, lo cual podría explicar diferencia de patogenicidad entre estas dos especies (107). Al comparar algunas características de los fagosomas, como maduración por acidificación, reclutamiento de hidrolasas y degradación de contenido fagosomal, entre *E. histolytica* y *E. dispar* se encontró que la cantidad de fagosomas en *E. histolytica* es superior. Los fagosomas tienen mayor contenido fagosomal y la acidificación es más eficiente que en los fagosomas de *E. dispar*. Por tanto la degradación del contenido de fagosomas es más rápida en *E. histolytica* que en *E. dispar*. Además la acidificación es importante para la activación de muchas proteasas y otros factores de virulencia de *E. histolytica* como la fosfolipasa y las lisozimas (107) (37) (34).

E. moshkowskii

E. moshkowskii fue reconocida por primera vez como una ameba de vida libre en 1941, está presente en humanos, es morfológicamente igual a *E. dispar* y a *E. histolytica*, y es común en individuos de ciudades desarrolladas y altamente industrializadas (95). *E. moshkowskii* no es patógena y a diferencia de las dos amebas anteriores, este protozoo no es comensal. Tiene pocas características que la diferencian de los demás. Entre estas

características se tiene que *E. moshkowskii* es osmotolerante y puede crecer a temperatura ambiente (7). *E. moshkowskii* también puede crecer en un rango de temperaturas entre 4 y 40 grados Celsius, con pocos nutrientes en el medio y puede adaptarse a cultivos hipotónicos y desarrollar vacuolas contráctiles (61).

Amibas de vida libre

Acanthamoeba: es la amiba más común de vida libre, es un protozoo oportunista que vive en el suelo y en el agua. Acanthamoeba también se ha aislado de algunos vegetales y algunos animales. Este parásito puede causar algunas enfermedades en humanos especialmente inmunodeprimidos como encefalitis granulomatosa amebiana y queratitis. Este parásito soporta un alto rango de osmolaridad, salinidad, pH y temperatura (7).

Las especies de Acanthamoeba que puede causar infección en humanos son: *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. astronyxis*, *A. lugdunensis* y *A. divionensis*. Se les llamo Acanthamoeba debido a la presencia de finas estructuras parecidas a espinas (117). Además de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkowskii*, se han descrito otras especies de amibas que pueden infectar humanos. Éstas incluyen *E. coli*, *E. hartmanni*, y *E. gingivalis*. También se ha reportado a *E. polecki* y a *E. chattoni* en infecciones humanas, aunque este tipo de amibas normalmente están asociadas a cerdos y primates no humanos (7).

Factores de virulencia de *E. histolytica*

Los principales factores que contribuyen a la destrucción celular por parte de *E. histolytica* son (fig. 2.2):

La lectina Gal/GalNAc: es una proteína multimérica de 260 kDa localizada en la membrana celular sobre balsas lipídicas de *E. histolytica* (73). La lectina Gal/GalNAc es un heterodímero compuesto de una subunidad pesada de 170 kDa cuya región extracelular reconoce específicamente residuos de galactosa y N-acetil-galactosamina. A la subunidad pesada se encuentra ligada una subunidad ligera de 31-35 kDa por medio de puentes disulfuro. Esta subunidad ligera es responsable de mediar la adherencia (74).

Esta lectina media la unión a células blanco mediante residuos de galactosa y N-acetil-galactosamina y es fundamental para la adherencia y citotoxicidad. La lectina purificada genera daño en los hepatocitos por contacto directo. Esto se ve reflejado en cambios morfológicos caracterizados por la presencia de núcleos picnoticos que muestran el fenómeno apoptótico (89). Por otra parte las células que no expresan residuos de galactosa o N-acetil-galactosamina son resistentes a la lisis por contacto con *E. histolytica*. Lo mismo ocurre al inhibir esta lectina en la amiba. El parásito se vuelve incapaz de

adherirse y causar citotoxicidad en otras células (126).

Durante el proceso de invasión, la lectina es una molécula importante para establecer el contacto directo con la mucina y ejercer potencial patógeno sobre células hospederas. Ya que la capa de mucina que recubre el epitelio está principalmente formada por glicoproteínas (83), la lectina reconoce los residuos glicosilados de la mucina y además de mediar la adherencia contrarresta la resistencia que imponen las cargas negativas de la mucosa que genera resistencia al trofozoíto (50).

Se ha demostrado que al poner galactosa (Gal) o N-acetyl-D- galactosamina (GalNAc) en el medio se inhibe la adherencia y posterior muerte de células blanco (celulas CHO) por contacto con *E. histolytica*. Esta inhibición no ocurre con otros azúcares como xilosa, manosa o glucosa, incluso cuando se aumenta el contacto por centrifugación. En presencia de Gal y GalNAc se impide la lisis de células blanco por *E. histolytica* (100) (99). Por tanto, se concluye que las moléculas glicoconjugadas son necesarias para la adherencia y la capacidad citolítica de la amiba. Además las células CHO mutantes deficientes de glicosilaciones N u O-terminal son resistentes a la actividad citolítica de la amiba, mientras que células con mayor número de glicosilaciones aumentan la susceptibilidad a la lisis inducida por la amiba (101).

Proteínas formadoras de poros: también llamadas amebaporos. El amebaporo es un péptido formado por 77 aminoácidos, almacenado en las vesículas de las amibas y es transportado al fagosoma o secretado al espacio extracelular donde puede incorporarse a membranas de bacterias o células hospederas(74). Esta enzima proteolítica facilita la invasión de tejidos, permeabiliza la membrana y se inserta sobre la bicapa lipídica de la membrana de la célula diana para así formar canales que difunden agua, iones y pequeñas moléculas generando cambios en el medio interno de la célula y finalmente la lisis por choque osmótico (78). Una función muy importante de este tipo de proteínas es eliminar las bacterias ingeridas dentro de las vacuolas fagocíticas .

Proteasas de cisteína (Proteasas de cisteína (CP)): Estas enzimas actúan sobre varios sustratos del hospedero. Las proteasas de cisteína son las mayores proteínas extracelulares que degradan la matriz extracelular durante la invasión en el intestino (70). Estas proteasas pueden estar presentes en la membrana plasmática, en las vesículas o pueden ser secretadas directamente al espacio extracelular. En *E. histolytica* se han identificado 6 tipos de estas proteasas (Proteasas de cisteína de *Entamoeba histolytica* (EhCP) 1,2,3,4,5 y 112) . Hay fuerte evidencia indicando que EhCP 1, 2 y 3 tienen como función principal la degradación de proteínas que componen la matriz extracelular y facilitan la fagocitosis a través del reclutamiento de vesículas fagocíticas (74). EhCP 2 también actúa sobre la Proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) y la Proteína quimioatrayente de monocitos-4 (MCP-4) reduciendo la migración de monocitos y eosinófilos (49). EhCP 1 y 2 se localizan principalmente en la membrana celular mientras que EhCP 3 se localiza principalmente en el citoplasma, favoreciendo la eri-

trofagocitosis. La presencia de genes homólogos en *E. dispar* y la localización de esta proteasa conduce a la hipótesis que esta enzima puede estar asociada con la digestión de nutrientes más que a la virulencia (107).

La proteasa EhCP 5 está unida a la membrana y está relacionada con funciones tanto de invasión como de evasión del complemento y del sistema inmune (64). EhCP 5 tienen la capacidad de adherirse a inmunoglobulinas G (Inmunoglobulina G (IgG)), inmunoglobulinas A (Inmunoglobulina A (IgA)), y componentes de complemento Componente 3 del complemento (C3) y Componente 5 del complemento (C5) (96). Además *E. histolytica* puede bloquear la respuesta inflamatoria del hospedero por la inactivación de IL-18 (96). Esta proteasa no está codificada en *E. dispar* (131).

EhCP112 es una proteasa de cisteína recientemente identificada sólo en *E. histolytica*, y se encuentra asociada con la adhesina EhADH112 formando el Complejo de Adhesina y proteasa de cisteína de *Entamoeba histolytica* (EhCPADH112) (74). El complejo EhCPADH112 está localizado en la membrana celular y en los fagosomas y participa principalmente en la adhesión (104). Esta adhesina es una glicoproteína involucrada en la función fagocítica de la amiba (48).

Fosfatasa ácida: estas fosfatasas pueden estar sobre la membrana de la amiba Proteasa ácida de membrana (MAP) o ser secretadas hacia el espacio extracelular Proteasa ácida secretada (SAP). Aunque el mecanismo de acción de estas fosfatasas aún no está bien descrito, se ha postulado que actúan sobre fosfoproteínas de las células del huésped involucradas en la adhesión o sobre residuos fosforilados de tirosina que regulan este proceso y esto lleva a la pérdida en la organización de las fibras de actina (3). Se sabe que estas fosfatasas tienen actividad sobre fosfotirosinas, lo que concuerda con la disminución en la fosforilación de tirosina en las células hospederas después de la exposición a trofozoítos de *E. histolytica* (74).

Lectina 220 KDa (L220) y Proteína rica en serina (SREHP): Además de las moléculas nombradas existen otras dos que han sido estudiadas como candidatos para el desarrollo de vacunas. Estas son las proteínas de membrana de 220 kDa (L220) y la proteína rica en serina (SREHP).

- L220 está localizada en la membrana plasmática. Aunque se sabe poco de su función o de los ligandos que reconoce, se sabe que es un receptor tipo lectina y es altamente inmunogénica.
- Proteína rica en serina (SREHP): Se sabe poco sobre el rol fisiológico y el ligando de esta proteína. Sin embargo, se ha demostrado que SREHP participa en la adhesión por las células diana.

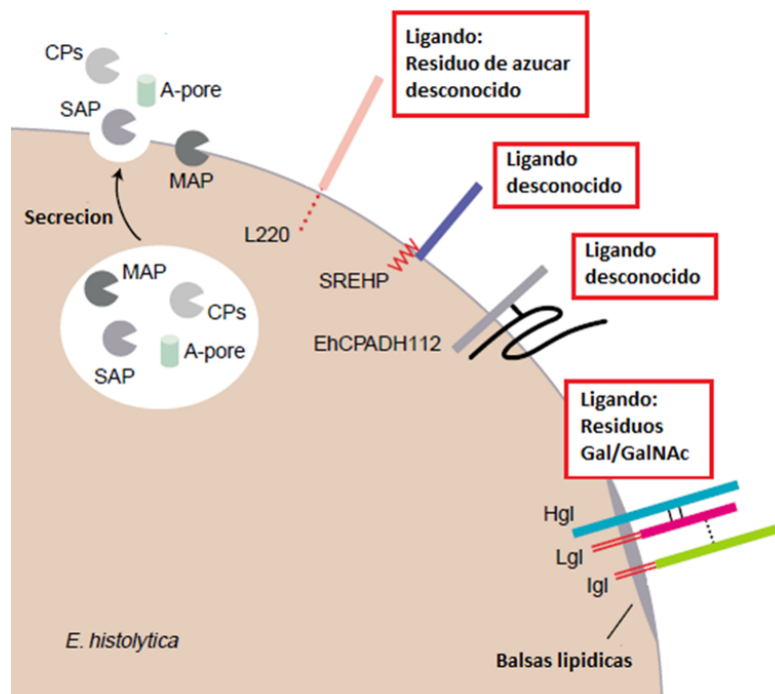


Figura 2.2: Principales factores de virulencia de *E. histolytica*. Imagen tomada y modificada de Laughlin, R et al. (74)

Respuesta inmune a amibiasis

Cuando *E. histolytica* atraviesa la mucosa intestinal e invade el epitelio, la respuesta inmune se activa en el anfitrión. Primero el parásito se adhiere a la capa de mucina del colon a través de la lectina Gal/GalNAc. Después de colonizar, la amiba empieza a destruir componentes de la matriz extracelular. Durante este proceso la amiba puede estar interactuando directa o indirectamente con el sistema inmunológico induciendo la liberación de citocinas pro-inflamatorias, la formación de anticuerpos, y la atracción de neutrófilos y macrófagos.

Liberación de citocinas

Cuando *E. histolytica* inicia el proceso de invasión las células epiteliales responden con la secreción de citocinas pro-inflamatorias como interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ), Ligando de quimiocina (CXCL1, CCL2, CCL3, CCL5), Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) (38) (108) y quimiocinas como Interleucina-8 (IL-8). La liberación de estas citocinas puede rápidamente reclutar y activar neutrófilos y macrófagos, cuando los neutrófilos y macrófagos son activados por IFN- γ o TNF- α tienen actividad amebicida debido a la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (49) (29) (33).

Por otra parte durante la fase inicial de infección por *E. histolytica* la lectina Gal/GalNAc se une a Receptor tipo toll (TLR)-2, TLR-4 de células de la mucosa del colon activando la señalización clásica de estos receptores. La estimulación de TLR-2 y TLR-4 activa NF- κ B y libera más citocinas inflamatorias entre las cuales se encuentran IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ y TNF- α que pueden atraer más neutrófilos. Esta respuesta inmune no se observa con *E. Dispar* (46) (14).

A diferencia de *E. dispar*, *E. histolytica* tiene la capacidad de fagocitar bacterias y también algunas células del hospedero de las que se alimenta. Este proceso limita la respuesta inflamatoria que tenga el hospedero ya que al fagocitar los restos celulares la amiba evita que todo el contenido intracelular se libere y por tanto se restringe la respuesta inflamatoria. Esto favorece que el protozoo establezca una infección permanente antes de despertar una respuesta inmune (75).

Producción de anticuerpos

Los trofozoítos de *E. histolytica* inducen la liberación de anticuerpos tipo inmunoglobulina A (IgA) principalmente en compartimientos asociados con la mucosa. In vitro este tipo de anticuerpos inhibe la adherencia de la amiba a monocapas de células epiteliales. Las IgA también, al reconocer diferentes antígenos de membrana en la amiba,

reducen la actividad proteolítica y pueden inducir actividad amebicida (107).

En la mucosa intestinal las inmunoglobulinas intestinales son el mayor componente en el mecanismo de defensa (87). La presencia de anticuerpos IgA específicos contra lectina Gal/GalNAc en las heces de niños en Bangladesh susceptibles a infección de *E. histolytica* se correlacionaron con una reducción de las tasas de re-infección hasta del 86%. Resultados similares se obtuvieron en pacientes que se habían recuperado de un absceso de amibas en el hígado mostrando que estos pacientes habían desarrollado una respuesta inmune y mantenían una memoria inmunológica (59)(58).

Anticuerpos específicos IgG contra amibas también se han reportado en más del 95% de pacientes con amibiasis o aun en pacientes asintomáticos contagiados con *E. histolytica*, aunque todavía no es claro cuál es el papel de protección de estos anticuerpos. Otro dato importante es que más del 80% de pacientes con amibiasis expresan anticuerpos contra proteasas de cisteína de las amibas (107).

Función de macrófagos

Los macrófagos tienen actividad amebicida después de ser estimulados con $TNF\alpha$ o $IFN\gamma$ y pueden matar amibas por la liberación de óxido nítrico (85) (79). Además el ADN de *E. histolytica* puede activar a los macrófagos vía TLR9 y la lectina Gal/GalNAc de *E. histolytica* regula positivamente la expresión de TLR2 por medio de la activación de $NF-\kappa B$ (67).

Atracción y papel de neutrófilos

La inoculación con trofozoítos de *E. histolytica* en hámsters, es un modelo ampliamente utilizado para estudiar que ocurre durante la infección de *E. histolytica* ya que después de una hora de inoculación el parásito llega ampliamente hasta los lóbulos hepáticos. Se ha observado que en las primeras horas después de la inoculación, el trofozoíto genera la atracción de neutrófilos. Estos neutrófilos forman una o dos capas alrededor de los trofozoítos (fig.2.3a y 2.3b). Después de tres horas son múltiples los focos en donde se observa un trofozoíto rodeado por cientos de neutrófilos (fig.2.3c) y unas pocas células mononucleares. Después de 6 horas de inoculación la cantidad de neutrófilos y de monocitos infiltrados aumenta considerablemente (fig 2.3d). Las amibas se ven rodeadas de neutrófilos y aquellos que tienen contacto directo con la membrana del trofozoíto se ven lisados y con su núcleo lobulado y componentes del citoplasma son indistinguibles (fig. 2.3e). Todo este exudado necrótico de neutrófilos impiden el contacto directo del trofozoíto con células del hospedero y evitan la propagación del parásito. En resumen en las primeras etapas (1 - 48 horas) de invasión de trofozoítos de *E. histolytica* en hígado, hay una alta infiltración de neutrófilos que se ven lisados al tener contacto con el protozoo (27) (28) (120). Por otra parte la inoculación en hámster con trofozoítos de *E. dispar*

produce infiltrados de neutrófilos en menor cantidad que *E. histolytica* son visibles hasta siete días después de la inoculación (40) (119). En una etapa más tardía (3 a 7 días) y una vez que ya se han formado infiltrados de neutrófilos y hay lisados de estas células, empieza a aumentar la cantidad de macrófagos que se localizan en la periferia de los infiltrados. Finalmente, en una última etapa aumenta la cantidad de linfocitos (29) (88).

Por otra parte los trofozoítos previamente fijados, inactivados con calor o por pH aunque fueron rodeados por neutrófilos en un menor porcentaje, éstos no son lisados. En todos los ensayos realizados es poco común ver que los trofozoítos tuvieron contacto directo con células hepáticas (120) (28) (119).

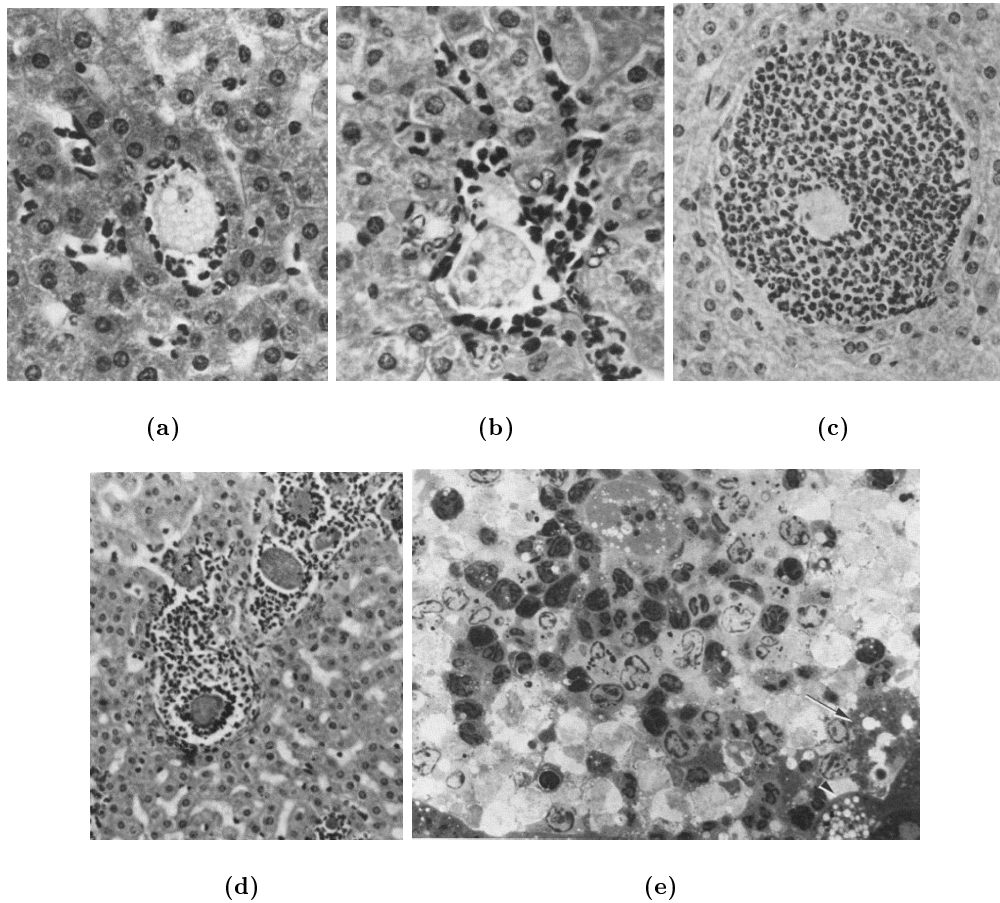


Figura 2.3: Atracción de neutrófilos hacia *E. histolytica* en modelos animales inducidos por la inoculación de trofozoítos de *E. histolytica*. a y b) 1 h después de la inoculación, c) 3 h después de la inoculación, d) 6 h después de la inoculación y e) 6 h después de inoculación a un mayor aumento. Imagen tomada de TSUTSUMI et al. 1984 (120).

2. MARCO TEÓRICO

Así mismo en biopsias humanas de pacientes sintomáticos se han encontrado resultados similares a los obtenidos en modelos animales. Los trofozoítos se encuentran rodeados de neutrófilos y no se evidencia contacto directo de *E. histolytica* con células epiteliales del colon. También se observa que en zonas donde están presentes *E. histolytica* y neutrófilos hay una firme adhesión célula-célula y esto causa la lisis de los neutrófilos. En estas biopsias (fig. 2.4a) se ve que las amibas son atrapadas en el exudado necrótico lo que posiblemente impide la propagación del parásito y el contacto con las tejido del colon y es visible que zonas donde hay mayor cantidad de trofozoítos también aumenta el número de neutrófilos (fig 2.4b). También se ha reportado que los neutrófilos que son fagocitados por *E. histolytica* se sin membrana nuclear y con algunos residuos de cromatina aunque todavía se mantiene la membrana celular completa (52).

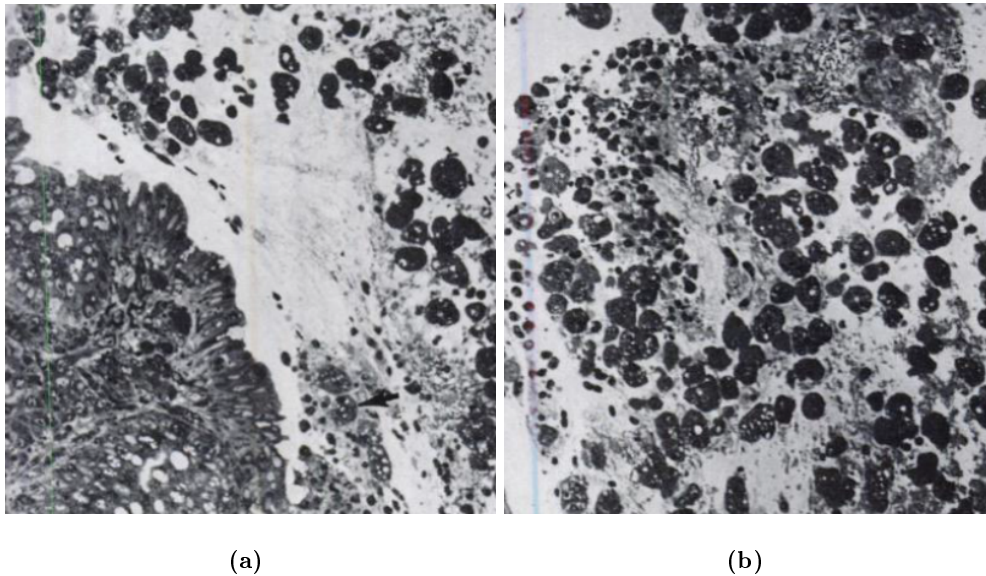


Figura 2.4: Biopsias de epitelio del colon de pacientes con amibiasis. a) Amibas rodeadas de exudado necrótico de células inflamatorias (flecha), b) sección de la periferia del colon con mayor contenido de amibas y mayor número de células inflamatoria. Imagen tomada de GRIFFIN JOE L. 1972. (52)

Por otra parte en modelos in vivo usando algunas cepas de ratón resistentes a la infección por *E. histolytica* se encontró que al realizar la eliminación de neutrófilos con el uso de anticuerpos monoclonales, los ratones eran menos resistentes a una invasión por *E. histolytica*. En estos ensayos se encontró que los neutrófilos facilitan la rápida limpieza del parásito en el intestino, impiden que aumente el número de amibas en el intestino y evitan que haya una rápida formación de granulomas (103) (65). Por tanto en este tipo de ensayos se encontró que los neutrófilos tienen un papel protector fundamental en las primeras etapas de la infección y evitan el daño hepático también

en las primeras etapas de la infección (9).

Neutrófilos

Los neutrófilos denominados así por su tendencia a retener colorantes neutros o también denominados células Polimorfonucleares (PMN) son glóbulos blancos (leucocitos) que constituyen aproximadamente el 60 % de todos los leucocitos (82). Los neutrófilos son liberados de la médula ósea al torrente sanguíneo y en ausencia de infección éstos viven entre 6 y 8 horas. Durante una infección o proceso inflamatorio, los neutrófilos son dirigidos por citocinas hacia el sitio afectado para atacar a los microorganismos, siendo de esta manera la primera línea de defensa del organismo frente a una infección (8). Los neutrófilos son granulocitos que por definición contienen gránulos en su citosol que contienen principalmente moléculas con actividad antimicrobiana (8). Para combatir las infecciones los neutrófilos utilizan tres estrategias diferentes: la fagocitosis y posterior eliminación del patógeno internalizado; degranulación que implica la liberación de sustancias antimicrobianas y la liberación de estructuras fibrilares de ADN denominadas redes extracelulares de neutrófilos (NETs)(21).

Estrategias antimicrobianas de los neutrófilos

Degranulación

Los neutrófilos también son nombrados granulocitos por los gránulos que contiene en su interior, se han descrito tres tipos de gránulos en los neutrófilos (42):

Gránulos primarios o Azurófilos: Son los primeros en formarse durante la maduración del neutrófilo. Contienen Mieloperoxidasa (MPO), catepsina G, defensinas, lisozimas, Proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad (BPI), elastasa y proteinasa 3.

Gránulos secundarios o específicos: estos gránulos se forman después de los primarios. Contienen lactoferrina, lisozimas y lipocalina asociada con la Lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos (NGAL)

Gránulos terciarios: son los últimos en formarse y los más pequeños. Estos gránulos almacenan metaloproteasas como la gelatinasa y la leucolisina.

Hay un cuarto tipo de estructuras que son las vesículas secretoras y son comúnmente consideradas dentro de la familia de los gránulos. Sin embargo no se forman desde el aparato de Golgi, sino que son formadas por endocitosis en la etapa final de la ma-

duración, por tal razón contienen proteínas provenientes del plasma como albumina (18).

Cuando los neutrófilos son activados los gránulos son movilizados y se fusionan con la membrana celular liberando su contenido al medio extracelular. Los diferentes tipos de gránulos son movilizados de forma diferente dependiendo del estímulo. Los gránulos primarios son los más difíciles de mover, seguidos de los gránulos secundarios, después los gránulos terciarios y finalmente las vesículas secretoras. La expulsión de estas proteínas contenidas en los gránulos puede matar a los microorganismos por las mismas propiedades antimicrobianas de las proteínas expulsadas (8).

Fagocitosis

Este es el principal mecanismo para remover patógenos y restos celulares. Es un proceso mediado por receptores celulares, en donde la partícula puede ser detectada por receptores que reconocen Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o reconocer opsoninas. Las opsoninas son moléculas del organismo que se unen a la superficie de microorganismos para que sean fácilmente detectados por las células fagocíticas. Después de ser reconocida por los respectivos receptores celulares, la partícula es internalizada desde la membrana celular hacia una vesícula llamada fagosoma (121). En esta etapa el fagosoma naciente es relativamente benigno con el microorganismo, adquiere sus propiedades letales sólo después de un proceso de maduración. El proceso de maduración ocurre después de la fusión del fagosoma con los gránulos del neutrófilo, simultáneamente se ensambla el complejo NADPH oxidasa en la membrana fagosomal lo que favorece la producción de especies reactivas de oxígeno. De esta forma se crea un ambiente tóxico para la mayoría de los microorganismos (77).

NETs

En el 2004 el grupo de Brinkman y Zychlinsky fue el primero en reportar la liberación de redes extracelulares de neutrófilos NETs. Las NETs son estructuras compuestas de cromatina sobre la cuales hay histonas y proteínas antimicrobianas provenientes de los gránulos del neutrófilo y del citoplasma. Algunas de las proteínas antimicrobianas descritas en las NETs son: proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad BPI, mieloperoxidasa (MPO), catepsina G, lactoferrina, gelatinasa, Proteína de reconocimiento de peptidoglicanos (PGRP)s, calprotectina, elastasa y proteinasa 3 (21). Además la misma cromatina e histonas tienen actividad antimicrobiana intrínseca (57) (75).

En las NETs la presencia de histonas sobre estas estructuras indica que el mayor componente es cromatina nuclear y no mitocondrial. Este tipo de estrategia antimicrobiana permite crear un microambiente concentrado en proteínas antimicrobianas sobre el cual va a quedar atrapado el microorganismo lo que al mismo tiempo va a impedir su propagación (102) (135).

En el proceso de formación de NETs, las células mueren por un proceso de muerte programada diferente a la apoptosis o a la necrosis, y por tanto el proceso se ha denominado NETosis (21). En la NETosis no se observan los cambios morfológicos típicos de la apoptosis, como las burbujas de membrana, la exposición de fosfatidilserina en la membrana externa, o la fragmentación del ADN en el núcleo. Tampoco se observa la activación de caspasas. Los cambios morfológicos observados son primero la pérdida de la forma lobulada del núcleo, la heterocromatina y eucromatina se homogenizan, seguido de la ruptura de la membrana nuclear, mientras los organelos citoplásmicos permanecen intactos y finalmente después de unas 3 horas ocurre la ruptura de la membrana extracelular y la liberación de las NETs (21) (32).

La NETosis con una duración de 2-4 h, es el modelo mejor descrito, comienza con la activación de neutrófilos por estímulos como el PMA. Esto conduce a la activación del complejo de NADPH oxidasa (NOX) a través de una vía de señal que involucra a la proteína quinasa C (PKC) y la activación de la vía Raf / MEK / ERK (56), así como el aumento de Ca^{++} citosólico. El Ca^{++} actúa como cofactor para la Peptidil arginasa desaminasa (PAD4), una enzima nuclear que promueve la citrulación de las histonas, modificando así los aminoácidos para permitir la descondensación de la cromatina promoviendo la pérdida de las cargas positivas necesarias para la interacción de las histonas con el ADN (128). Además la formación de NETs depende de la elastasa y la mieloperoxidasa transportadas desde los gránulos hasta el núcleo (90). Originalmente se reportó que la producción de especies reactivas de oxígeno era indispensable para la liberación de NETs (44); sin embargo esta visión ha venido cambiando (81)(20).

Se han descrito numerosos microorganismos que pueden inducir la liberación de NETs, entre los cuales se encuentran bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*; hongos como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*; y protozoos como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium falciparum*, *Eimeria bovis* y *Leishmania spp* (21) (97) (17) (22)(123) (55). *Toxoplasma gondii* también tiene la capacidad de inducir NETs y se ha encontrado evidencia que la vía de señalización para este parásito es Raf/MEK/ERK (1). Además se ha encontrado que *Leishmania donovani*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* tienen la capacidad de liberar NETs en un proceso independiente de la activación de NADPH oxidasa (45) (86) (24) (94).

Liberación de NETs por *E. histolytica*

Recientemente se reportó que *E. histolytica* puede inducir la liberación de NETs (12) (125). Las NETs no afectan significativamente la viabilidad ni el crecimiento de los trofozoítos de *E. histolytica*. También se reportó que el lipopeptidofosfoligano (LPPG), un componente de membrana de los trofozoítos, induce NETs desde los primeros minutos de estimulación (12). Además se observó que los trofozoítos de *E. histolytica* que no quedan atrapados en las NETs pueden fagocitar neutrófilos (125).

Hipótesis

- Los neutrófilos estimulados con *E. dispar* liberan NETs.
- La viabilidad y movilidad de la amiba son factores determinantes en la formación de NETs.
- La formación de NETs inducidas por amibas implica la participación de lectinas.
- El mecanismo de formación de estas NETs inducidas por *E. histolytica* y *E. dispar* es similar a la vía de transducción descrita para PMA.

Objetivo general

Determinar los mecanismos moleculares necesarios para que los neutrófilos liberen NETs en presencia de *E. histolytica* y de *E. dispar*.

Objetivos específicos

- Determinar si *E. dispar* induce la formación de NETs.
- Determinar si *E. histolytica* fijada induce la formación de NETs.
- Ver si la movilidad de *E. histolytica* es importante en la formación de NETs.
- Probar si la adición de azúcares al medio interfiere en la formación de NETs.
- Ver la formación de NETs inducidas por *E. histolytica* en presencia de varios inhibidores de moléculas implicadas en vías de señalización del neutrófilo.
- Determinar vía de señalización en la formación de NETs inducidas por *E. histolytica* y *E. dispar*.

Metodología

Purificación de neutrófilos

Los neutrófilos se obtienen a partir de muestra de sangre de personas sanas. Se obtiene una muestra de 10 ml de sangre periférica fresca, a la cual se le adiciona una disolución de DEXTRAN (6 %) y heparina. El DEXTRAN favorece la aglutinación de los eritrocitos los cuales sedimentan. Con esto se forman dos fases. Una es plasma con los leucocitos y la otra es el sedimentado de eritrocitos. A partir del plasma los neutrófilos son separados por gradiente de densidad usando Ficoll-Paque. El plasma rico en neutrófilos se adiciona suavemente sobre el Ficoll-Paque formando dos capas y esto se centrifuga a 516 x g por 20 minutos a 4 °C. El botón obtenido es sometido a un choque hipotónico para lisar los eritrocitos que permanecieron allí. Finalmente los neutrófilos son resuspendidos en Solución buffer de fosfato (PBS) (47).

Cultivo de amibas

Los trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM-1:IMSS y *E. dispar* cepa SAW760 son de cultivos axenicos (35). Las amibas usadas se crecieron en medio TYI-S-33 durante 72 horas de cultivo, y fueron donadas por el Doctor Julio Cesar Carrero del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Cuantificación de NETs por estimulación con *E. histolytica* y *E. dispar*

Los neutrófilos fueron resuspendidos en medio RPMI 1640 suplementado y con SYTOX GREEN a una concentración de 500 nM. Luego fueron pretratados con distintos inhibidores: inhibidor de PKC convencionales (GÖ6976 1 μ M); inhibidor de NADPH

4. METODOLOGÍA

oxidasa (DPI 10 μM); inhibidor de Raf (GW5074 100 μM), inhibidor de MEK (U0126 50 μM), inhibidor de IKK (Bay 11-7082 5 μM); inhibidor de PI3K (wortmannin 50 nM); inhibidor de Syk (Piceatanol 50 μM , iSyk 1 μM), inhibidor de p38MAPK (SB 203580 200 nM); inhibidor de TAK-1 (LLZ 1640-2 10 nM) o sin inhibidor durante 30 minutos en hielo. Los neutrófilos fueron luego transferidos a una placa de 96 pozos y se incubaron 20 minutos a 37°C para que se adhirieran al fondo de la placa. Posteriormente los neutrófilos fueron estimulados con *E. histolytica*, *E. histolytica* fijada, *E. histolytica* pretratada con citocalasina B (1.2 mg/ml), *E. dispar* o PMA (20 nM). El SYTOX GREEN es un colorante específico para ADN que emite fluorescencia al unirse con el ADN. La medición de fluorescencia se realizó durante 4 horas a 37 °C, realizando lecturas cada 5 minutos en un lector de placas (Bio-tek synergy HT).

Degranulación de neutrófilos en presencia de *E. dispar* y *E. histolytica*

La degranulación de los neutrófilos en presencia de *E. dispar* y *E. histolytica* fue medida por la actividad enzimática de la mieloperoxidasa (MPO) presente en el medio donde los neutrófilos fueron tratados con *E. dispar* o *E. histolytica*. Los neutrófilos fueron previamente tratados con citocalasina B, posteriormente se incubaron en presencia de *E. dispar*, *E. histolytica* o N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLF) 10 μM , durante 15 y 45 minutos. Después de estos tiempos, el sobrenadante se recolectó y en él se midió la actividad enzimática de la MPO. Se adicionó o-dianisidina (sustrato de la MPO) a una concentración final de 2 mM y H₂O₂ 7,5 mM. El cambio de coloración por oxidación del sustrato indica la presencia de MPO. La absorbancia del medio fue medida en un lector de placas a una longitud de onda de 410 nm.

Microscopía de fluorescencia de NETs

Los neutrófilos resuspendidos en medio RPMI 1640 (Gibco, Grand island NY USA), fueron pretratados con distintos inhibidores (DPI, GÖ6976, GW5074, PD98056, U0126, BAY 117082, wortmannin, Piceatanol, SB 203580 y LLZ 1640-2) o sin inhibidor durante 30 minutos en hielo. Posteriormente los neutrófilos fueron transferidos a una placa de 24 pozos y estimulados con *E. histolytica*, *E. dispar* o PMA durante 4 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Después de transcurridas las 4 horas las células fueron fijadas con Paraformaldehído (PFA) al 1% toda la noche. El fijador fue removido y las células fueron teñidas con el colorante 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) específico para ADN y permeable a las membranas celulares. La placa fue observada en un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX-70.

Toma de videos

Los neutrófilos fueron resuspendidos en medio RPMI 1640 suplementado (suero fetal bovino al 5 %) y con SYTOX GREEN a una concentración de 500 nM. Al medio se le adicionó azúcares (galactosa, manosa, glucosa) a una concentración de 222 mM. Luego, los neutrófilos fueron transferidos a una placa de 24 pozos y se incubaron 20 minutos a 37°C y 5 % de CO₂ para que se adhirieran al fondo de la placa. Posteriormente los neutrófilos fueron estimulados con *E. histolytica*, *E. histolytica* fijada, *E. histolytica* pretratada con citocalasina B (1,2 mg/ml). Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX-70 (Center Valley, PA). Imágenes de las células se capturaron con una cámara (Evolution VF Color Cooled MediaCybernetics) usando el programa QCapture Pro 6.0 (Qimaging surrey, BC Canadá). Las imágenes se capturaron cada 30 segundos hasta completar 150 minutos. Las imágenes tomadas son en campo claro con fluorescencia.

Medición de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Cinética de fluorescencia

Para estos ensayos se usó un Kit de Abcam (ab113851) para detección de especies reactivas de oxígeno, usando como marcador fluorescente el compuesto diacetato de 2',7'-diclofluoresceína (DCFDA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los neutrófilos fueron pretratados con el colorante DCFDA a una concentración de 15 μ M durante 30 minutos en oscuridad a 37 °C. Posteriormente los neutrófilos se lavaron, se transfirieron a una placa de 96 pozos, se incubaron durante 20 minutos a 36 °C y luego se estimularon con *E. histolytica*, *E. dispar* o PMA. La fluorescencia se midió continuamente durante un periodo de 2 horas en un lector de placas (Bio-tek synergy HT).

Citometría de flujo

Los neutrófilos fueron pretratados con el colorante fluorescente 123-dihidrorodamina (DHR 123) a una concentración de 10 μ M durante 30 minutos a 37°C en la oscuridad. Luego, los neutrófilos fueron estimulados con *E. histolytica* o PMA durante 1 hora y posteriormente fijados con 1% PFA. Finalmente se midió la fluorescencia usando citometría de flujo (BD FACSCalibur).

Microscopía de fluorescencia

Los neutrófilos fueron pretratados con el colorante fluorescente Dihidroetidium (DHE) a una concentración de 10 μ M durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad. Posteriormente

4. METODOLOGÍA

las neutrófilos fueron lavados y transferidos a una placa de 24 pozos. Luego los neutrófilos fueron estimulados con *E. histolytica* o PMA durante 1 hora a 37°C y 5 % de CO₂. Finalmente se tomaron imágenes de fluorescencia en microscopio invertido.

Western blot

Los neutrófilos se resuspendieron en 100 μ l de PBS y luego se estimularon con *E. histolytica* durante 1, 2, 5, 10 y 15 minutos. Posteriormente se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se congelaron inmediatamente. El botón se resuspendió en buffer de lisis (150 mM NaCl, 5 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 50 mM HEPES, 0.5 % desoxicolato de sodio, 1 % Nonidet P-40, pH 7,4) con inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail) según especificaciones del proveedor inhibidores de fosfatasas Thermo Scientific Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail), durante 20 minutos en hielo. El lisado se centrifugó a 13000 x *g* durante 5 minutos. El sobrenadante se separó en un tubo limpio y luego se mezcló con tampón de carga (tampón Tris base 50 mM pH 6.8, SDS 6 %, Glicerol 30 %, Azul de bromofenol 0,04 %). Las proteínas en el lisado celular se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10 %. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). La transferencia se realizó a 500 mV durante 1 hora. Luego la membrana fue bloqueada en una disolución de leche al 5 % en solución salina tamponada con Tris (10 mM pH 7,5) y Tween-20 (0.1 %) (TTBS), durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de esto, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente durante 1 noche a 4°C. Al siguiente día, la membrana se lavó seis veces con TTBS y luego se le adicionó el anticuerpo secundario correspondiente. La membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, la membrana se lavó seis veces con TTBS y finalmente se reveló usando el reactivo de luminiscencia (EMD Millipore Sustrato de HRP quimioluminiscente Western Immobilon (ECL)) y exponiendo la membrana a una película fotográfica (película radiográfica sensible al azul, Marca Juama S.A.)

En otros ensayos del mismo tipo los neutrófilos se fueron previamente tratados con diferentes inhibidores: inhibidor de Raf (GW5074 100 μ M), inhibidor de MEK (U0126 75 μ M), inhibidor de IKK (Bay 11-7082 5 μ M) durante 30 minutos en hielo o sin inhibidor y luego se estimularon con *E. histolytica* durante 2 y 5 minutos. Estas muestras se usaron para realizar los respectivos Western blot.

Ensayos de viabilidad de *E. histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* fueron lavados y resuspendidos en medio RPMI 1640. En el medio se añadió diferentes inhibidores (DPI, GW5074, U0125, BAY 11-7082) o azúcares (manosa, galactosa y glucosa 220 mM). Los trofozoítos se incubaron a 37 °C. Durante la primera hora se tomó una alícuota de suspensión de amibas cada 15

minutos y ésta se mezcló con azul tripano en una relación 1:1. Posteriormente se contó en microscopio las células teñidas y sin teñir.

Resultados

Formación de NETs inducidas por *Entamoeba histolytica*

Al exponer los neutrófilos a *E. histolytica*, en presencia del colorante Sytox Green, se observó un aumento de fluorescencia que corresponde a ADN liberado. Los neutrófilos que no fueron estimulados no liberaron ADN, mientras los neutrófilos que se estimularon con PMA empezaron a liberar NETs después de dos horas de estimulación. Por otra parte cuando los neutrófilos son estimulados con *E. histolytica* se liberan NETs desde los primeros minutos de estimulación y alcanza su máximo valor después de dos horas. *E. histolytica* en ausencia de neutrófilos no emite fluorescencia durante el tiempo de medición (Fig. 5.1) .

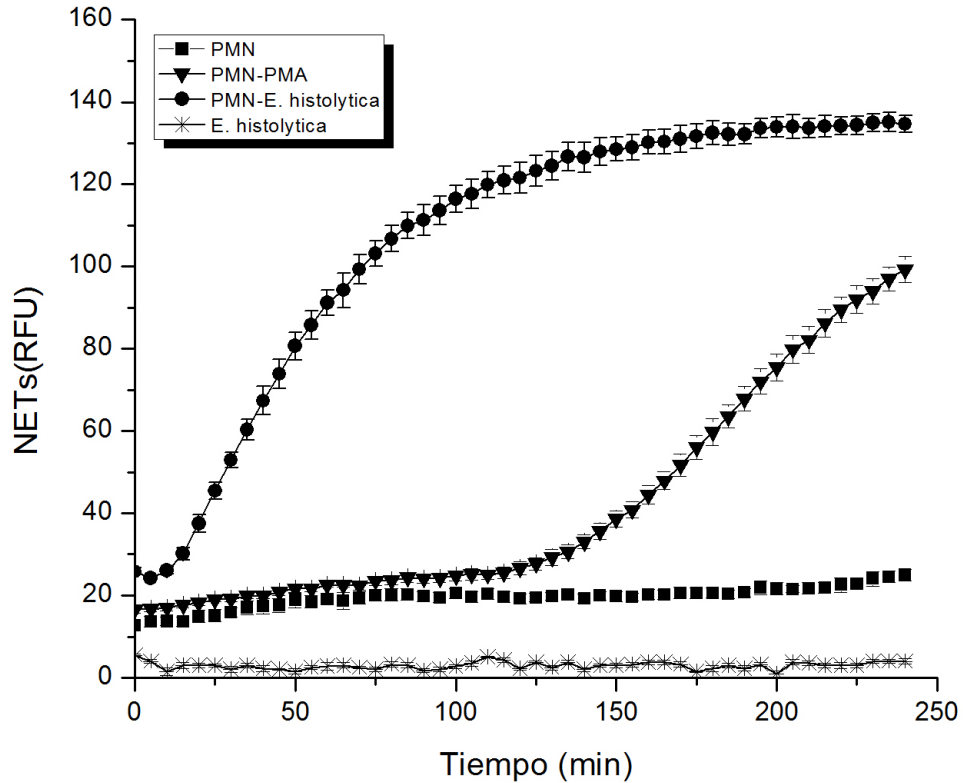


Figura 5.1: Formación de NETs inducidas por *Entamoeba histolytica*. Neutrófilos en presencia de estímulo durante 4 horas a 37 °C en medio RPMI y SYTOX GREEN (500 nM). Los neutrófilos no se estimularon, se estimularon PMA (20 nM) o con trofozoítos viables de *Entamoeba histolytica*. Relación de amibas: neutrófilos fue de 1:20. (n=3)

En Imágenes tomadas por microscopía en campo claro y fluorescencia, después de 4 horas de estimulación y realizando la tinción de ADN con DAPI, se observa que los neutrófilos sin estimular no formaron NETs, no están aglomerados y mantienen su núcleo compacto (Fig. 5.2a). Los neutrófilos estimulados con PMA formaron NETs como ya está descrito (Fig. 5.2b). Cuando los neutrófilos son estimulados con los trofozoítos de *E. histolytica* se forma una red de ADN sobre la cual quedan pegadas las amibas, las cuales permanecen enteras. (Fig. 5.2c). La liberación de NETs al estimular con *E. histolytica* es mucho más intensa que al estimular con PMA. Estos datos concuerda con los obtenidos en la cinética de formación de NETs (Fig. 5.1). Las fibras de ADN literalmente forman una red sobre la cual las amibas quedan atrapadas. Los trofozoítos se ven completamente cubiertos de ADN (Fig. 5.2 d-e).

5. RESULTADOS

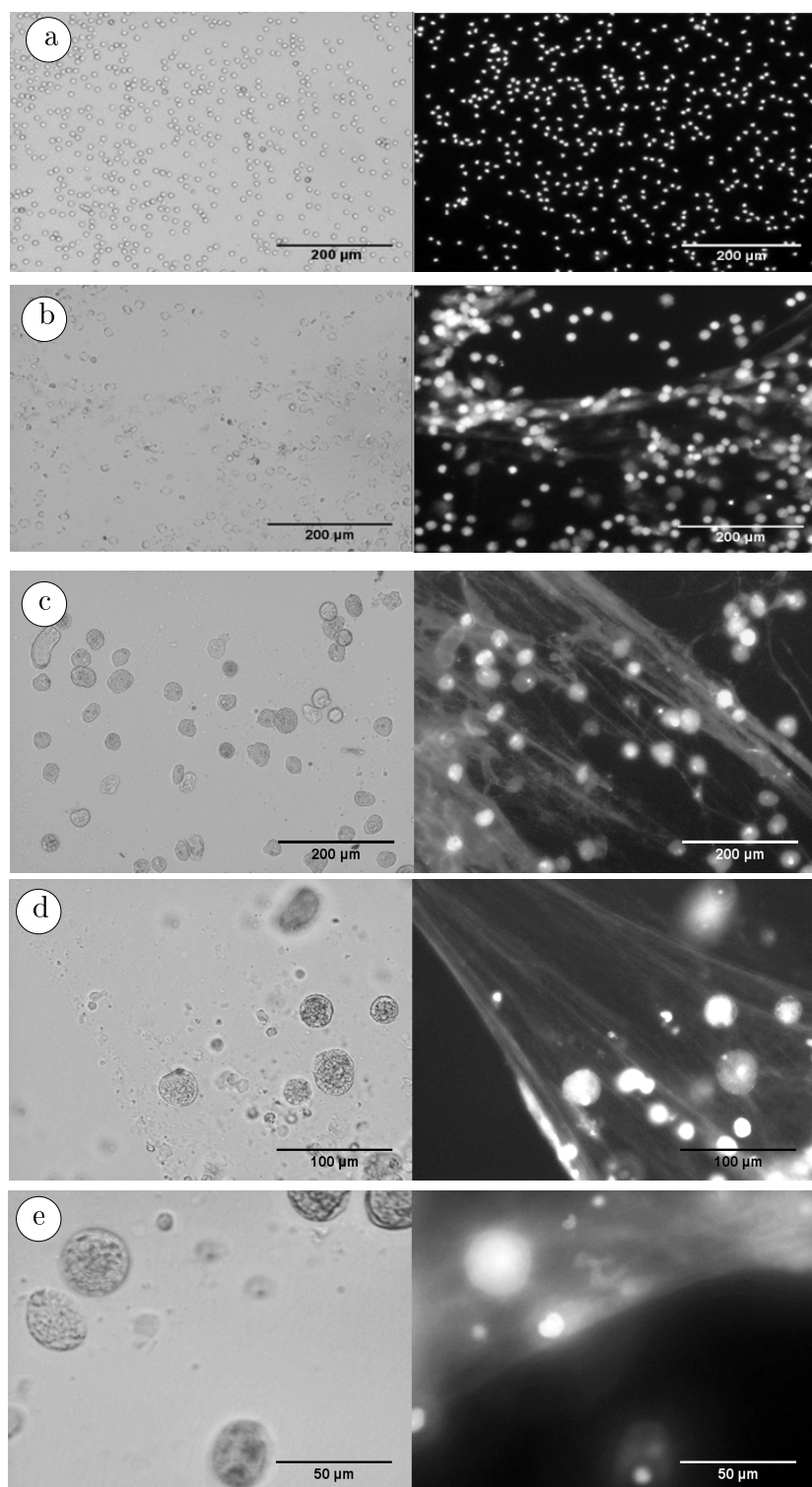


Figura 5.2: Microscopia en campo claro y fluorescencia usando tinción con DAPI. a) neutrófilos sin estímulo. b) neutrófilos estimulados con PMA. c, d, y e) neutrófilos estimulados con *E. Histolytica* a aumento de 10 X, 20X y 40X, respectivamente

Para ver como se forman las NETs al pasar el tiempo, se tomaron imágenes cada 30 segundos durante dos horas y media. Aquí se muestran algunas de ellas a diferentes tiempos: 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1 hora y 30 minutos, 2 horas, y 2 horas y 30 minutos. Inmediatamente después de poner las amibas a la placa donde se encuentran los neutrófilos, se observa que unos pocos neutrófilos rodean a algunas amibas (Fig. 5.3a), 15 minutos después la cantidad de neutrófilos en el campo es mayor y algunos de los polimorfonucleares que están sobre las amibas empiezan a liberar redes (Fig. 5.3b). Cuando transcurre media hora todos los neutrófilos que han tenido contacto con la amiba liberan NETs, hay algunas amibas que tienen más neutrófilos alrededor que otras (parte superior izquierda), curiosamente las amibas que tienen más neutrófilos alrededor son aquellas que más se han desplazado en el campo (Fig. 5.3c). A los 45 minutos la cantidad de NETs liberadas va en aumento. Las amibas que se han desplazado han arrastrado con ellas a los neutrófilos que se le han adherido y a las NETs que éstos han liberado (Fig. 5.3d). Después de una hora la cantidad de NETs sigue aumentando y se observan a todas las amibas cubiertas de ADN (Fig. 5.3e). Una hora y media más tarde sigue en aumento la cantidad de NETs y se ve más ADN liberado de los neutrófilos adheridos a las amibas que más se han desplazado (Fig. 5.3f). A las dos horas hay bastantes NETs, y los neutrófilos que no tuvieron contacto con las amibas no liberaron NETs (Fig. 5.3g). Después de las dos horas y media ya se ha liberado la mayor parte de las redes (Fig. 5.3h).

Se tomaron imágenes a un mayor aumento para observar más de cerca cómo era la liberación de NETs sobre las amibas. Primero los neutrófilos se adhieren a la membrana del trofozoíto formando rosetas (Fig. 5.4a). Después los neutrófilos alrededor de la amiba empiezan a liberar ADN (Fig. 5.4b-c). Más tarde y muy interesante el ADN liberado por el neutrófilo empieza a rodear a la amiba que se está desplazando en el campo (Fig. 5.4d). Luego el ADN que se libera del neutrófilo rodea a toda la amiba como una especie de pinza que disminuye el desplazamiento del trofozoíto (Fig. 5.4e-f).

5. RESULTADOS

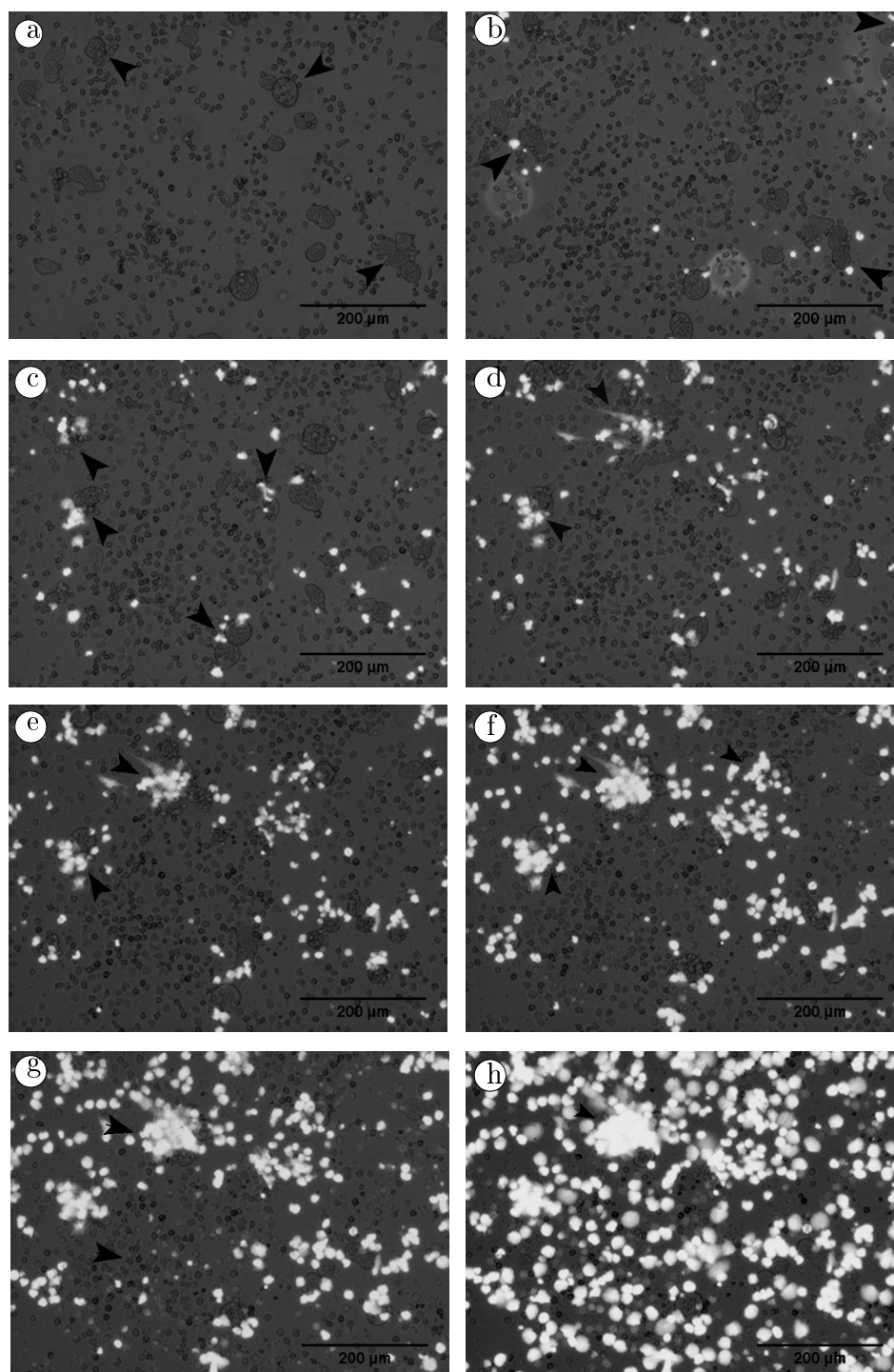


Figura 5.3: Formación de NETs inducidas por *E. histolytica* en el tiempo, tinción de ADN con SYTOX GREEN (500 nM). Aumento 10x. a) 0 minutos (flechas indican la formación de rosetas sobre las amibas), b) 15 minutos, c) 30 minutos, d) 45 minutos, e) 1 hora, f) 1 hora y 30 minutos, g) 2 horas, h) 2 horas y 30 minutos. (Las flechas indican la liberación de ADN sobre los trofozoítos)

5.1 Formación de NETs inducidas por *Entamoeba histolytica*

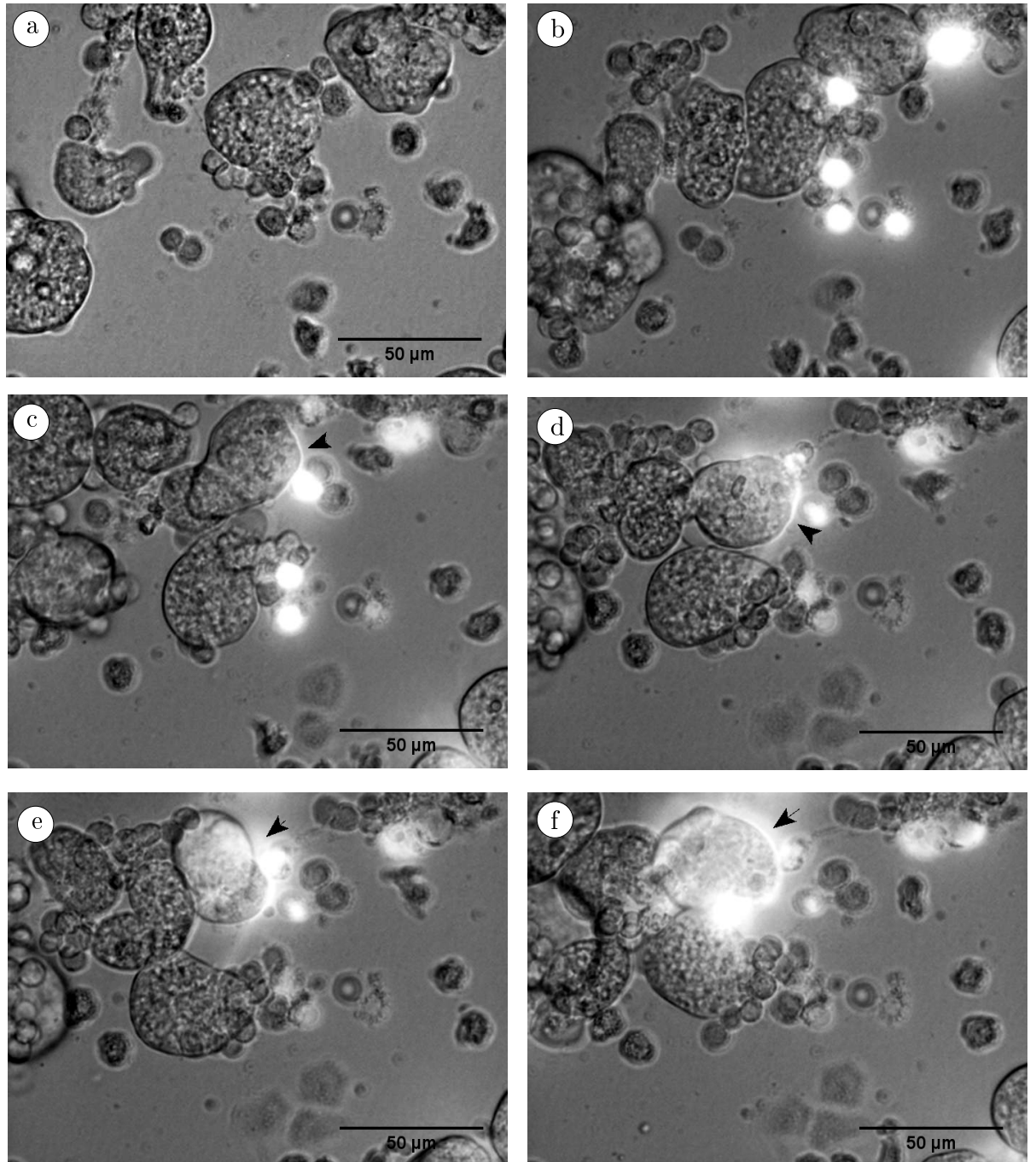
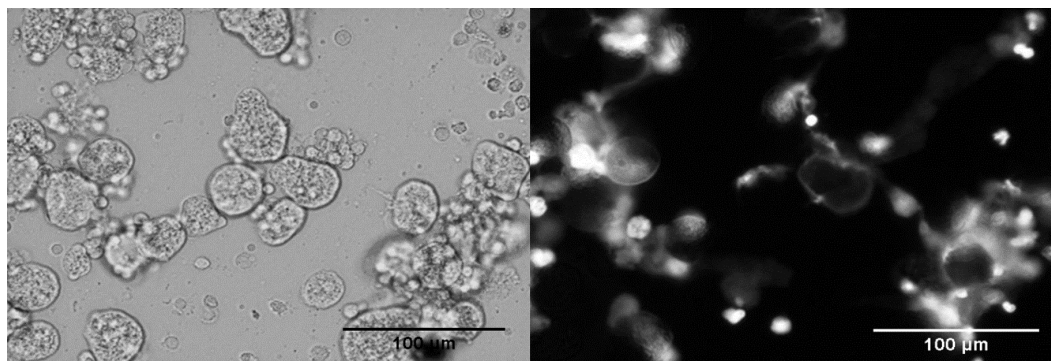


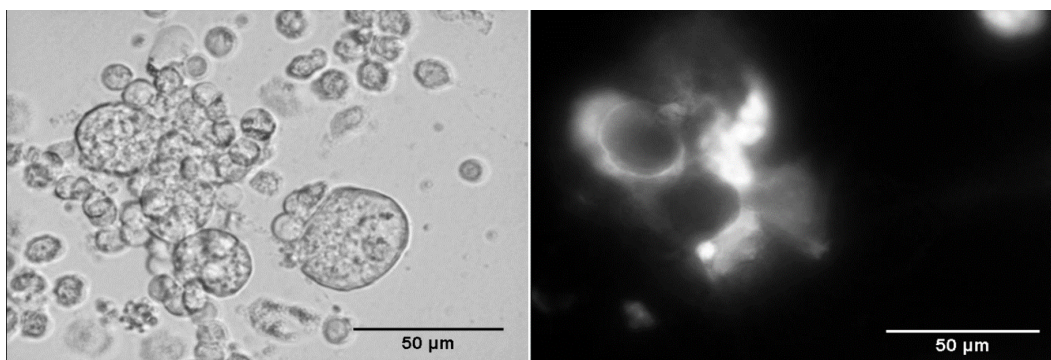
Figura 5.4: Formación de NETs inducidas por *E. histolytica* diferentes etapas. Tinción de ADN con SYTOX GREEN (500 nM) y aumento de 40 x. (las flechas muestran la liberación de ADN sobre el trofozoíto).

5. RESULTADOS

En imágenes tomadas después de dos horas y media en campo claro y fluorescencia usando como agente fluorescente SYTOX GREEN, muestran de nuevo como el ADN se libera de los neutrófilos envuelve a las amibas, algunas amibas se ven completamente cubiertas de ADN, mientras las amibas que no tienen neutrófilos adheridos a su membrana no tienen ADN sobre su superficie (Fig. 5.5).



(a)



(b)

Figura 5.5: Formación de NETs inducidas por *E. histolytica* en diferentes etapas. Tinción de ADN con SYTOX GREEN (500 nM) y aumento de 40 x. (las fechas muestran la liberación de ADN sobre el trofozoíto)

Respuesta de neutrófilos a *E. dispar*

Entamoeba dispar no induce la liberación de NETs

La estimulación de neutrófilos con *E. dispar* no indujo la liberación de NETs (Fig. 5.6). La curva de fluorescencia que indica ADN liberado se superpone con la curva de

neutrófilos que no fueron estimulados (Fig. 5.6). Al estimular los neutrófilos al mismo tiempo con los dos tipos de amibas (*E. histolytica* y *E. dispar*) no hay disminución en la intensidad de fluorescencia comparada con los neutrófilos estimulados sólo con *E. histolytica*. Por otra parte *E. dispar* no emite fluorescencia durante el tiempo que se llevó a cabo el experimento (Fig. 5.6).

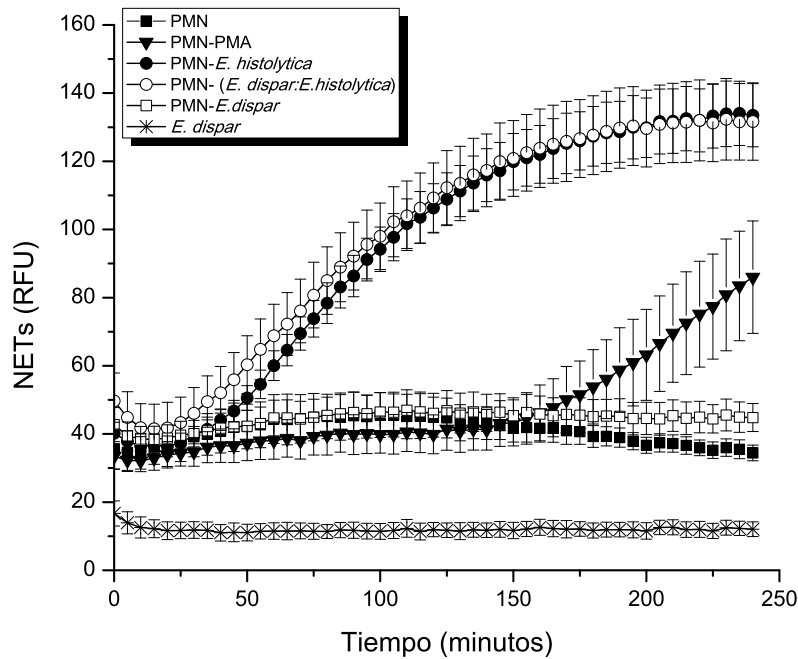
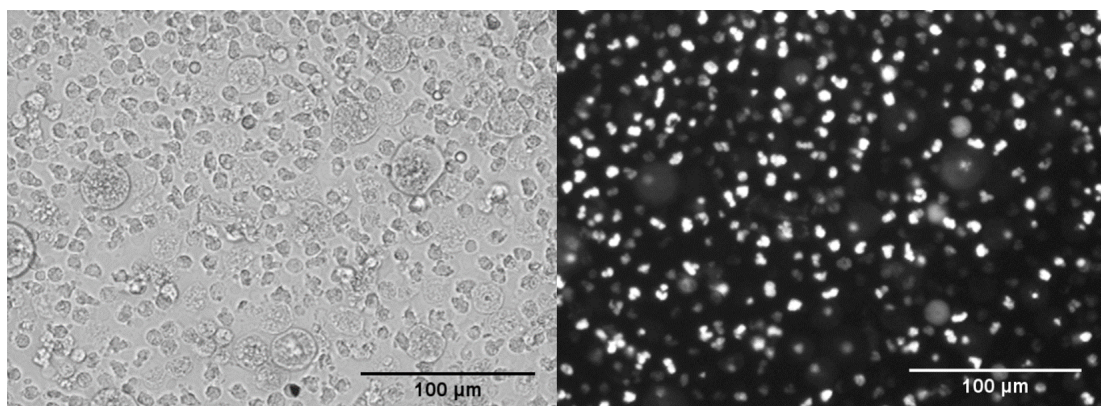


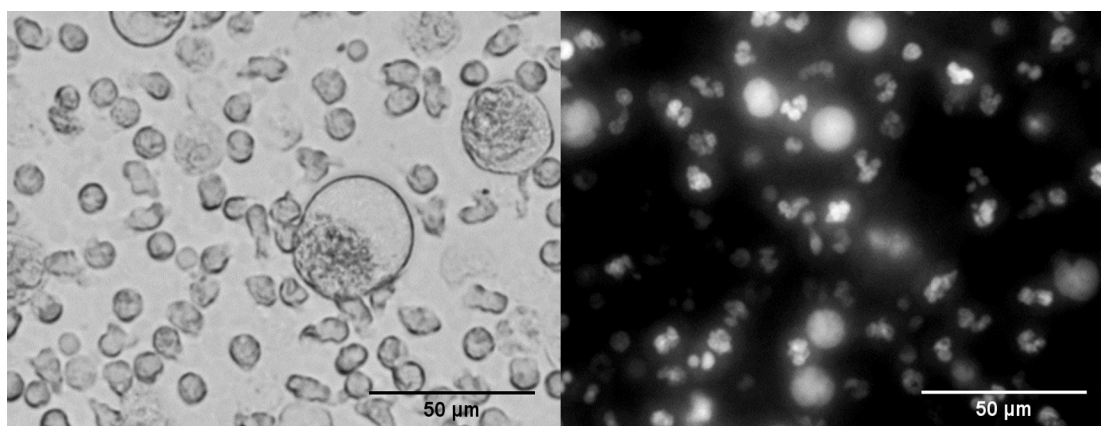
Figura 5.6: Formación de NETs inducidas por *Entamoeba dispar*. Neutrófilos en presencia de estímulo durante 4 horas a 36 °C en medio RPMI y SYTOX GREEN (500 nM). Los neutrófilos no se estimularon, se estimularon PMA (20 nM), con trofozoítos viables de *E. histolytica*, con trofozoítos viables de *E. dispar* o en conjuntos con trofozoítos de *E. dispar* y *E. histolytica*. Relación de amibas: neutrófilos fue de 1:20. (n=3).

Los neutrófilos estimulados con *E. dispar* no presentan cambios visibles en su morfología, conservan su núcleo lobulado (Fig. 5.7a). Aunque algunos neutrófilos se ven adheridos a la membrana del trofozoíto de *E. dispar* tampoco se observan cambios en la forma lobulada del núcleo estos neutrófilos (Fig. 5.7b). Por otra parte cuando los neutrófilos son estimulados con las dos especies de amibas al mismo tiempo se observan NETs y a las amibas atrapadas sobre estas redes (Fig. 5.7c). *E. dispar* no induce NETs y no afecta a las NETs inducidas por *E. histolytica*.

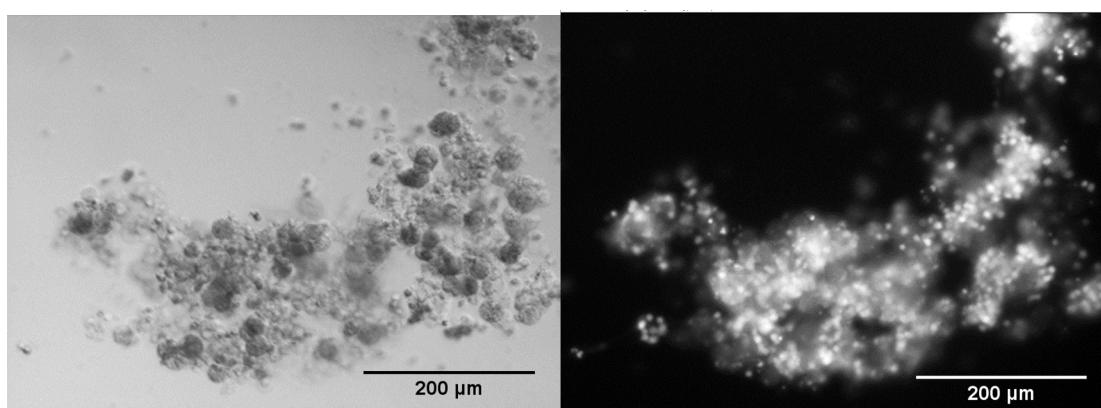
5. RESULTADOS



(a)



(b)



(c)

Figura 5.7: Microscopia en campo claro y fluorescencia usando tinción con DAPI. Neutrófilos estimulados con *E. dispar* a un aumento de 20X (a) y 40X (b). Neutrófilos estimulados con *E. Histolytica* junto con *E. dispar*, a un aumento de 10x (c).

E. dispar no induce la formación de especies reactivas de oxígeno

Los neutrófilos sin estímulo no generaron especies reactivas de oxígeno (ROS). Los neutrófilos estimulados PMA inducen rápidamente la producción de ROS, a partir de 10 minutos de estimulación (Fig. 5.8). Mientras que la estimulación con *E. dispar* no indujo la producción de ROS (Fig. 5.8). Las amibas solas tampoco generan ROS. Las curvas de neutrófilos sin estímulo, *E. dispar* y neutrófilos estimulados con *E. dispar* se traslapan (Fig. 5.8).

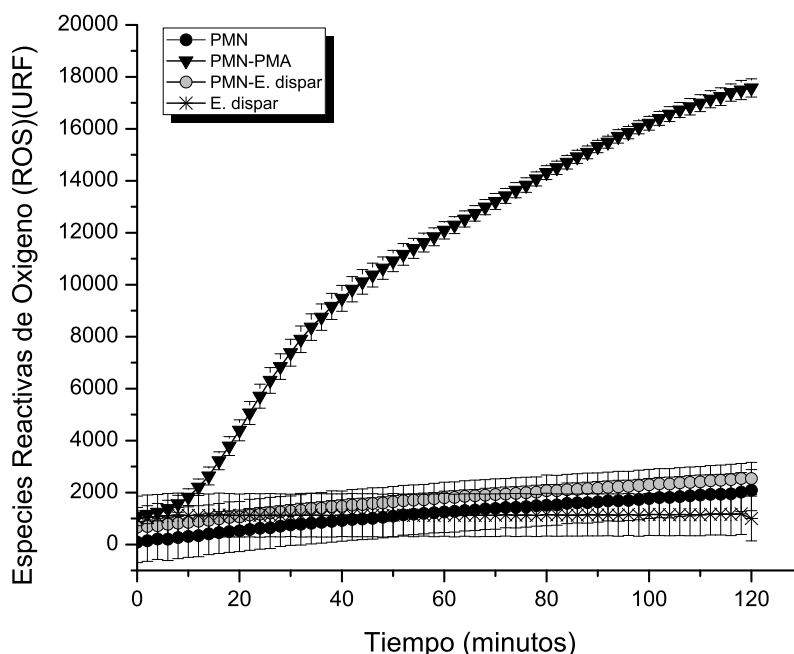


Figura 5.8: Formación de ROS en presencia de *E. dispar* usando como marcador fluorescente DCFDA 15 μ M

E. dispar no induce degranulación en los neutrófilos

Los neutrófilos no liberan NETs al ser estimulados con *E. dispar* por tanto se midió si los neutrófilos podían degranular en presencia de esta amiba con base en la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) liberada. Se midió la absorbancia de los neutrófilos sin estímulo, neutrófilos tratados con tritón x-100, neutrófilos estimulados con el péptido N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLF), neutrófilos tratados con *E. histolytica* y neutrófilos tratados con *E. dispar*. El porcentaje de degranulación se calculó teniendo

5. RESULTADOS

en cuenta la absorbancia del estímulo y de los neutrófilos tratados con tritón x-100 (ecuación 5.1). El péptido fMLF produce la liberación de gránulos que aumenta con el tiempo de estimulación como está reportado (127), *E. histolytica* genera la liberación de MPO que aumenta con el tiempo de estimulación, sin embargo es probable que la cantidad de MPO detectada provenga de las NETs liberadas por la estimulación de la *E. histolytica*. *E. dispar* no produce la degranulación de los neutrófilos (tabla 5.1 y Fig. 5.9).

Tiempo	Absorbancia		% de Degranulación	
	15 minutos	45 minutos	15 minutos	45 minutos
Medio	0,050 ± 0,003	0,050 ± 0,005	-	-
Triton x-100 (1 %)	0,151 ± 0,005	0,276 ± 0,008	-	-
-	0,054 ± 0,002	0,079 ± 0,004	3,96 ± 0,90	12,83 ± 0,22
fMLF	0,138 ± 0,011	0,265 ± 0,032	87,12 ± 2,85	95,13 ± 1,12
<i>E. dispar</i>	0,057 ± 0,007	0,086 ± 0,005	6,9 ± 1,90	15,92 ± 0,25
<i>E. histolytica</i>	0,136 ± 0,014	0,258 ± 0,002	86 ± 3,58	92,03 ± 0,19

Cuadro 5.1: Degranulación de neutrófilos en presencia de *E. dispar*, *E. histolytica* y fMLF

$$\% \text{Degranulación} = \frac{\text{Absorbancia (estímulo)} - \text{Absorbancia (medio)}}{\text{Absorbancia (Triton X-100)} - \text{Absorbancia (medio)}} \times 100. \quad (5.1)$$

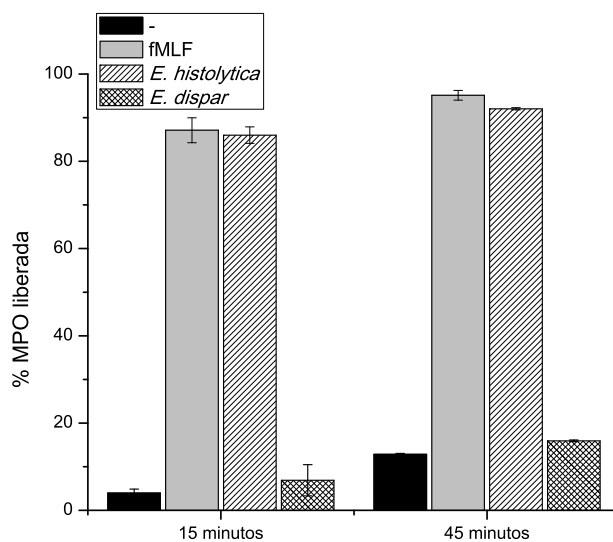


Figura 5.9: Porcentaje de degranulación de neutrófilos en presencia de *E. dispar*, *E. histolytica* y fMLF.

La viabilidad es importante en la formación de NETs

Cuando los neutrófilos se estimulan con amibas previamente fijadas no se producen NETs. Tampoco se liberan NETs cuando los neutrófilos son estimulados con un homogenado de *E. histolytica*, ni con el medio de cultivo donde creció el trofozoíto (Fig. 5.10). Estos hallazgos en donde ni el medio, ni el homogenado de *E. histolytica* inducen NETs se complementan con las imágenes NETs inducidas por el trofozoíto viable en la cuales se mostró que el primer paso la liberación de NETs es el contacto membrana-membrana entre *E. histolytica* y el neutrófilo (Fig. 5.5). Es necesario que el trofozoíto este viable para inducir la liberación de NETs.

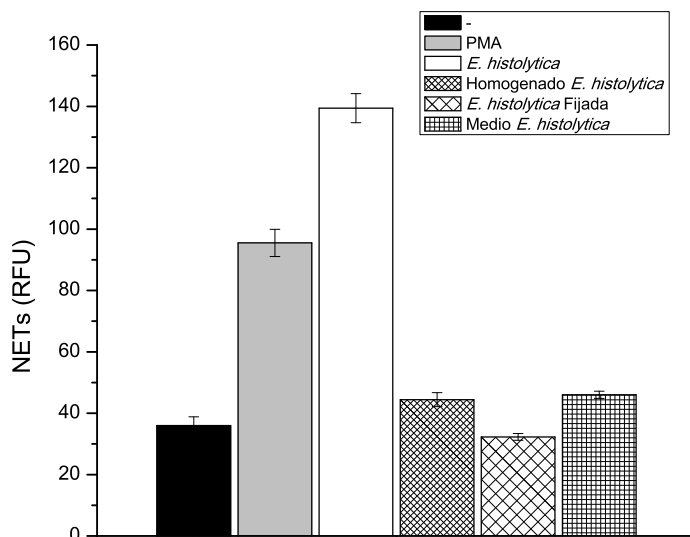


Figura 5.10: Formación de NETs en presencia de: PMA, *E. histolytica* viable, homogenado de *E. histolytica*, *E. histolytica* fijada y medio en donde creció *E. histolytica*. 4 horas de estímulo. n=3

En las NETs inducidas por trofozoítos viables de *E. histolytica* se ve el ADN formando una red sobre la cual queda atrapada la ameba (Fig. 5.11). Cuando los neutrófilos son incubados con *E. histolytica* fijada no se observa ADN disperso, por el contrario los neutrófilos conservan su núcleo lobulado, aun cuando están en contacto con la membrana del trofozoíto (Fig. 5.11b). En estas imágenes se ve que los neutrófilos rodean al trofozoíto fijado formando estructuras tipo rosetas, sin embargo no hay cambios morfológicos en los neutrófilos (Fig. 5.11c). El homogenado de *E. histolytica* y el medio donde se cultivaron las amebas tampoco alteró la morfología de los neutrófilos, estos neutrófilos mantienen su núcleo lobulado (fig. 5.11d-e).

Se crearon videos de los neutrófilos incubados con *E. histolytica* previamente fijada. Las imágenes se capturaron cada 30 segundos durante dos horas y media. Las imágenes mostradas corresponden a: 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1 hora y media, 2 horas, y 2 horas y media (Fig. 5.12). En esta secuencia de imágenes no se observan cambios significativos en el tiempo, ni liberación de NETs. Sólo después de 1 hora y media hay algunas células que exhiben fluorescencia, pero estos ensayos fueron realizados a temperatura ambiente y por tanto es normal que ocurra esto. Sin embargo no hay liberación de ADN alrededor de las amebas fijadas.

5.3 La viabilidad es importante en la formación de NETs

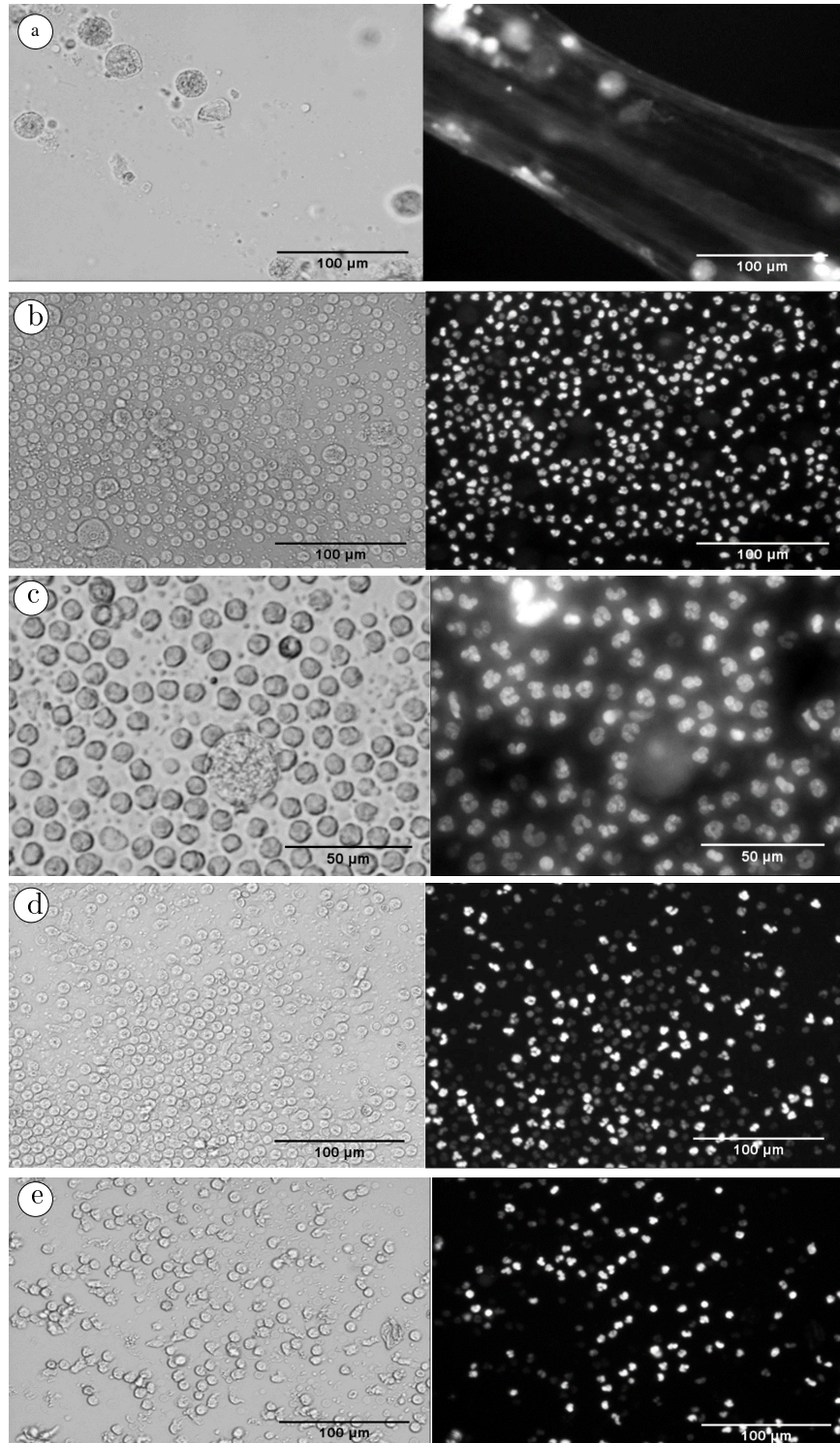


Figura 5.11: Microscopía en campo claro y fluorescencia usando tinción con DAPI. a) neutrófilos estimulados con *E. histolytica* viable, b y c) neutrófilos estimulados con *E. histolytica* fijada a un aumento de 20X Y 40X. d) neutrófilos estimulados con homogenado de *E. histolytica*. e) neutrófilos estimulados con medio donde creció *E. histolytica*

5. RESULTADOS

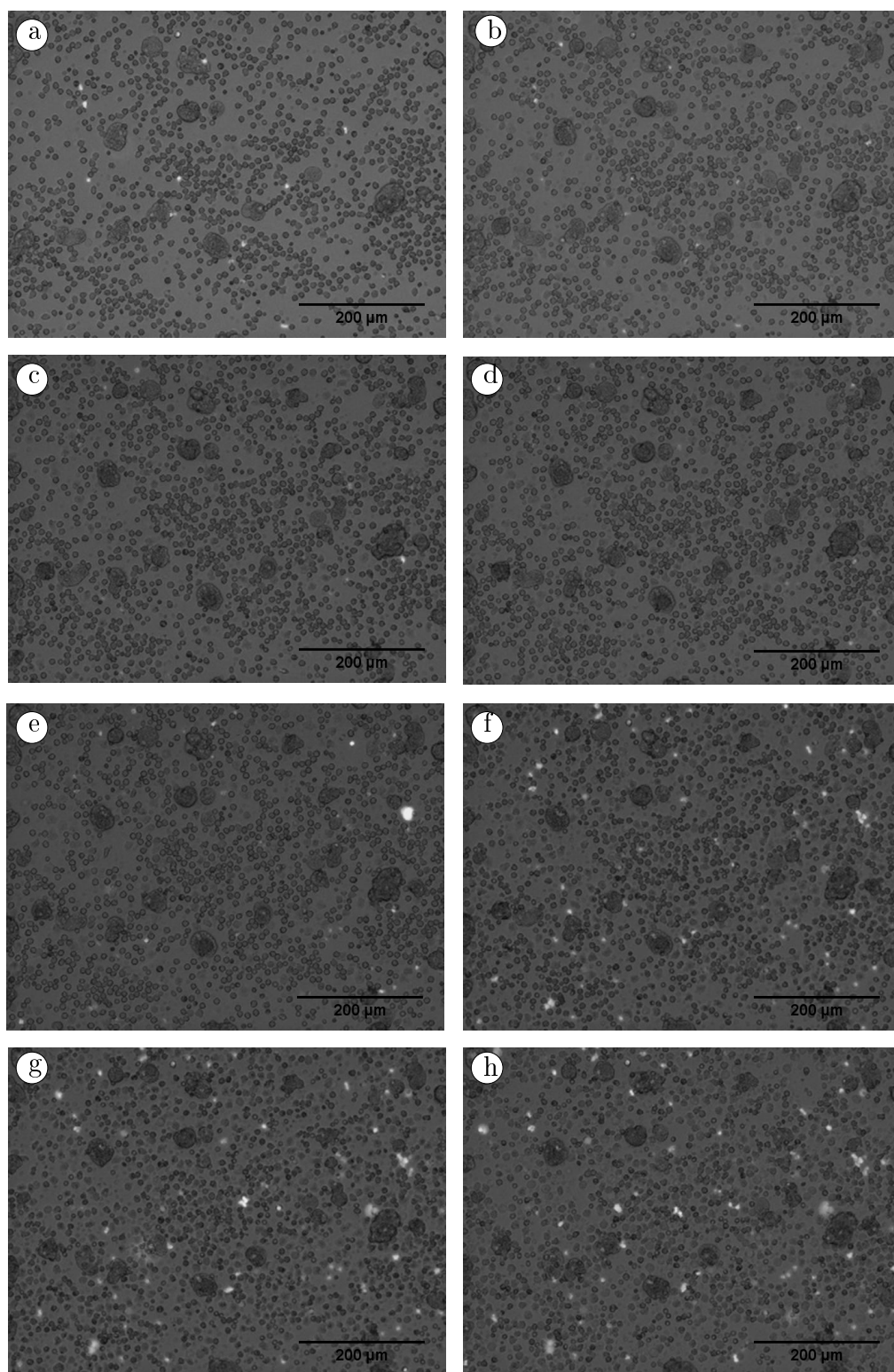


Figura 5.12: Formación de NETs inducidas por *E. histolytica* fijada, tinción de ADN con SYTOX GREEN (500 nM). Aumento 10x. a) 0 minutos, b) 15 minutos, c) 30 minutos, d) 45 minutos, e) 1 hora, f) 1 hora y 30 minutos, g) 2 horas, h) 2 horas y 30 minutos

La movilidad de la amiba es determinante en la formación de NETs

Cuando los neutrófilos son estimulados con *E. histolytica* pretratada con citocalasina B para inhibir la polimerización de actina y por tanto cambios en el citoesqueleto, la cantidad de NETs disminuye significativamente en comparación los neutrófilos estimulados con los trofozoítos sin citocalasina B (Fig. 5.13). La viabilidad de la amiba no se afectada con el pretratamiento con citocalasina (Fig. 5.13).

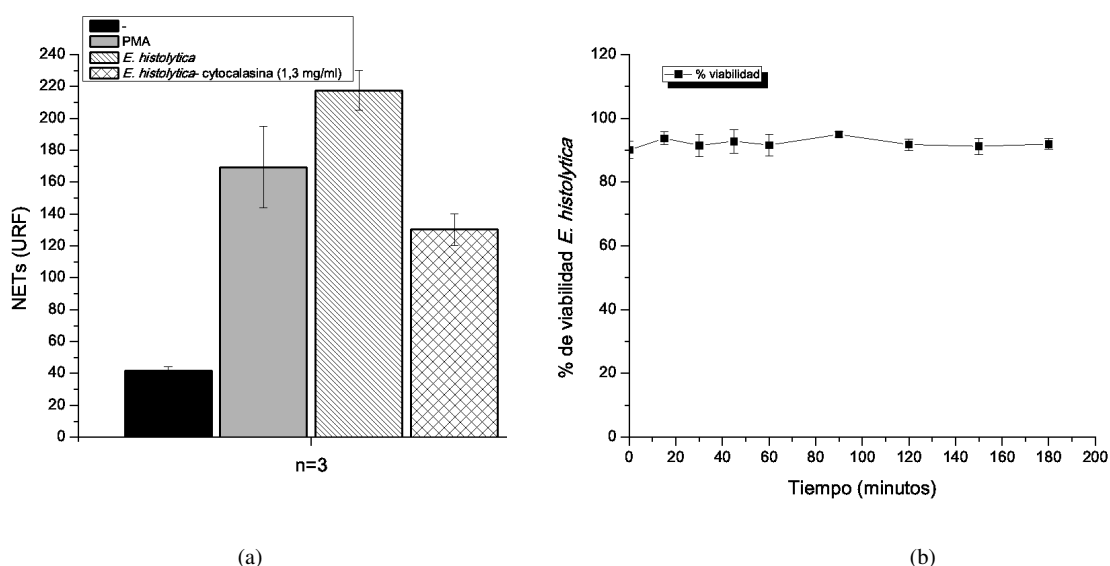


Figura 5.13: Formación de NETs en presencia de trofozoítos pretratados con citocalasina b (1,3 mg/ml). a) Cuantificación de NETs después de 4 horas de estimulación. b) Viabilidad de *E. histolytica* pretratada con citocalasina B (1,3 mg/ml)

Las imágenes de fluorescencia de neutrófilos estimulados con *E. histolytica* pretratada con citocalasina B muestran un poco de ADN difuso en algunas zonas del campo que posiblemente corresponden a NETs (Fig. 5.14a). Sin embargo la mayor proporción de neutrófilos mantienen su núcleo compacto, incluso los neutrófilos que rodean a las amibas conservan la forma lobulada del núcleo (Fig. 5.14b).

5. RESULTADOS

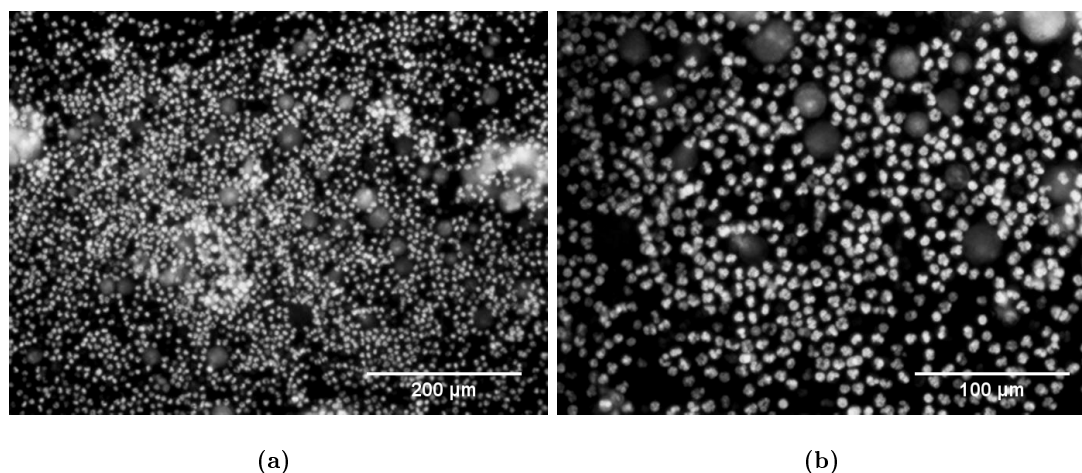


Figura 5.14: Imágenes de fluorescencia de neutrófilos estimulados con *E. histolytica* pre-tratados con citocalasina b(1,3 mg/ml), tinción de ADN con DAPI. a) aumento 10 x, b) aumento 20x

Aquí se muestran algunas fotografías que pertenecen a los videos tomados durante 2 horas y 30 minutos. Estas imágenes corresponden a diferentes tiempos: 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1 hora y 30 minutos, 2 horas, y 2 horas y 30 minutos de neutrófilos estimulados con *E. histolytica* previamente tratada con citocalasina B (Fig. 5.15). Desde el primer momento es que se adicionan las amibas a la placa de neutrófilos se ve algunos neutrófilos rodeando a la amiba (Fig. 5.15a). A los 15 minutos, más neutrófilos migran hacia las amibas formando rosetas (Fig. 5.15b). Después de 30 minutos, mas rosetas se han formado en el campo y es clara la migración de los neutrófilos hacia las amibas, algunas amibas se han desplazado un poco mostrando en el campo, lo que indica que la inhibición del movimiento no es completa (Fig. 5.15c). Cuando han pasado 45 minutos algunas amibas siguen desplazándose por el campo arrastrando a los neutrófilos adheridos a ellas (Fig. 5.15d). Después de una hora, curiosamente, las amibas que pudieron desplazarse por el campo son las que más neutrófilos tienen adheridos a ellas pero no se han liberado NETs en estos neutrófilos (Fig. 5.15e). A la hora y media muchos neutrófilos rodean a las amibas que aún conservan movilidad (Fig. 5.15f). Las imágenes de dos hora y dos horas y media muestra la liberación de ADN de algunos de los neutrófilos que estaba en contacto con amibas y durante todo el ensayo se observaron las rosetas sin liberación de NETs (Fig. 5.15g-h). En resumen los neutrófilos son atraídos por las amibas e interactúan con la membrana de la misma pero la liberación de NETs disminuye drásticamente.

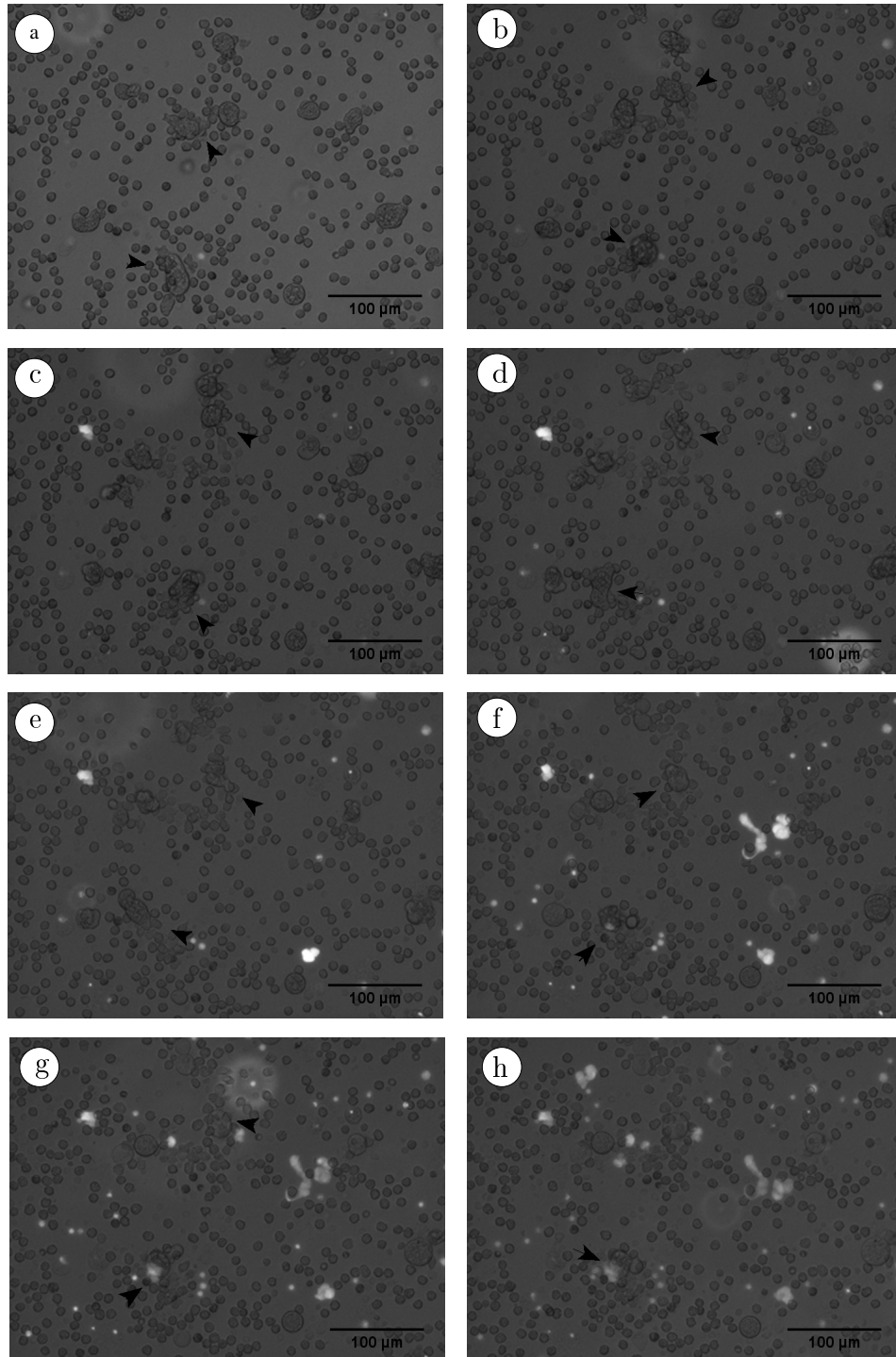


Figura 5.15: Formación de NETs inducidas por *E. histolytica* pretratada con citocalasina, tinción de ADN con SYTOX GREEN (500 nM). Aumento 10x. a) 0 minutos, b) 15 minutos, c) 30 minutos, d) 45 minutos, e) 1 hora, f) 1 hora y 30 minutos, g) 2 horas, h) 2 horas y 30 minutos. (Las flechas muestran a aquellas amibas que se desplazaron por el campo y tienen más neutrófilos sobre su superficie)

Efecto de azúcares en la formación de NETs

Efecto de galactosa

La formación de NETs inducidas por *E. histolytica* disminuyó aproximadamente a la mitad cuando el medio contenía 110 mM de galactosa (Fig. 20). Con una concentración de 220 mM de galactosa, la inhibición de la formación de NETs fue casi completa (Fig. 20). La galactosa inhibe la formación de NETs inducidas por *E. histolytica* de una manera dependiente de la concentración. Curiosamente, las NETs inducidas por PMA se inhibieron parcialmente por galactosa, pero esta inhibición no es dependiente de la concentración (Fig. 5.16). La viabilidad de los neutrófilos ni de la ameba se afectan por la adición de galactosa (Fig. 5.16).

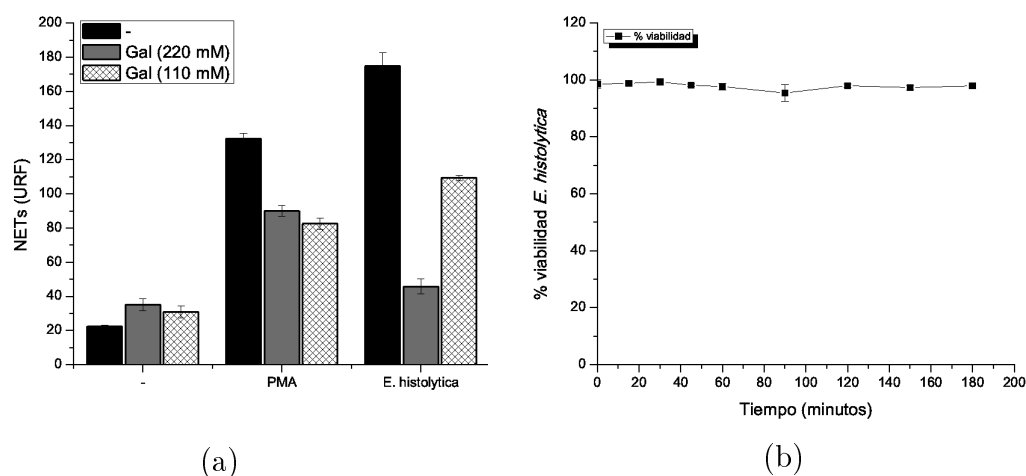


Figura 5.16: Efecto de Galactosa en formación de NETs. a) Cuantificación de NETs en presencia de Galactosa 220 mM y 110 mM. b) viabilidad de *E. histolytica* en presencia de galactosa (220 mM).

La morfología de los neutrófilos no se ve alterada por la adición de galactosa al medio de incubación. Cuando los neutrófilos son estimulados con PMA en un medio que contiene galactosa las NETs se ven atenuadas. La presencia de galactosa en el medio inhibe completamente la formación de NETs inducidas por *E. histolytica*, no se ve ADN difuso, y los núcleos de los neutrófilos parecen estar compactos (Fig. 5.17).

Para esta condición también se tomó un video durante dos horas y media. Aquí se muestran las fotografías correspondientes a los tiempos: 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1 hora y 30 minutos, 2 horas, y dos horas y 30 minutos (Fig. 5.18a-h). Desde el instante en que las amibas se adicionan a la placa donde se encuentra los neutrófilos, estos empiezan a acercarse al trofozoíto (zona superior derecha) (Fig. 5.18a), después de 15 y 30 minutos se observan rosetas formadas por los neutrófilos alrededor de la amiba pero no hay liberación de ADN (Fig. 22b-c), luego de 45 minutos la cantidad de neutrófilos sobre los trofozoítos es mayor pero no hay liberación de NETs (Fig. 5.18d). En las imágenes correspondientes a 1 hora, 1 hora y media, dos horas, y dos horas y media no se observan cambios significativos (Fig 5.18e-h). Aunque es necesario resaltar que después de 2 horas y media los trofozoítos se ven rodeados por muchos neutrófilos, y la liberación de ADN de los neutrófilos que están sobre las amibas es mínima (Fig. 5.18h). Otra observación interesante es que a la amiba señalada (flecha) que se desplazó bastante sobre el campo durante el tiempo del ensayo, los neutrófilos que interaccionaron con esta amiba no se adhirieron a la membrana ni se desplazaron con el trofozoíto como si ocurre en condiciones control (Fig. 5.3). Los datos en conjunto muestran que la adición de galactosa en el medio de incubación inhibe la formación de NETs.

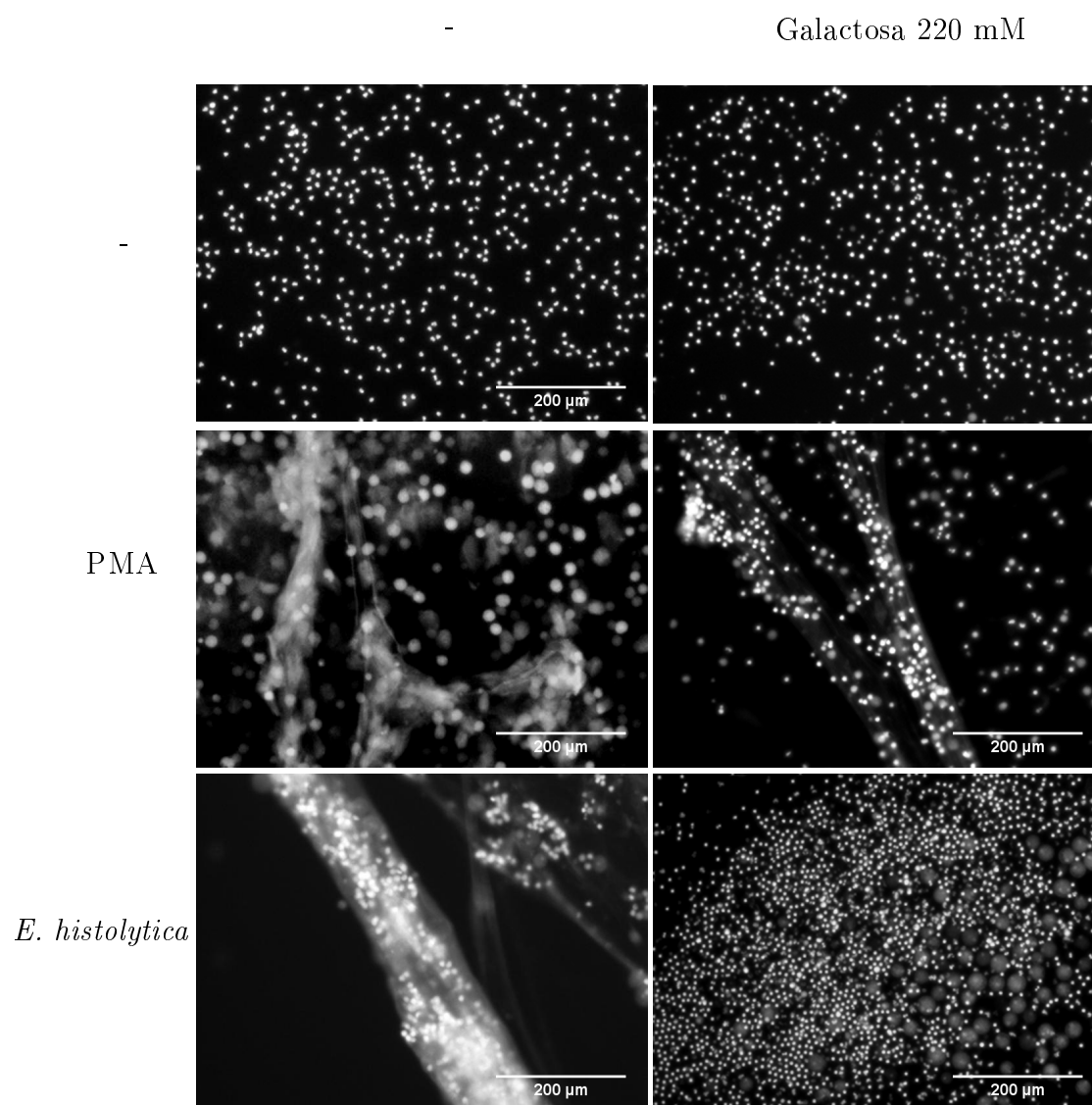


Figura 5.17: Formación de NETs en presencia o no de galactosa (220 mM). Neutrófilos estimulados durante 4 horas con PMA (20 nM) o con *E. histolytica*

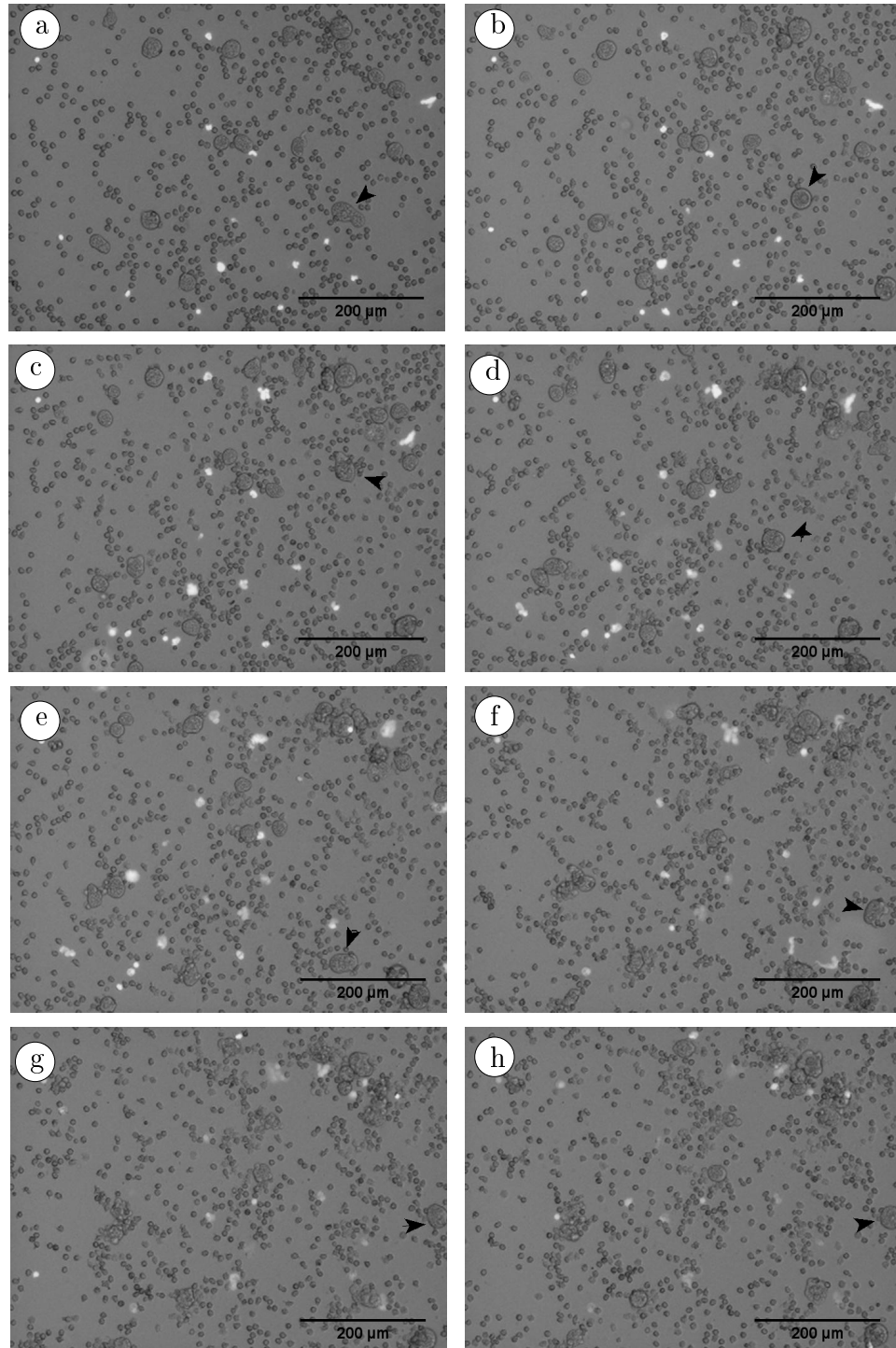


Figura 5.18: Formación de NETs inducidas por *E. histolytica* en presencia de galactosa 220 mM, tinción de ADN con SYTOX GREEN (500 nM). Aumento 10x. a) 0 minutos, b) 15 minutos, c) 30 minutos, d) 45 minutos, e) 1 hora, f) 1 hora y 30 minutos, g) 2 horas, h) 2 horas y 30 minutos (la flecha muestra a la ameba que más se desplazó en el campo. Los neutrófilos no se le adhirieron)

Efecto de manosa

La formación de NETs inducida por *E. histolytica* no se inhibe en presencia de 110 mM de manosa (Fig. 5.19). A 220 mM de manosa se observó una inhibición parcial (alrededor de 30 %) en la liberación de NETs (Fig. 5.19). Curiosamente, la presencia de manosa inhibe completamente las NETs inducidas por PMA de una forma no dependiente de la concentración (Fig.5.19). La adición de manosa no afecta la viabilidad de los neutrófilos ni la viabilidad del trofozoíto (Fig. 5.19).

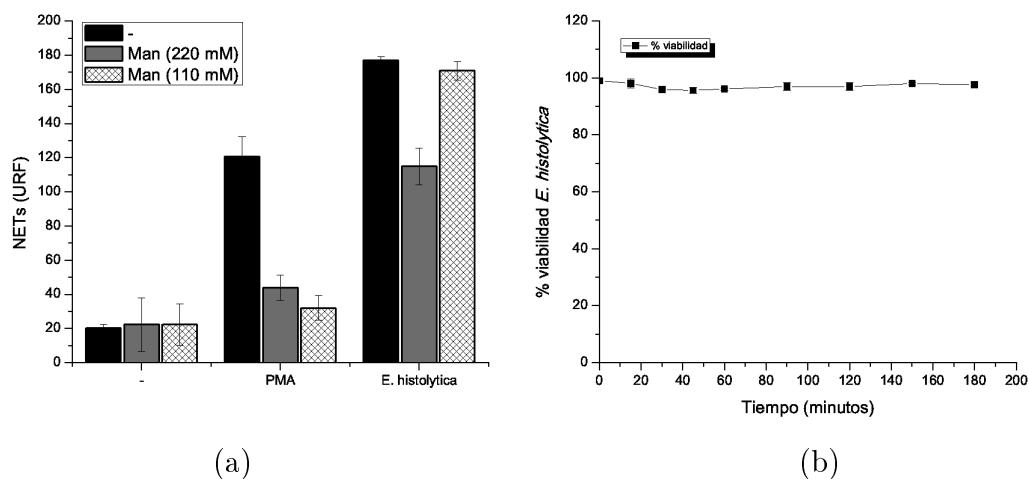


Figura 5.19: Efecto de manosa en formación de NETs. a) Cuantificación de NETs en presencia de Manosa 220 mM y 110 mM. b)viabilidad de *E. histolytica* en presencia de Manosa (220 mM).

Cuando los neutrófilos son estimulados con PMA en presencia de manosa (220 mM), se disminuye drásticamente las NETs, muchos neutrófilos se ven con su núcleo compacto, y son pocos los neutrófilos que tienen el ADN disperso. Cuando las células son estimuladas con *E. histolytica* en presencia de manosa (220 mM) se puede observar zonas donde hay ADN disperso y se observan otros neutrófilos con su núcleo compacto (Fig. 5.20).

Se realizaron vídeos de la formación de NETs inducidas por *E. histolytica* en presencia de manosa (220 mM) durante dos horas y media. Aquí muestran las fotografías correspondientes a: 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1 hora y 30 minutos, 2 horas, y dos horas y 30 minutos (Fig. 5.21). En esta secuencia de imágenes se observa que hay atracción de neutrófilos hacia las amibas, y formación de roseta. Aunque hay liberación de ADN sobre las amibas esta liberación es más lenta y en menor proporción en comparación con las condiciones control (Fig. 5.3)

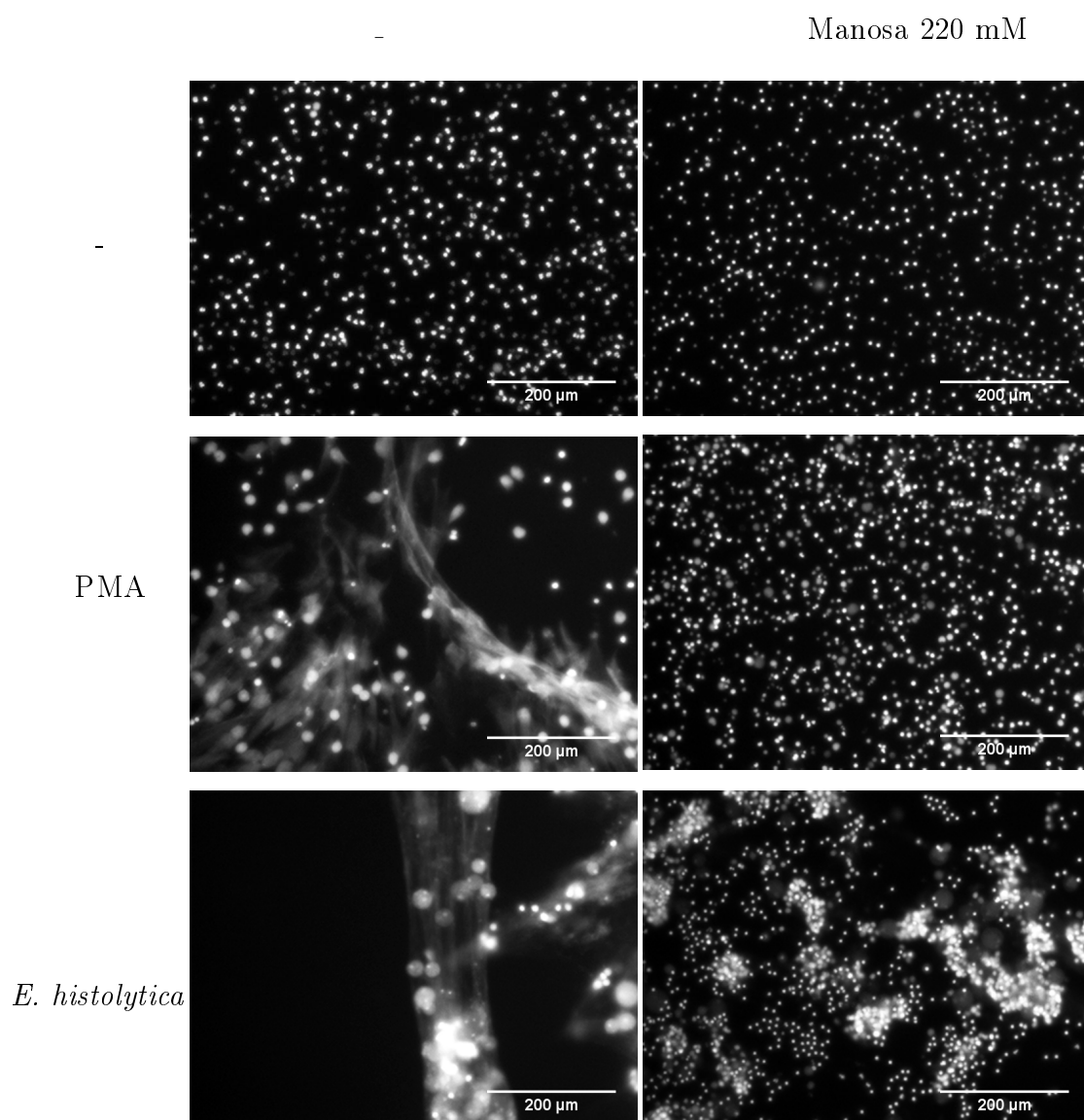


Figura 5.20: Formación de NETs en presencia o no de manosa (220 mM). Neutrófilos estimulados durante 4 horas con PMA (20 nM) o con *E. histolytica*

5. RESULTADOS

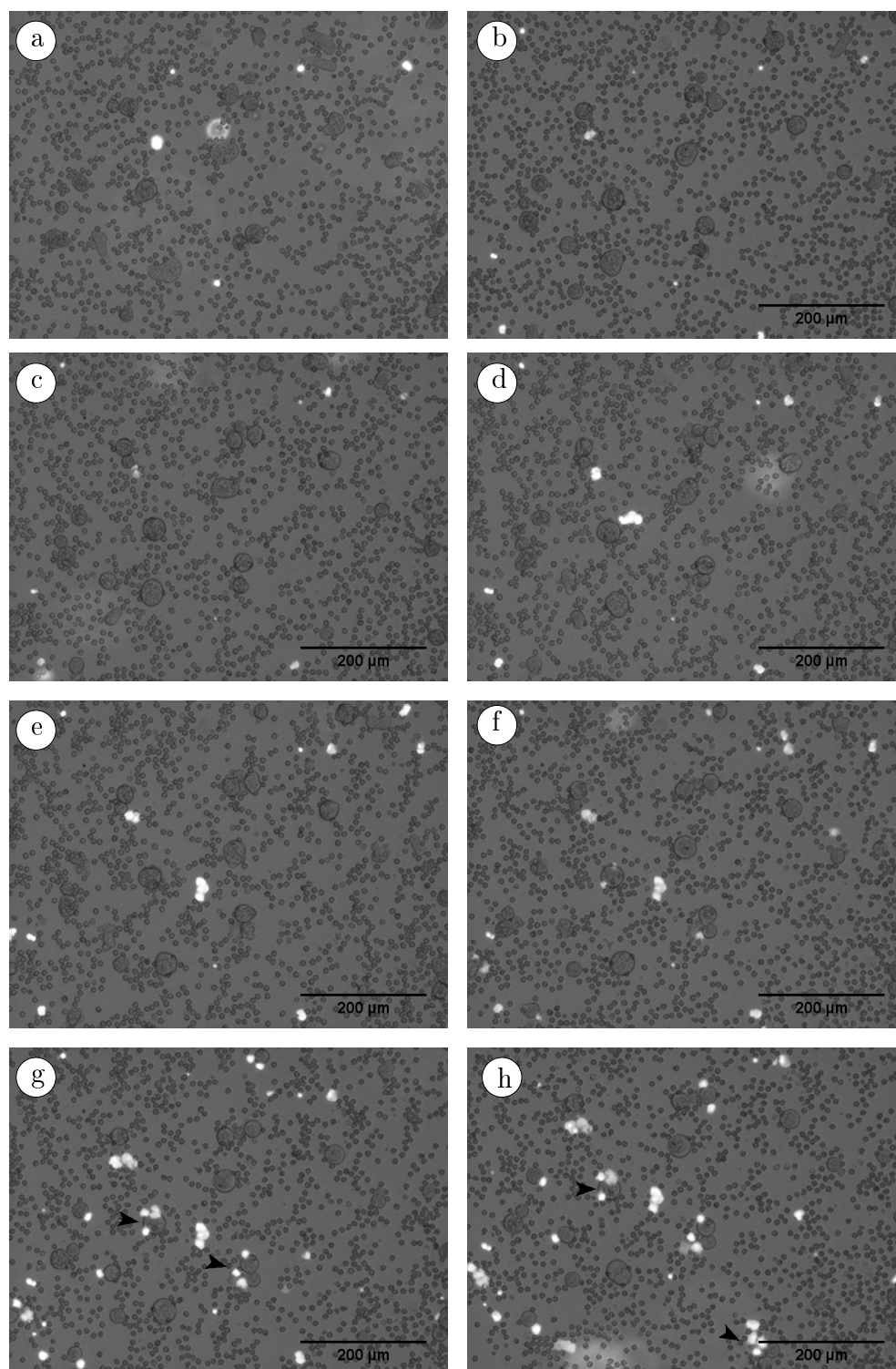


Figura 5.21: Formación de NETs inducidas por *E. histolytica* en presencia de manosa 220 mM, tinción de ADN con SYTOX GREEN (500 nM). Aumento 10x. a) 0 minutos, b) 15 minutos, c) 30 minutos, d) 45 minutos, e) 1 hora, f) 1 hora y 30 minutos, g) 2 horas, h) 2 horas y 30 minutos (las flechas muestran ADN liberado sobre algunos trofozoítos)

Efecto de Glucosa

En presencia de Glucosa (220 mM), se observa una inhibición de hasta el 50 % de las NETs inducidas por *E. histolytica*, sin embargo, los controles de neutrófilos sin estímulo en presencia de Glucosa (220mM y 110 mM) muestran un alto aumento de fluorescencia. Teniendo en cuenta que el marcador fluorescente es SYTOX GREEN es posible interpretar este aumento en la fluorescencia como una pérdida de viabilidad de los neutrófilos producida por la presencia de altos niveles de glucosa en el medio. Por tanto la disminución en liberación de NETs inducidas por *E. histolytica* es una consecuencia en la pérdida de viabilidad del neutrófilo (Fig. 5.22a) . La adición de Glucosa no afecta la viabilidad del trofozoíto (Fig. 5.22b)

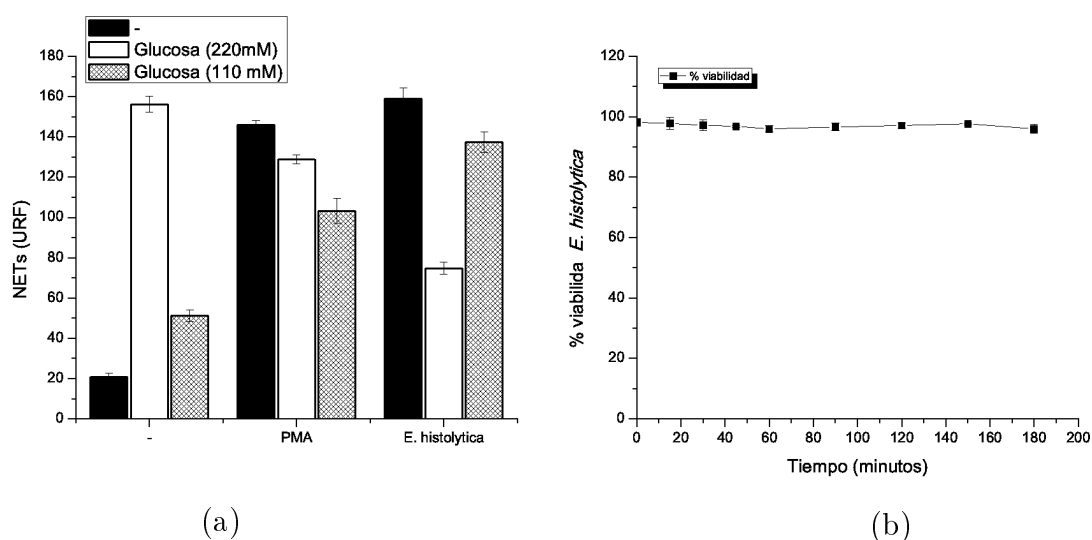


Figura 5.22: Efecto de glucosa en formación de NETs. a) Cuantificación de NETs en presencia de glucosa 220 mM y 110 mM. b)viabilidad de *E. histolytica* en presencia de glucosa (220 mM).

NETs inducidas por *E. histolytica* son independiente de la formación de ROS.

El DPI inhibe formación de NETs inducidas por *E. histolytica*

Al pretratar a los neutrófilos con cloruro de difenil-iodonio (DPI), un inhibidor de la NADPH oxidasa y después estimularlos con *E. histolytica* o con PMA, se observa la disminución de NETs con PMA como ya está reportado. Además se observa la disminución de las NETs inducidas con *E. histolytica*. Esta disminución es evidente después de los 60 minutos de incubación, y después de los 100 minutos no hay aumento en la liberación de NETs en presencia del inhibidor (Fig. 5.23a). Las pruebas de viabilidad de *E. histolytica* en presencia de DPI revelan que después de 60 minutos sólo queda el 60 % de amibas vivas y después de 100 minutos casi todos los trofozoítos han muerto por la presencia del inhibidor (Fig. 5.23b).

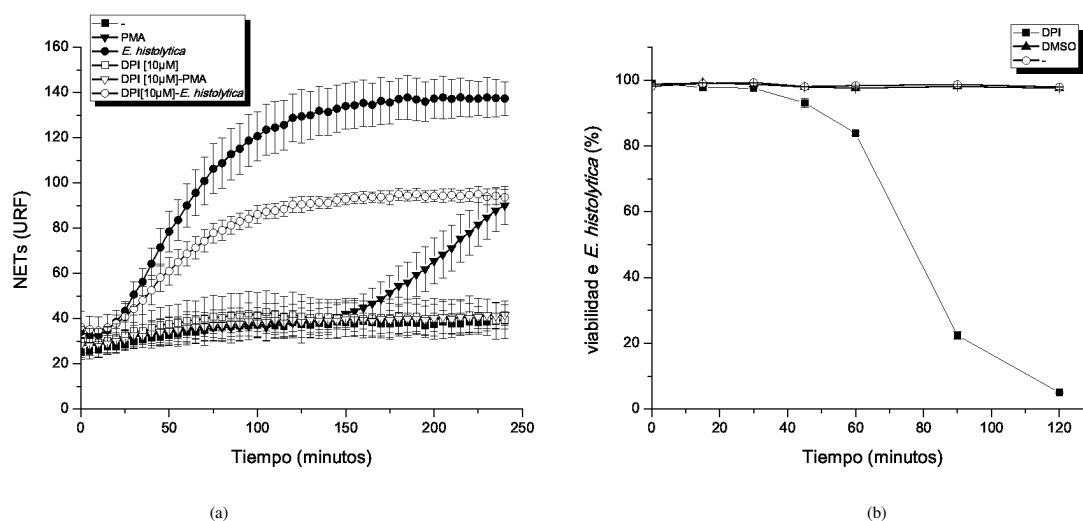


Figura 5.23: Formación de NETs en presencia de DPI (10 μM). a) Cinética de formación de NETs usando SYTOX GREEN como marcador fluorescente. b) viabilidad de *E. histolytica* en presencia de DPI (10 μM)

Cuando los neutrófilos son estimulados con PMA en presencia de DPI hay una fuerte inhibición de las NETs, el núcleo de los neutrófilos se ve compacto. Mientras que la estimulación de los PMNs con *E. histolytica* en presencia de DPI, induce la liberación de ADN se ve atenuado la cantidad de ADN liberado. (Fig.5.24).

5.6 NETs inducidas por *E. histolytica* son independiente de la formación de ROS.

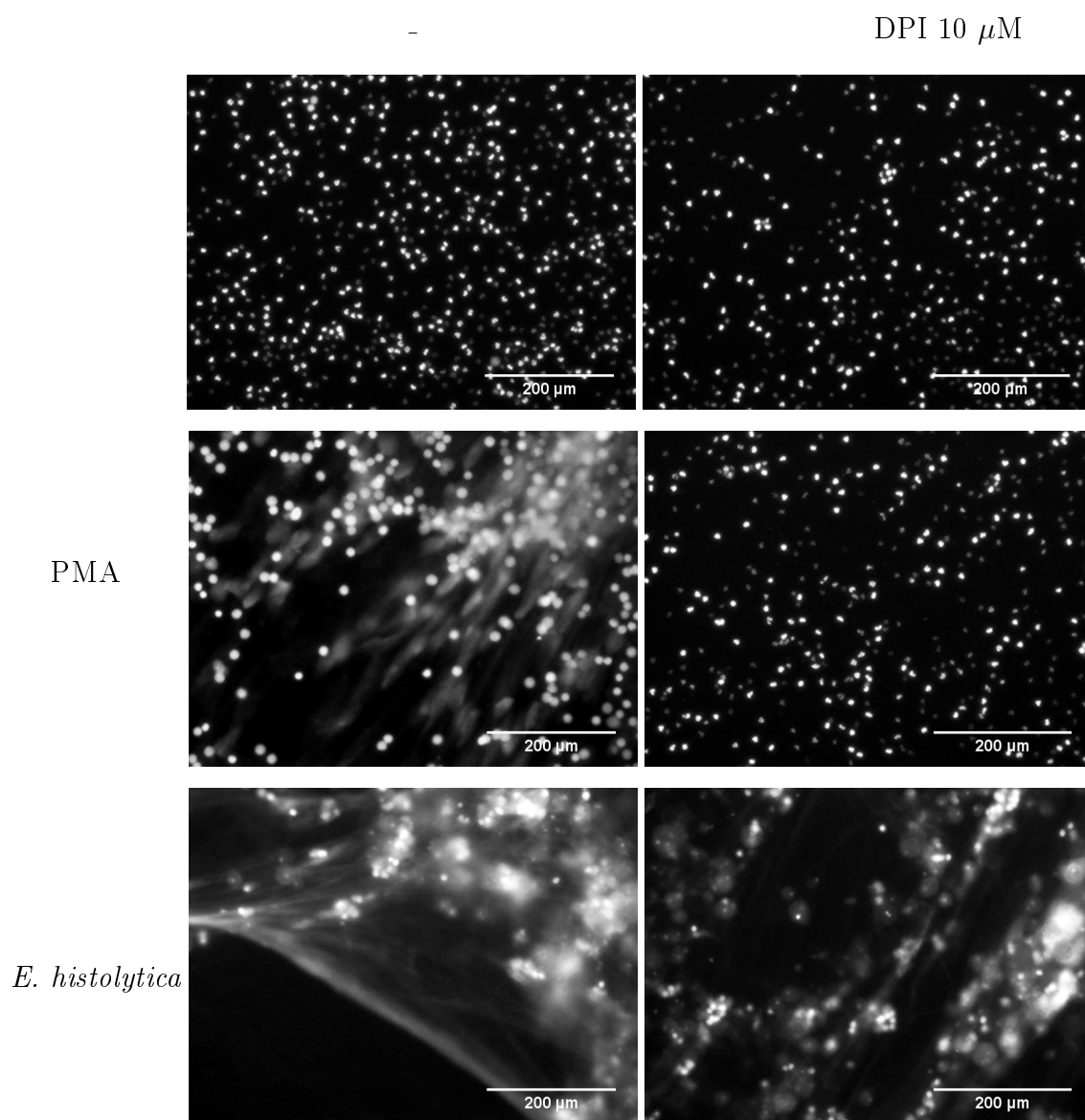


Figura 5.24: Imágenes de NETs en presencia de DPI, tinción con DAPI. Neutrófilos estimulados con PMA o con *E. histolytica* en presencia de DPI.

***E. histolytica* no induce especies reactivas de oxígeno en el neutrófilo.**

Se midieron especies reactivas de oxígeno utilizando tres metodologías diferentes:

Cinética de fluorescencia en microplaca: Se midió la fluorescencia emitida marcando a las células con DCFDA un compuesto que emite fluorescencia cuando se oxida. El control con PMA mostró una rápida formación de ROS después de los 20 minutos de estimulación (Fig.5.25). Cuando los neutrófilos son estimulados con *E. histolytica* no hay aumento en la fluorescencia emitida y la señal es la misma que la de los neutrófilos que no recibieron estímulo. *E. histolytica* no emite fluorescencia bajo estas condiciones (Fig. 5.25).

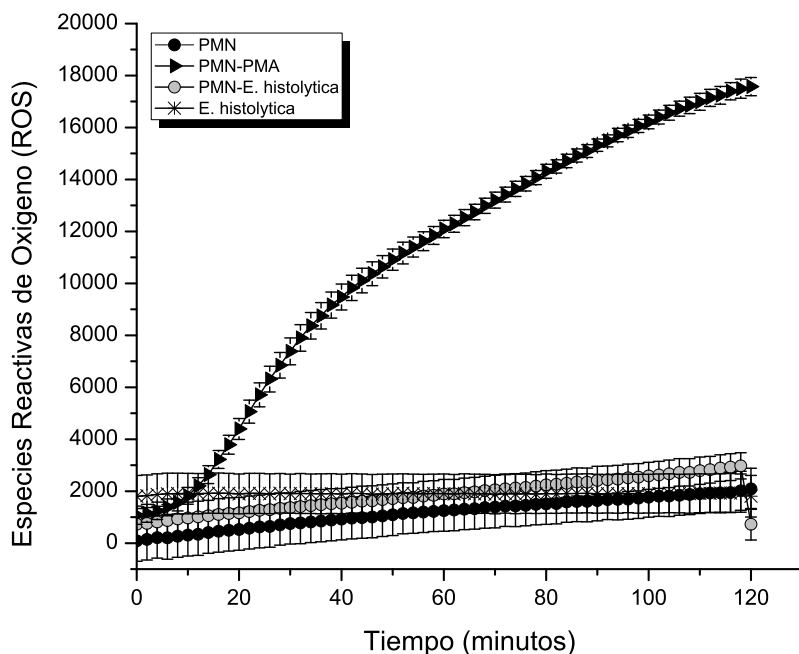


Figura 5.25: Cinética de formación de ROS en neutrófilos inducidas por *E. histolytica*.

Marcador fluorescente DCFDA 15 μ M

Citometría de flujo: los neutrófilos fueron marcados con DHR 123 123 (dihidrorodamina 123) (Fig 5.26). Cuando los neutrófilos son estimulados con PMA hay un aumento de fluorescencia indicativo de la formación de ROS (Fig. 5.26) Al contrario, al incubar los neutrófilos con *E. histolytica* no se observa ningún aumento de fluorescencia, lo cual refleja que no se producen ROS (fig. 5.26).

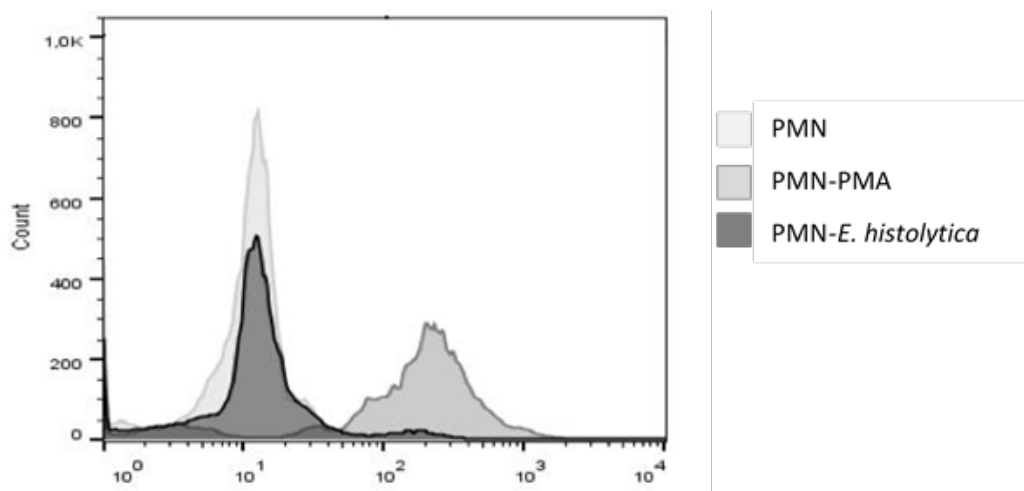


Figura 5.26: Histogramas de citometría de flujo de formación de ROS en neutrófilos inducidas por *E. histolytica*. Marcador fluorescente DHR 123 123 ($15 \mu\text{M}$)

Microscopía de fluorescencia: los neutrófilos fueron teñidos con dihidroetidium (DHE). Este compuesto emite fluorescencia cuando reacciona con ROS. Por tanto las células que producen ROS son fácilmente visibles con un microscopio de fluorescencia. Los neutrófilos sin estímulo emiten muy poca fluorescencia casi imperceptible (Fig. 5.27a), mientras que los neutrófilos que fueron estimulados con PMA se ven todos fluorescentes (Fig. 5.27b). Por otra parte, cuando la estimulación es con *E. histolytica* no se ven neutrófilos fluorescentes (Fig. 5.27c). Los resultados en conjunto y mediante el uso de tres metodologías distintas demuestran que *E. histolytica* no induce la formación de ROS en el neutrófilo.

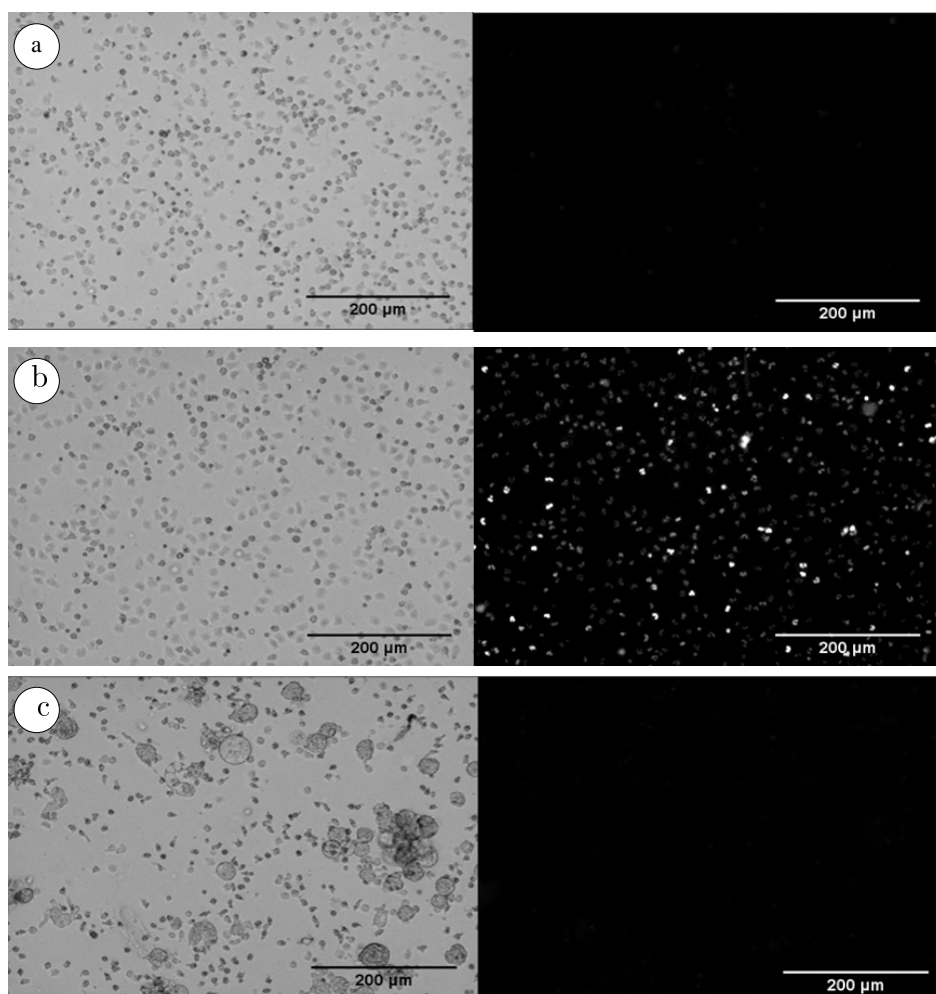


Figura 5.27: Microscopia de fluorescencia y campo claro, usando como marcador fluorescente DHE 15 μM . a) Células sin estímulo, b) células estimulados con PMA, c) neutrófilos estimulados con *E. histolytica*.

Vía de señalización

Para establecer cuáles son las moléculas que participan en la vía de señalización de las NETs inducidas por *E. histolytica*, se usaron inhibidores específicos de PKC, Raf, MEK, NF- κ B y NADPH oxidasa. Estas moléculas participan en la vía de señalización descrita en la formación de NETs inducidas por PMA. Se sabe que PMA activa PKC, y ésta a su vez activa la vía Raf-MEK-ERK para inducir la formación de NETs (8). También se ha reportado que PMA induce la activación del factor nuclear NF- κ B y éste participa en la formación de NETs (72).

PKC no participa en la formación de NETs inducida por *E. histolytica*.

El estímulo clásico para formación de NETs es el PMA. Este compuesto es un activador de la proteína cinasa C (PKC). Para probar si la activación de los neutrófilos para producir NETs inducida por *E. histolytica* también requiere de PKC, se usó dos inhibidores de PKC. Gö6976, un inhibidor de las isoformas convencionales y Gö6983, inhibidor de las isoformas convencionales y atípicas. Cuando los neutrófilos son estimulados con *E. histolytica*, la presencia de los inhibidores Gö6976 y Gö6983 no afecta la formación de NETs (Fig. 5.28).

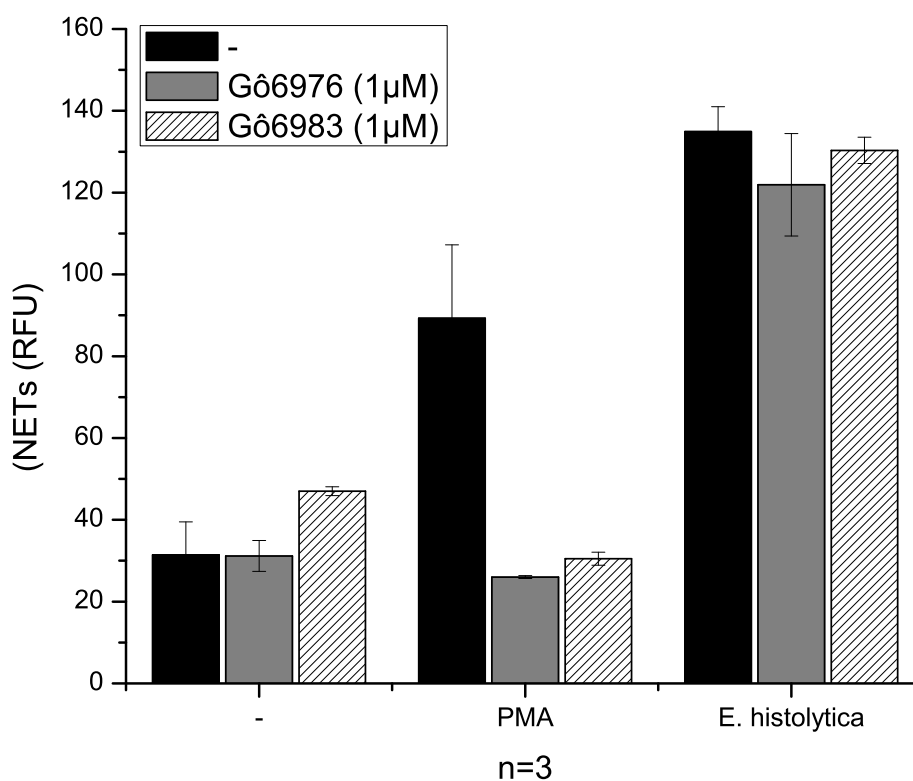


Figura 5.28: Formación de NETs estimuladas por PMA o *E. histolytica* en presencia de inhibidor de PKC (Gö6976 1 μM, Gö6983 1 μM

)

El inhibidor Gö6976 no afecta la morfología de los neutrófilos (Fig. 5.29). Cuando los neutrófilos son estimulados con PMA en presencia de Gö6976 no hay formación de NETs y las células mantienen el ADN compactado (Fig. 5.29). Cuando los neutrófilos

5. RESULTADOS

pretratados con Gö6976 son estimulados con *E. histolytica* se forman NETs con estructura similar a las de las condiciones control (Fig. 5.29). Estos resultados sugieren que PKC no participa en la formación de NETs inducida por *E. histolytica*.

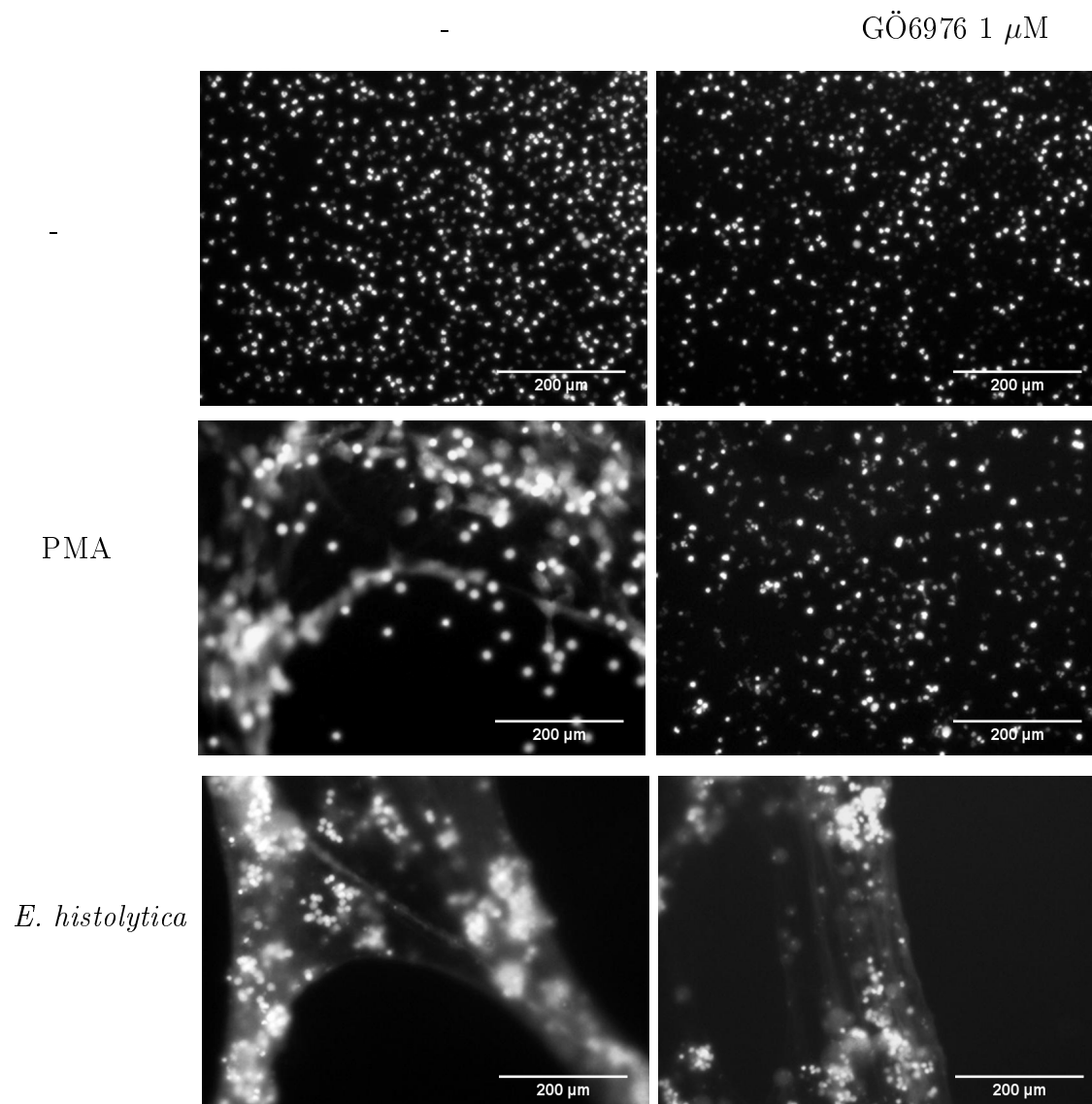


Figura 5.29: Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI . Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de Gö6976. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con *E. histolytica*.

Raf participa en la liberación de NETs

La vía de señal que lleva a formación de NETs después de estimular con PMA involucra al protooncogen c-Raf (56). Cuando los neutrófilos son estimulados con PMA en presencia de GW5074, un inhibidor específico de c-Raf, no se forman NETs (Fig. 5.30a), tal y como ya está reportado (56). Cuando los neutrófilos son pretratados con GW5074 y estimulados con *E. histolytica* tampoco hay liberación de NETs (Fig. 5.30a). La presencia de este inhibidor no afecta la viabilidad de *E. histolytica* (Fig. 5.30b).

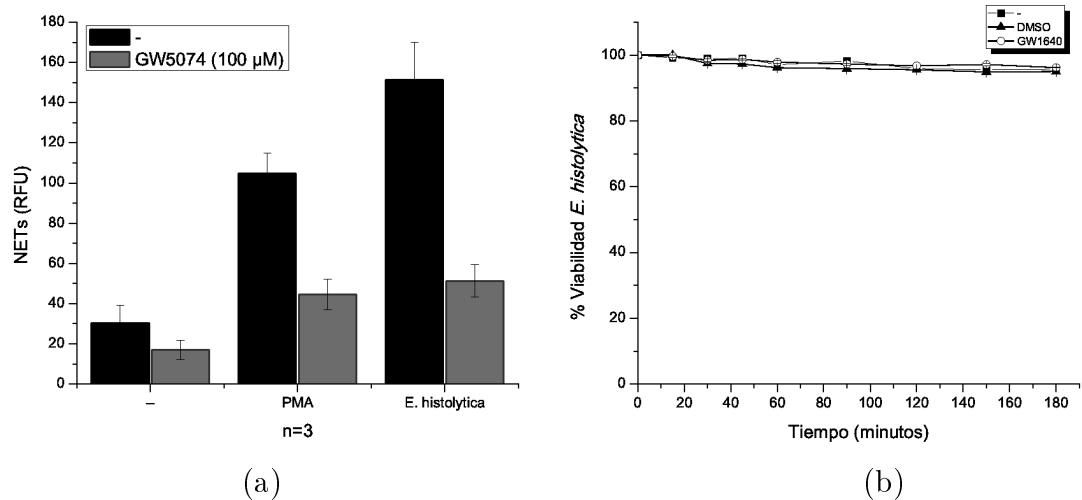


Figura 5.30: a. Formación de NETs estimuladas por PMA o *E. histolytica* en presencia del inhibidor de Raf (GW5074 a 100 μM). b. Viabilidad de *E. histolytica* en presencia de GW5074.

En imágenes de fluorescencia donde se tiñe el ADN, se puede observar que la morfología de los núcleos de los neutrófilos no se ve afectada por la presencia del inhibidor (Fig. 5.31). Las células estimuladas con PMA liberan NETs pero en presencia del inhibidor de Raf, la mayor parte de las células no liberan NETs y se ve claramente que los núcleos conservan su forma lobulada (Fig. 5.31). En los neutrófilos estimulados con *E. histolytica* y pretratados con el inhibidor aunque se ve un poco de ADN disperso, ya no se observa la formación de NETs (Fig. 5.31).

5. RESULTADOS

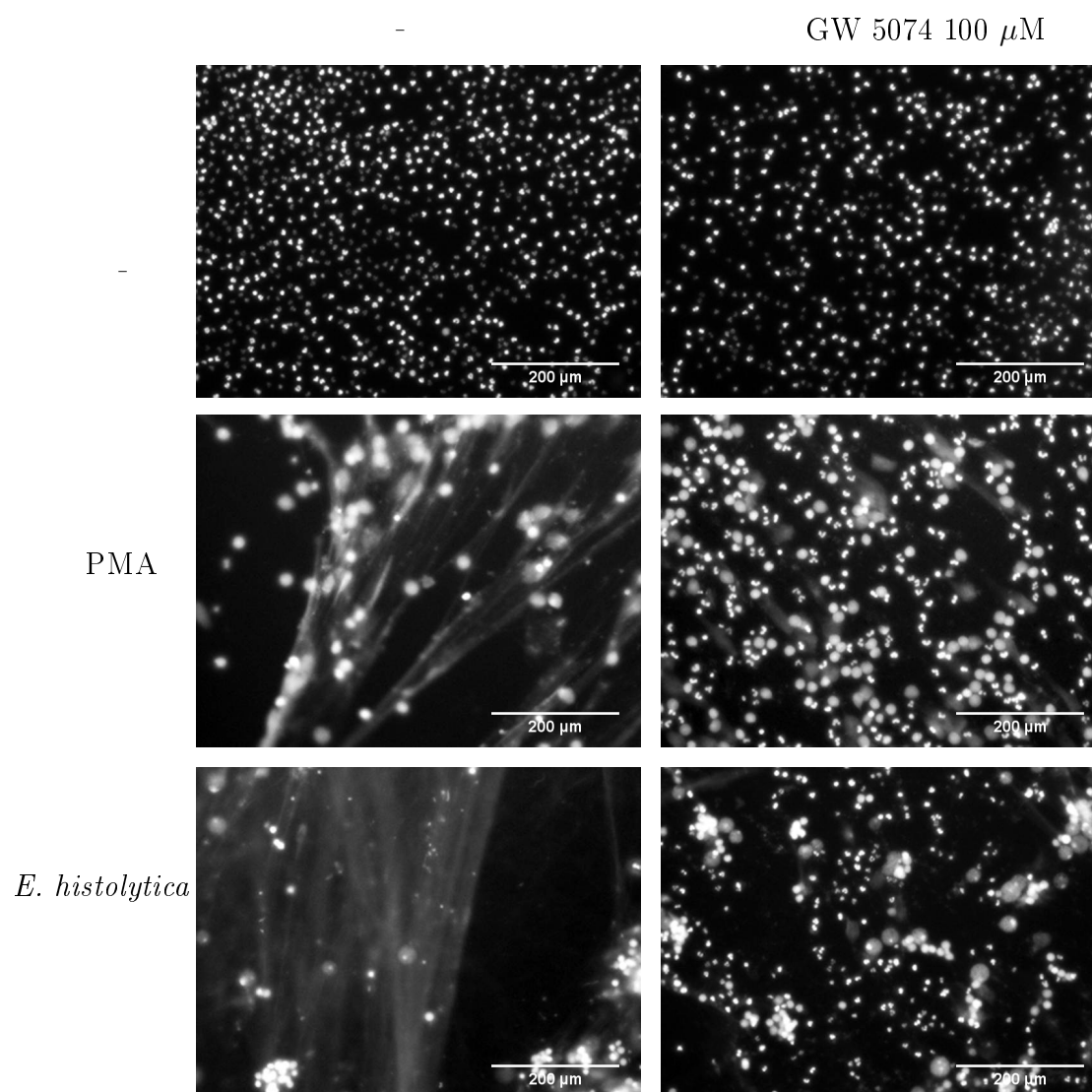


Figura 5.31: Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI . Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de GW 5074 100 μM. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con *E. histolytica*.

ERK participa en la formación de NETs inducidas por *E. histolytica*

Después de c-Raf, la vía de señal iniciada por PMA para formar NETs involucra a las cinasas MEK y ERK (56). El inhibidor UO126, específico para MEK, bloquea la formación de NETs inducida por PMA (Fig. 5.32a) tal como esta reportado (56). De igual manera, la liberación de NETs inducida por amibas también se bloquea en presencia del inhibidor de MEK (Fig. 5.32a). El inhibidor no afecta la viabilidad de *E.*

histolytica (Fig. 5.32b).

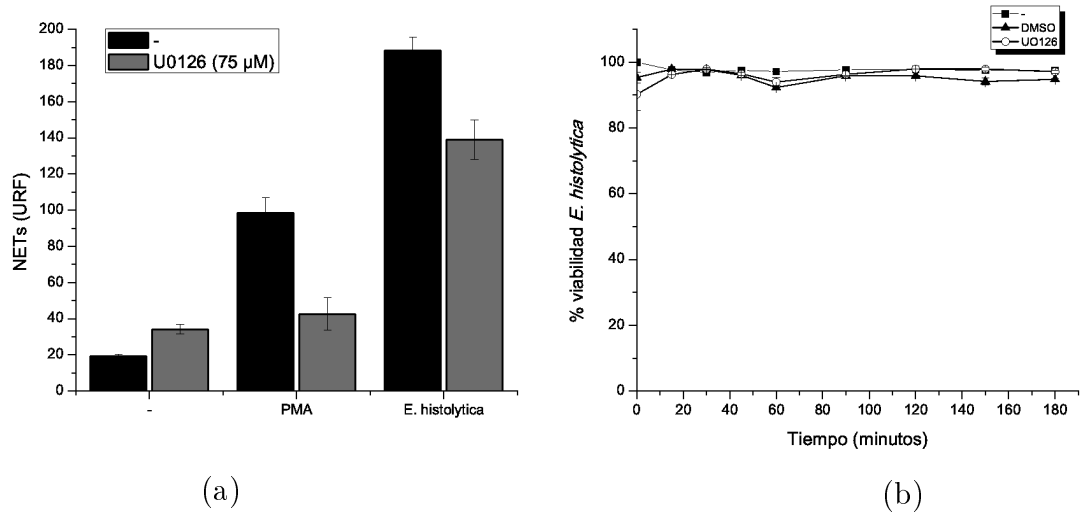


Figura 5.32: Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de U0126 75 μ M. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con *E. histolytica*. a) cuantificación de NETs, b) viabilidad de *E. histolytica* en presencia del inhibidor.

Los neutrófilos estimulados con PMA liberan NETs en su forma característica (Fig. 5.33). En presencia del inhibidor de MEK la mayoría de neutrófilos estimulados con PMA mantienen su núcleo lobulado, aunque hay algunos con el núcleo hinchado (Fig. 5.33). La NETs inducidas por *E. histolytica* en presencia del inhibidor se ven atenuadas, hay ADN disperso en el campo y algunos neutrófilos se ven con su núcleo compacto (fig. 5.33).

5. RESULTADOS

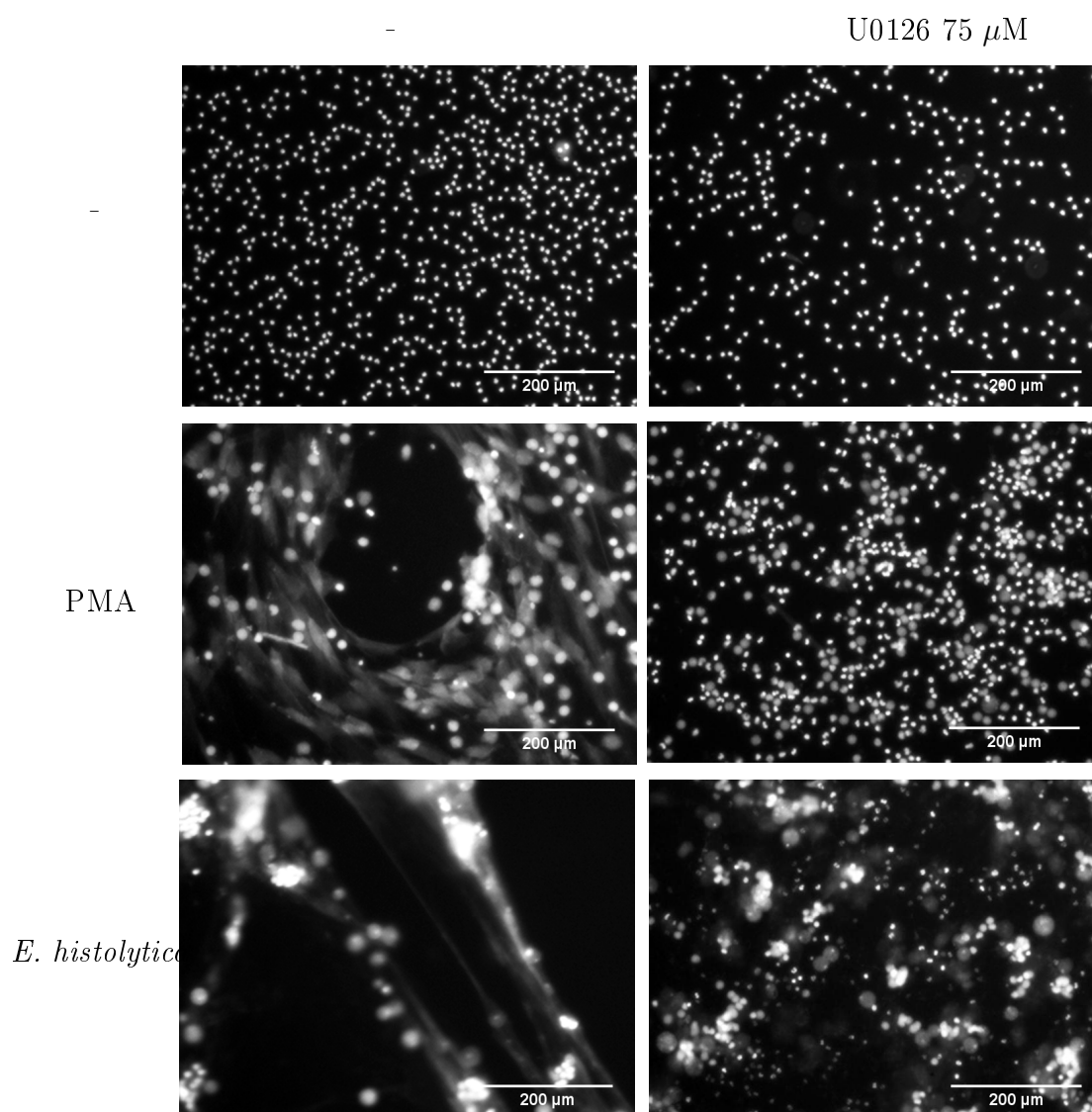


Figura 5.33: Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI . Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de U0126 75 μM. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con *E. histolytica*.

La activación de la cinasa ERK inducida por *E. histolytica* se determinó por Western blot de la forma fosforilada (activa) de ERK. Los neutrófilos al entrar en contacto con las amibas activan ERK en forma rápida, alcanzando un máximo de fosforilación a los 2 minutos (Fig. 5.34). Se observa una fuerte activación de ERK en los dos primeros minutos de estimulación. Después de este tiempo la fosforilación de ERK disminuye. Lo que muestra que *E. histolytica* activa a ERK en los neutrófilos (fig. 5.34a-b).

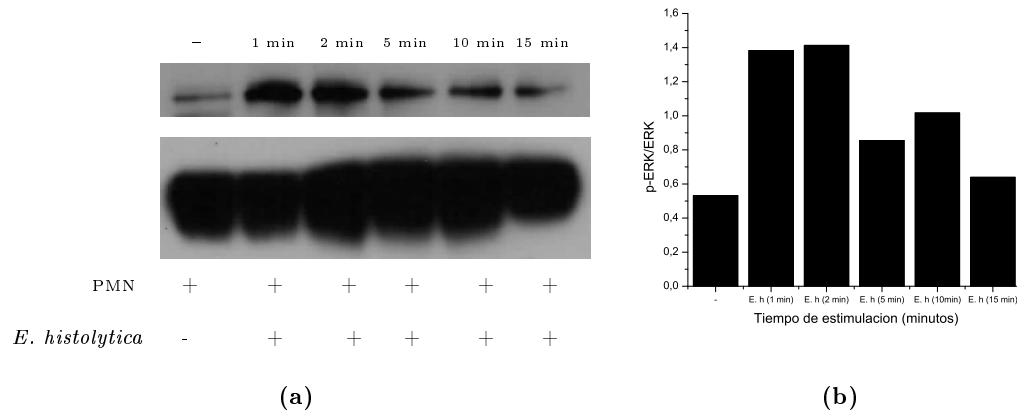


Figura 5.34: Fosforilación de ERK en neutrófilos estimulados con *E. histolytica*. a) Western blot b) cuantificación de western blot.

En presencia del inhibidor de Raf-1, la fosforilación de ERK inducida por *E. histolytica* se inhibe totalmente (Fig. 5.35). Este resultado indica que la vía Raf/MEK está siendo activada en los neutrófilos por acción de la estimulación con *E. histolytica* (Fig. 5.35).

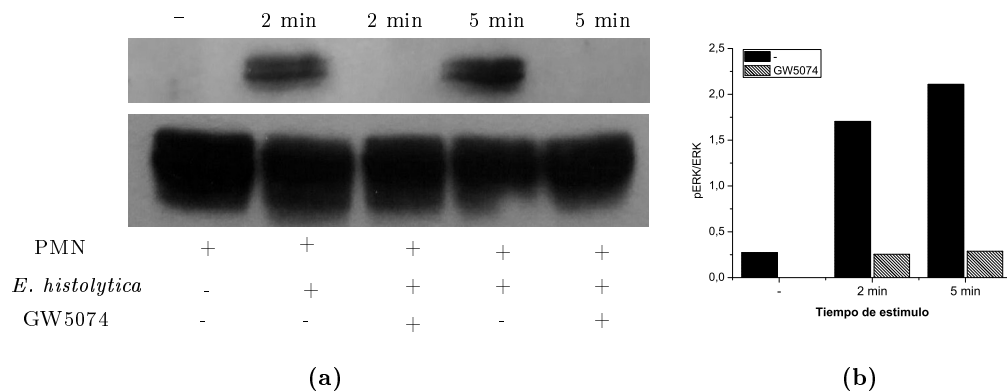


Figura 5.35: Fosforilación de ERK en neutrófilos estimulados con *E. histolytica* en presencia de inhibidor de Raf-1 GW5074. a) Western blot b) cuantificación de western blot.

En presencia del inhibidor de MEK, la fosforilación de ERK inducida por *E. histolytica* se ve fuertemente inhibida (Fig. 5.36). Este resultado sugiere fuertemente que la vía MEK/ERK está siendo activada en los neutrófilos por acción de la estimulación con *E. histolytica* (Fig. 5.36).

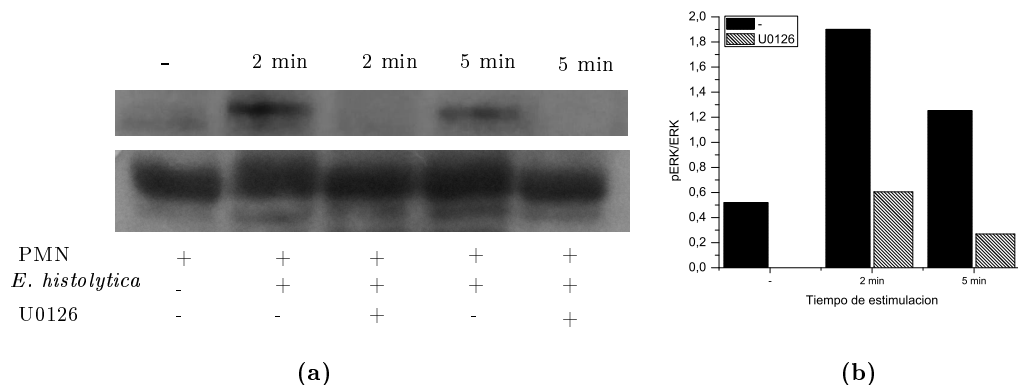


Figura 5.36: Fosforilación de ERK en neutrófilos estimulados con *E. histolytica* en presencia de inhibidor de MEK U0126. a) Western blot b) cuantificación de wester blot.

NF- κ B participa en la formación de NETs inducida por *E. histolytica*

La formación de NETs inducida por PMA también involucra la activación del factor nuclear NF- κ B (72). La cinasa de I κ B(IKK) fosforila al inhibidor de NF- κ B (I κ B), induciendo su degradación y con esto liberando a NF- κ B (13) (69). NF- κ B libre (activado) puede translocarse al núcleo y activar transcripción de genes (62). El inhibidor BAY 11-7082 bloquea la acción de IKK y con esto impide la activación de NF- κ B. En presencia de BAY 11-7082 la formación de NETs inducida por PMA es bloqueada (Fig. 5.37), tal y como se ha reportado antes (72). De la misma forma la formación de NETs inducida por *E. histolytica* que activa el factor nuclear NF- κ B (76), produjo una fuerte inhibición en las NETs inducidas tanto por PMA como por (fig. 5.37a). La viabilidad de *E. histolytica* a no se ve afectada por la presencia de (fig. 5.37b).

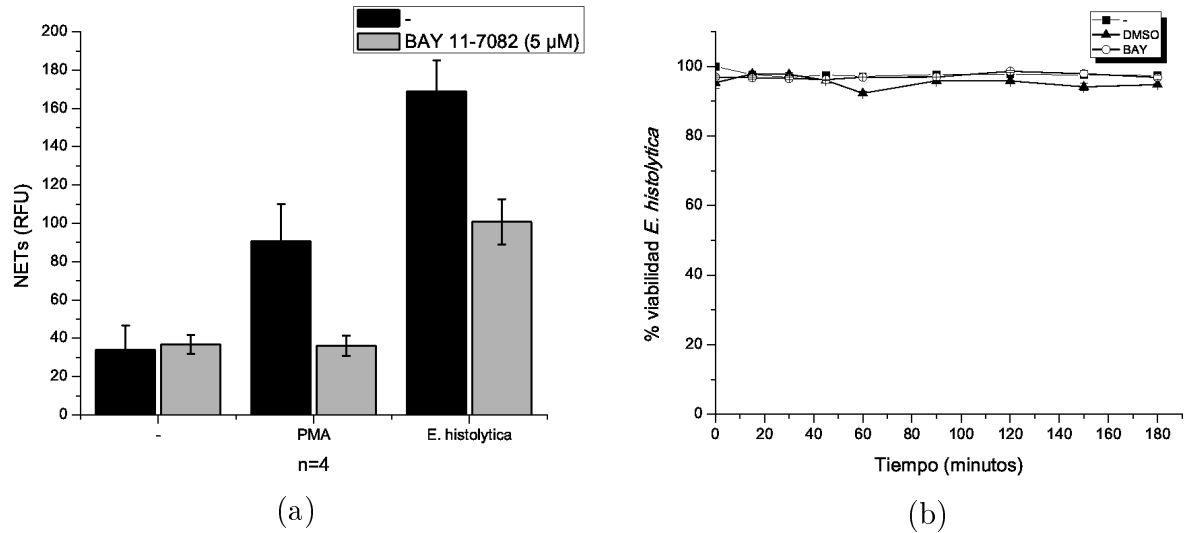


Figura 5.37: Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de BAY 11-7082 5 μ M. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con *E. histolytica*. a) Cuantificación de NETs, b) viabilidad de *E. histolytica* en presencia del inhibidor.

Los neutrófilos estimulados con PMA liberan NETs, pero en presencia BAY 11-7082 los neutrófilos estimulados con PMA no liberan NETs y su morfología es muy similar a los neutrófilos que no fueron estimulados (Fig. 5.38). Cuando los neutrófilos son estimulados con *E. histolytica* en presencia de BAY 11-7082 se ven los neutrófilos con su ADN compacto aun estando en contacto con *E. histolytica* (Fig. 5.38).

5. RESULTADOS

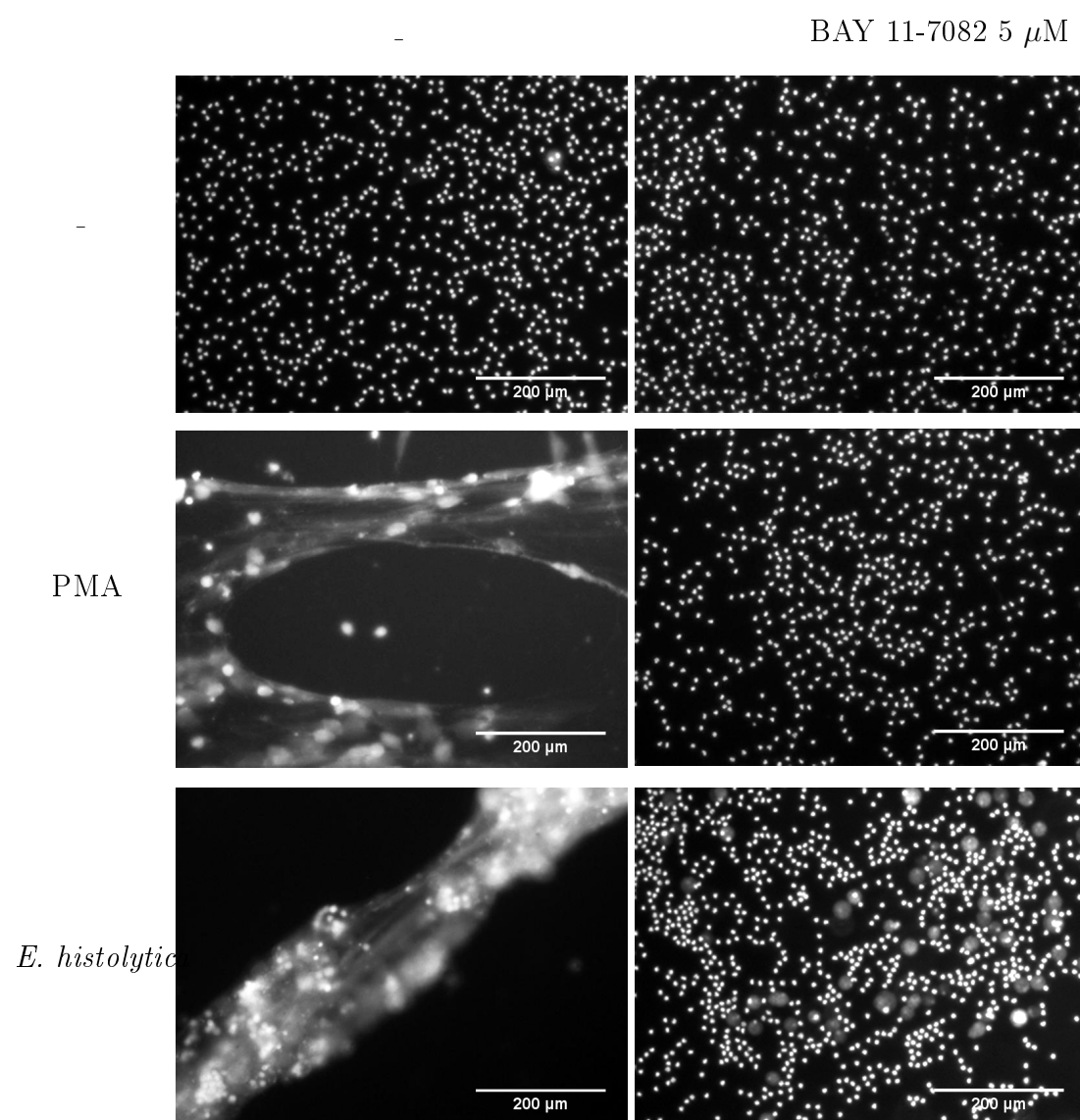


Figura 5.38: Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI . Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de BAY 11-7082 5 μ M. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con *E. histolytica*.

Además, cuando los neutrófilos son estimulados con *E. histolytica* se presenta una fuerte fosforilación del factor nuclear NF- κ B, que también refleja activación de este factor nuclear. La fosforilación de NF- κ B alcanza un máximo a los 5 minutos de estimulación (Fig. 5.39).

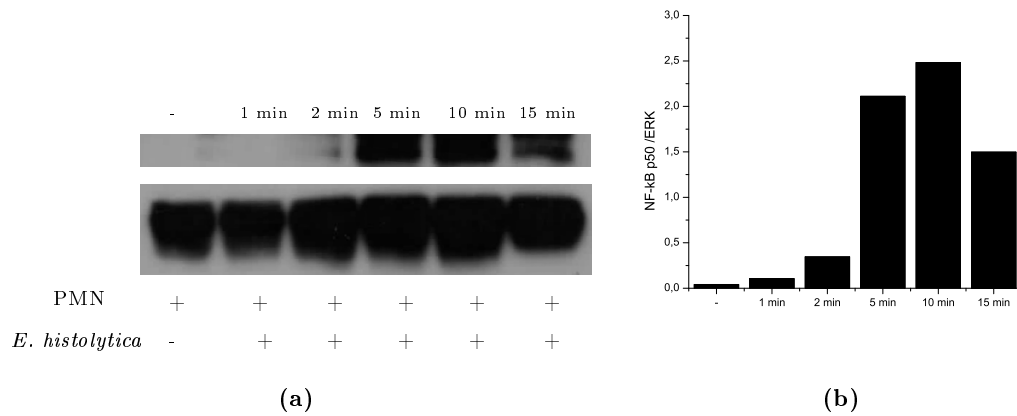


Figura 5.39: Fosforilación de NF- κ B en neutrófilos estimulados con *E. histolytica*. a) Western blot b) cuantificación de Western blot.

En presencia del inhibidor BAY 11-7082, la fosforilación de NF- κ B inducida por *E. histolytica* también se ve fuertemente inhibida (Fig. 5.40). Estos datos indican que NF- κ B es activada en neutrófilos por la estimulación con *E. histolytica* (Fig. 5.40).

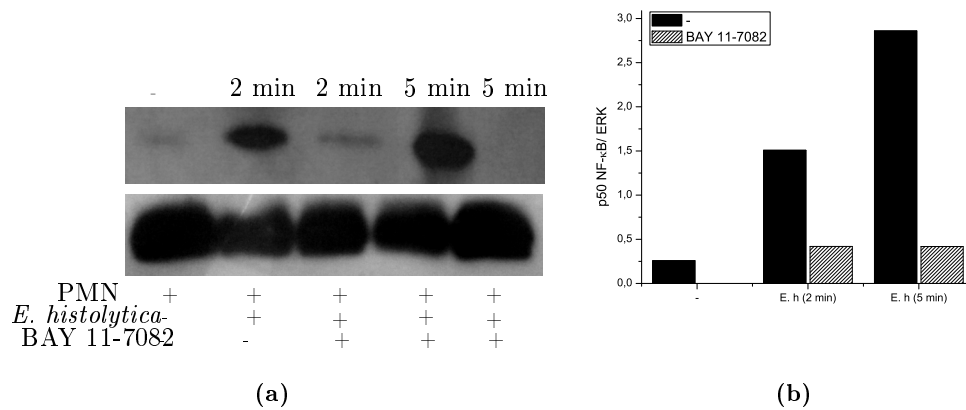


Figura 5.40: Fosforilación de NF- κ B en neutrófilos estimulados con *E. histolytica* a en presencia del inhibidor de IKK BAY 11-7082. a) Western blot b) cuantificación de western blot

También en presencia del inhibidor de MEK, U0126, la fosforilación de NF- κ B inducida por *E. histolytica* se ve fuertemente inhibida (Fig. 5.41). Estos datos indican que NF- κ B activada en neutrófilos por la estimulación con *E. histolytica* es dependiente de la activación de MEK/ERK (Fig. 5.41).

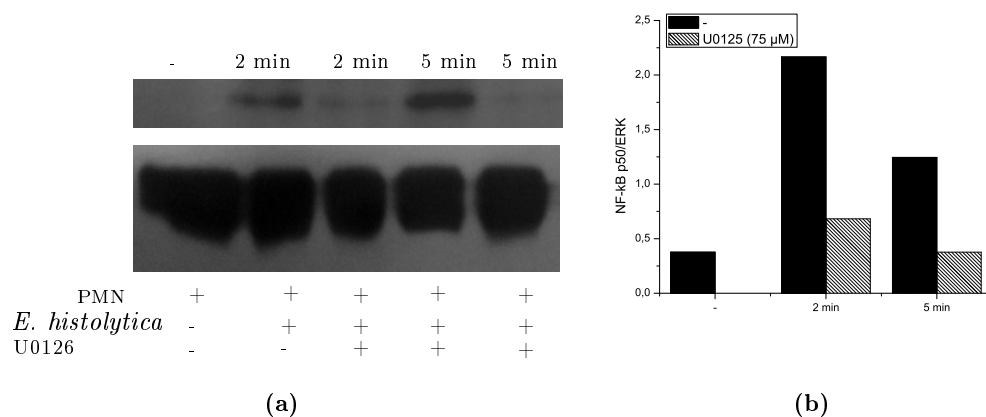
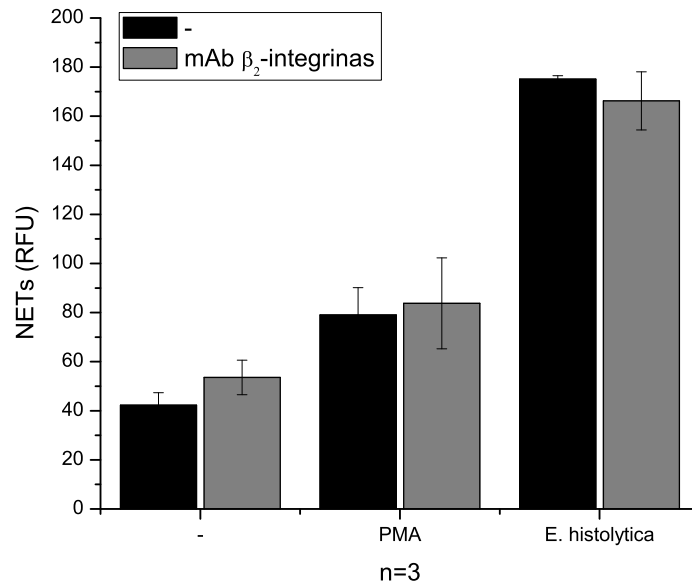


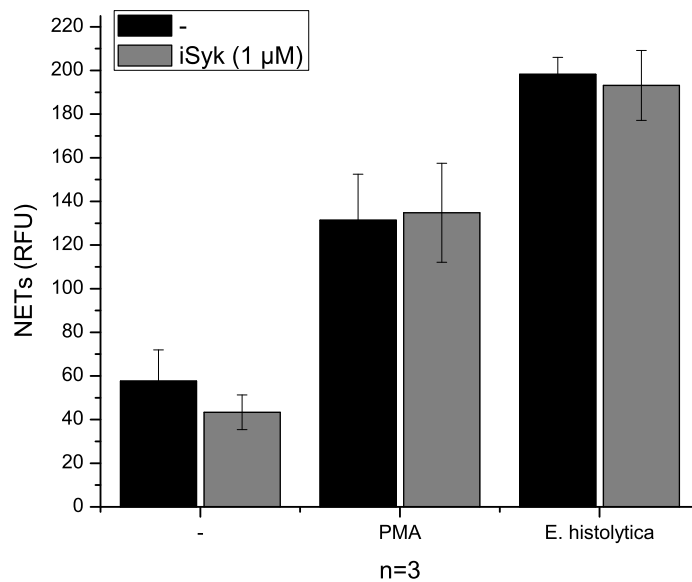
Figura 5.41: Fosforilación de NF- κ B en neutrófilos estimulados con *E. histolytica* en presencia del inhibidor de IKK MEK U0126. a) Western blot b) cuantificación de wester blot

β 2-integrinas y Syk no participan en la liberación de NETs inducida por *E. histolytica*.

Se ha reportado que las β 2-integrinas (CD18) están involucradas en la interacción entre *E. histolytica* y los neutrófilos (112) y que Syk es requerido en la vía de señalización de las β -integrinas (84). Al tratar a los neutrófilos con el anticuerpo monoclonal IB4, que es específico contra la cadena β 2 de las integrinas, no se observó disminución en la formación de NETs inducidas por *E. histolytica* (Fig. 5.42). El hecho de que el bloqueo de las integrinas con el anticuerpo IB4, no inhiba la formación de NETs sugiere que las integrinas β 2 no participan en este caso para la activación de NETosis. De igual manera, en presencia de un inhibidor específico para Syk (iSyk) tampoco se observó inhibición en la formación de NETs inducida por *E. histolytica* (Fig. 5.42). Los datos muestran que ni CD18 ni Syk están involucrados en la formación de NETs inducidos por *E. histolytica* (Fig. 5.43 Y Fig. 5.44).



(a)



(b)

Figura 5.42: Cuantificación de NETs inducidas por PMA o *E. histolytica* realizando tinción con SYTOX GREEN. a) Cuantificación de NETs en presencia de mAb IB4, b) Cuantificación de NETs en presencia de inhibidor iSyk 1 μ M).

5. RESULTADOS

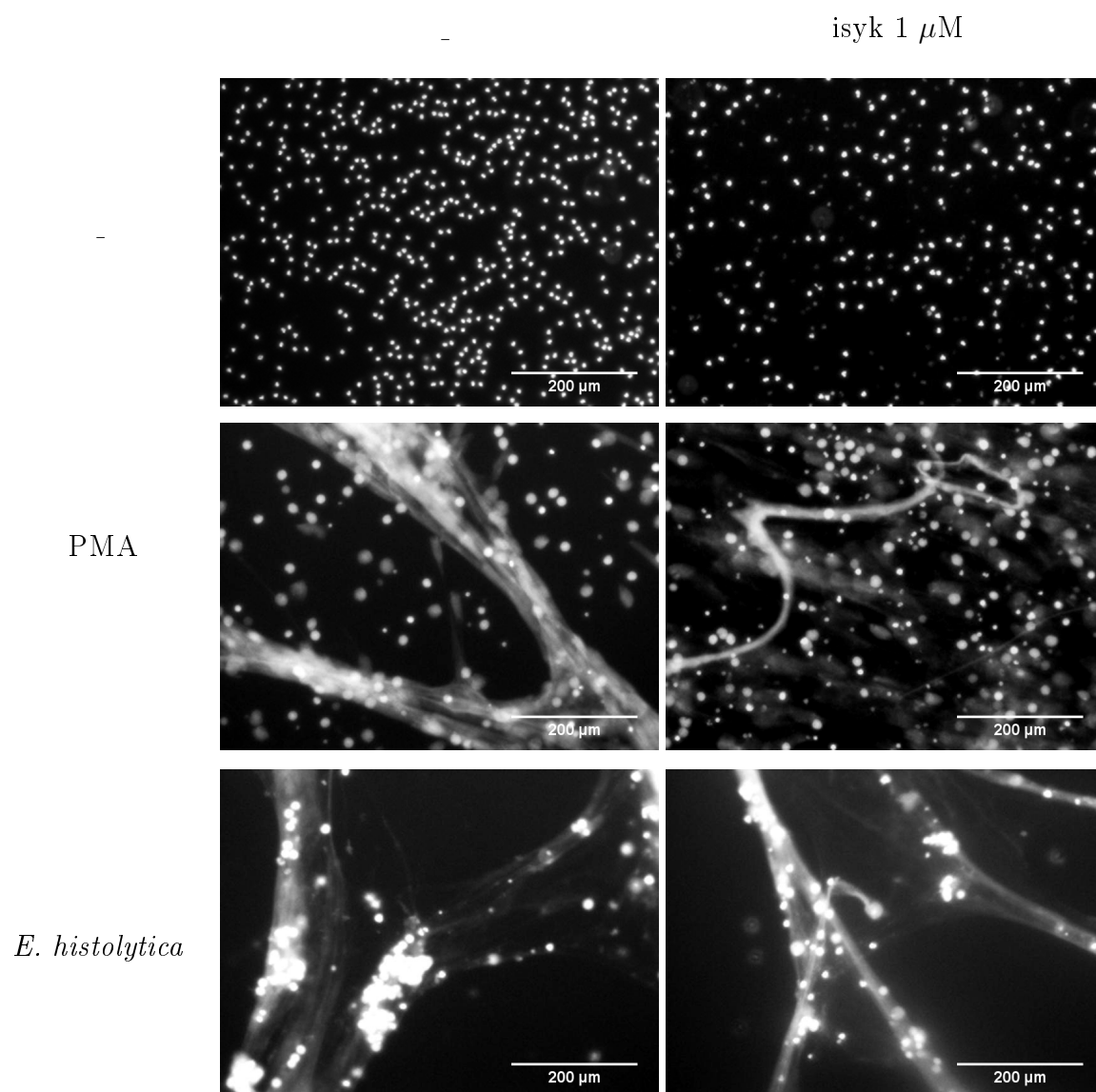


Figura 5.43: Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI . Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de iSyk 1 μM. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con *E. histolytica*

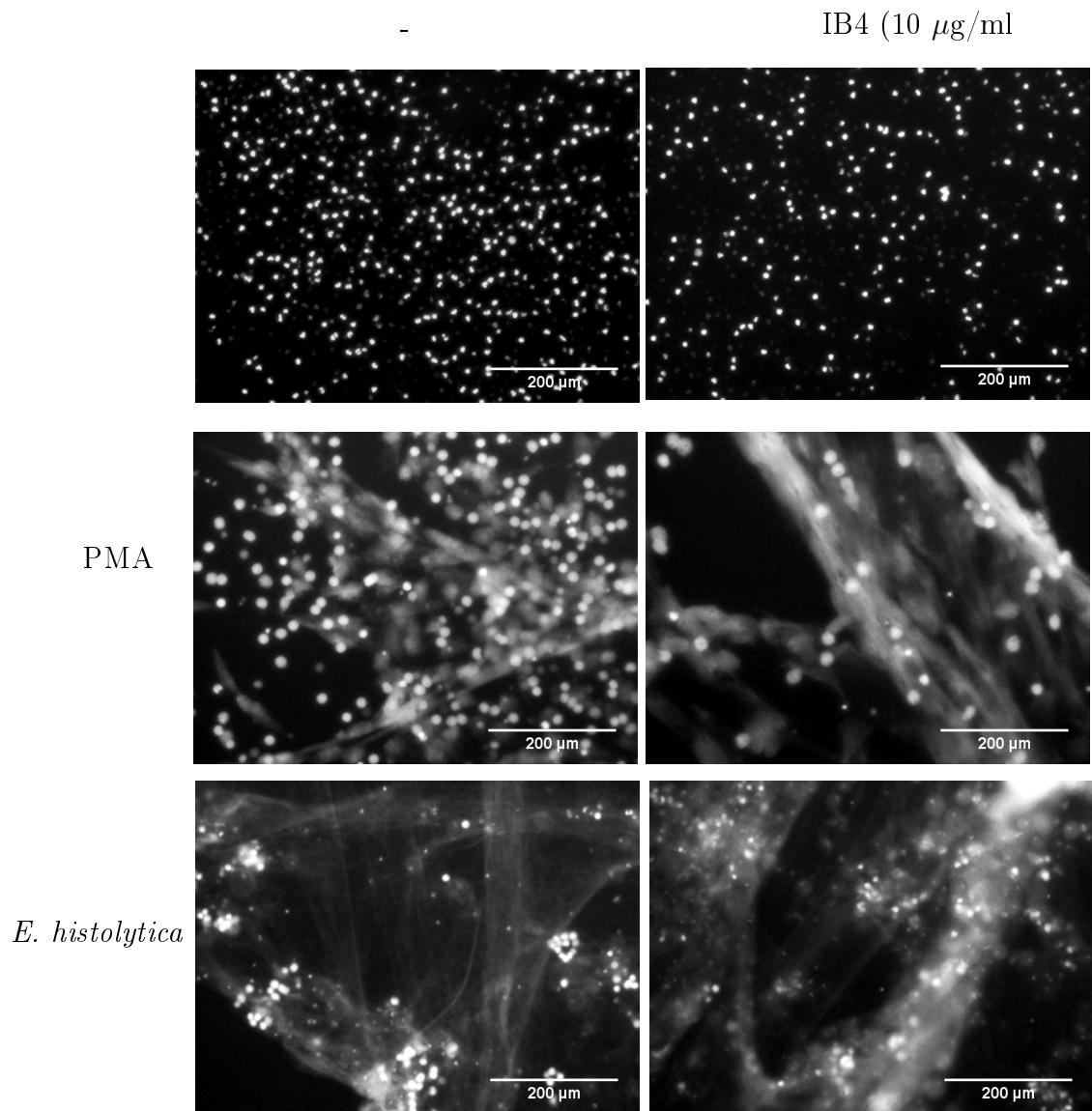


Figura 5.44: Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI . Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de anticuerpo anti CD18 (IB4). Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con *E. histolytica*

TAK-1, PI3K y p38 MAPK no son requeridos en la formación de NETs inducida por *E. histolytica*.

Los neutrófilos también pueden formar NETs cuando son inducidos a través del receptor de anticuerpos $\text{Fc}\gamma\text{RIIIb}$ (4). En la vía de señal que este receptor activa para

5. RESULTADOS

inducir NETs la cinasa TAK1 participa . Para probar si esta cinasa también pudiera participar en la vía de señal que activan las amibas para formar NETs, los neutrófilos se trataron con un inhibidor específico de TAK1. El inhibidor LLZ 1640-2-2 bloquea a TAK1 e inhibe la formación de NETs inducida por el receptor Fc γ RIIIb (Fig. 5.45). Al contrario, en presencia de este inhibidor la formación de NETs inducida por *E. histolytica* no fue inhibida (Fig. 5.45).

Adicionalmente, probamos si las moléculas de señal PI3K y p38 MAPK pudieran participar en la formación de NETs inducida por *E. histolytica*. Para esto se usaron los inhibidores Wortmannin y SB 203580, que bloquean específicamente a PI3K y a p38 MAPK, respectivamente. En presencia de estos inhibidores no hubo disminución significativa en la formación de NETs inducida por las amibas (Fig. 5.45). Estos datos sugieren que ninguna de estas moléculas participa en la formación de NETs inducida por *E. histolytica* (Figs. 5.45,5.46, 5.47, 5.48).

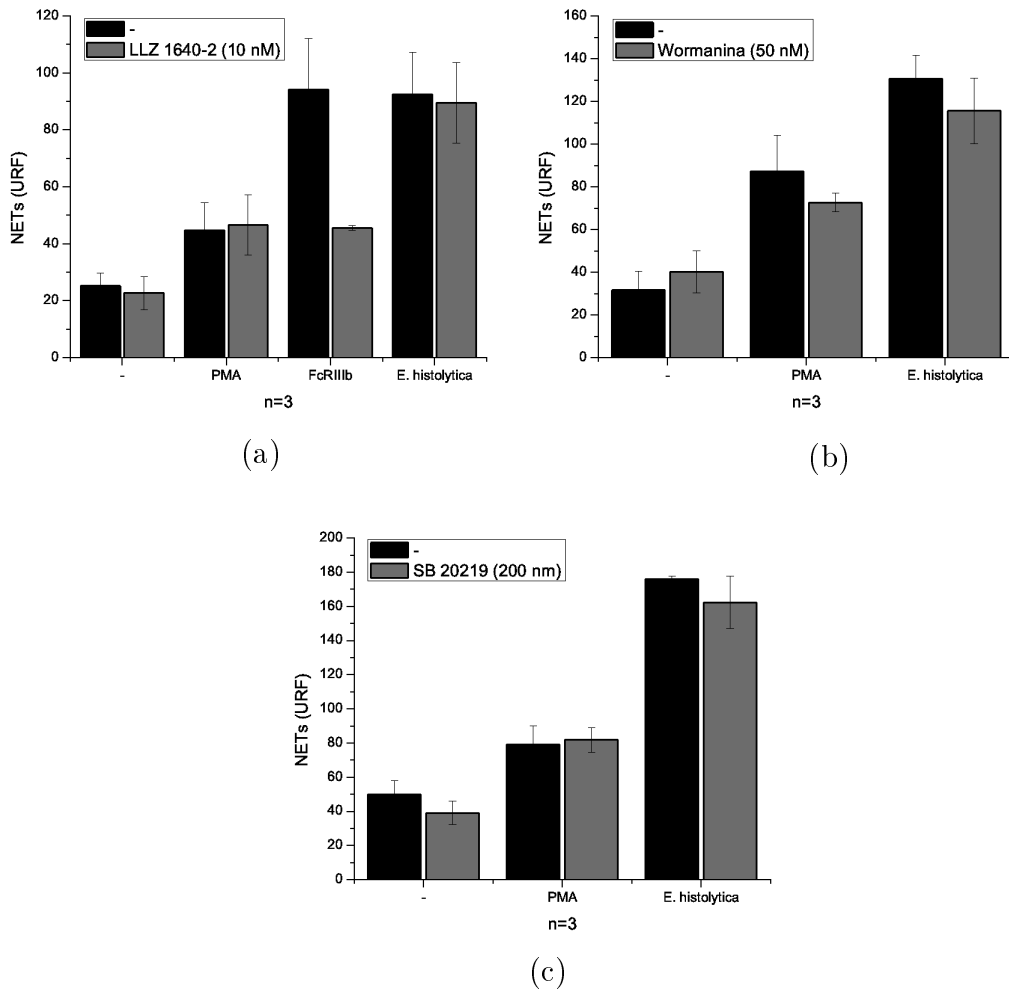


Figura 5.45: Cuantificación de NETs inducidas por PMA o *E. histolytica* realizando tinción con SYTOX GREEN. a) Cuantificación de NETs en presencia de inhibidor de TAK-1 (LLZ 1640-2), b) Cuantificación de NETs en presencia de inhibidor de PI3K (wornianina), c) Cuantificación de NETs en presencia de inhibidor de P38 MAP (SB 203580).

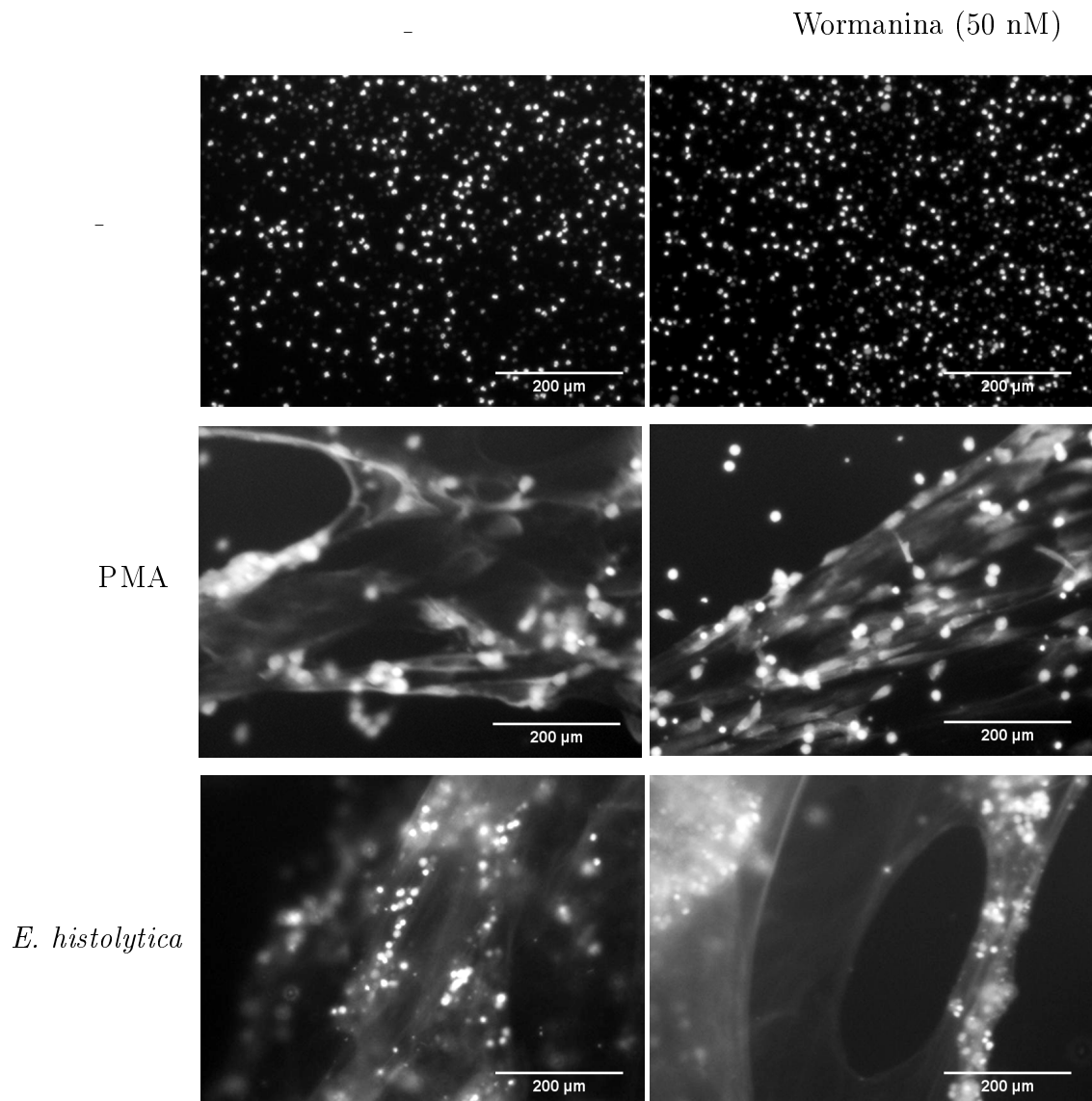


Figura 5.47: Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI . Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de wormanina 50nM. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con *E. histolytica*

5. RESULTADOS

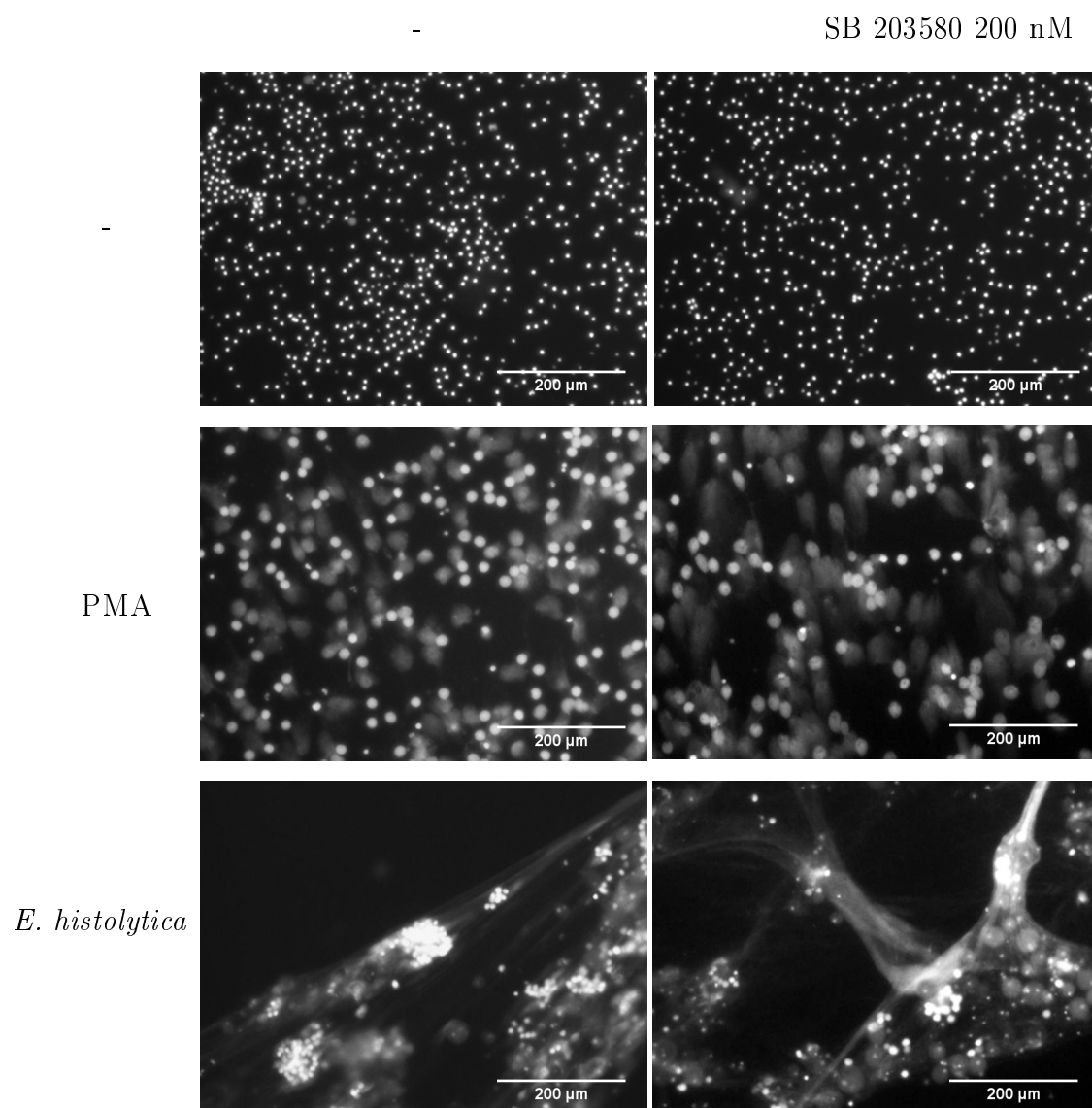


Figura 5.48: Microscopia de fluorescencia, tinción con DAPI . Neutrófilos estimulados en presencia o ausencia de Sb 202191 0,2 μ M. Los neutrófilos fueron estimulados con PMA o con *E. histolytica*

Discusión

En este trabajo se confirmó que *E. histolytica* induce NETs (12) (125) y se encontró además que el mecanismo de formación de NETs es diferente al que induce el PMA. Cuando los neutrófilos se activan con amibas, las NETs se liberan mucho más rápido. El proceso comienza desde los primeros minutos de estimulación y después de dos horas ya han liberado la máxima cantidad de NETs (Fig. 5.1). A diferencia de esto, la estimulación con PMA induce la liberación de NETs hasta después de dos horas de estimulación (21)(Fig 5.1). La cuantificación de las NETs y las imágenes tomadas muestran que los neutrófilos estimulados con el parásito liberan mayor cantidad de NETs que el PMA que es conocido por ser un fuerte inductor de NETs (21). Durante mucho tiempo el papel de los neutrófilos en la infección por *E. histolytica* era poco claro. Sin embargo con los resultados en este trabajo es posible reinterpretar todos aquellos reportes en modelos in vivo e in vitro que afirmaban que *E. histolytica* causaba la lisis de los neutrófilo al entrar en contacto con el parásito (54) (29) (66) (120). Hoy podemos estar seguros que el fenómeno que realmente ocurre es la liberación de NETs inducidas por el parásito.

Por otra parte los videos de la formación de NETs inducidas por *E. histolytica* sugieren fuertemente que este proceso es dependiente del contacto membrana-membrana entre *E. histolytica* y el neutrófilo, ya que la liberación de ADN empieza después de la interacción entre las dos células. Los neutrófilos que no tienen contacto con el parásito no liberan NETs. Estas observaciones también se correlacionan con los reportes en modelos in vivo e in vitro en los cuales se reportó que sólo el contacto entre las dos células inducía la lisis del neutrófilo (120) (111) (52).

Se ha descrito en modelos animales que los neutrófilos llegan desde la primera hora al sitio de infección con *E. histolytica* e inmediatamente rodean al parásito (28)(120). Aquí mostramos que la liberación de NETs se produce desde los primeros minutos de estimulación, lo que indica que desde las primeras etapas de infección los neutrófilos podrían estar liberando NETs para contener la infección por *E. histolytica*.

En otros reportes se había mostrado que los neutrófilos juegan un papel fundamen-

6. DISCUSIÓN

tal en la defensa contra la amibiasis en las primeras etapas de la infección (9) (109) (109), aunque no estaba claro cuál era el mecanismo de protección de los neutrófilos contra esta infección. En este trabajo se demuestra que el ADN liberado en las NETs atrapa a las amibas, posiblemente para impedir que éstas puedan moverse y propagarse a otros órganos. Lo anterior sugiere que la formación de NETs puede ser el mecanismo de protección de los neutrófilos en la amibiasis. Observaciones similares de biopsias de pacientes con la infección, sugieren que los neutrófilos al morir protegen de la infección. Aunque en esta interpretación se ha pensado que el exudado necrótico resultante de la lisis del neutrófilo funcionaba como un muro que contiene al trofozoíto (52). También es probable que las NETs inducidas por el parásito además de evitar la propagación del parásito, impidan el contacto del trofozoíto con células de tejido infectado y proteja al tejido del daño lítico que puede causar el parásito. Algunas observaciones en modelos in vivo sugerían que la gran infiltración de neutrófilos a los lugares de infección y su posterior lisis impide el contacto con el tejido invadido del hospedero (52).

Una observación interesante en las imágenes de este trabajo es que cuando las amibas se desplazan arrastran con ellas a los neutrófilos adheridos y al ADN que éstos han liberado, en lo que parece ser un intento por liberarse de la red de ADN expulsada por el neutrófilo. Nuestras imágenes también revelan que el ADN expulsado por el neutrófilo rodea al parásito formando una especie de pinzas que al parecer disminuye inmediatamente el movimiento de la amiba. La evidencia de que las amibas estén cubiertas de ADN es un indicativo para afirmar con seguridad que las NETs expulsadas por los neutrófilos funcionan para disminuir el movimiento de la amiba. Ya que como se reportó antes la viabilidad del parásito se ve poco afectada con las NETs (12). Las NETs juegan un papel en la defensa contra microorganismos que no son fácilmente fagocitados, como es el caso de *E. histolytica*, que aunque no se puede fagocitar si es posible impedir su propagación por medio del mecanismos de las NETs.

Cuando los neutrófilos son estimulados con el medio en que crecieron las amibas, o con el homegenado de *E. histolytica*, no hay liberación de NETs. Este dato confirma que la liberación de NETs inducidas por *E. histolytica* es dependiente del contacto membrana-membrana. La viabilidad de la amiba parece ser un factor indispensable para liberar NETs ya que las amibas fijadas no tienen la capacidad de inducir NETs aun cuando las membranas quedan intactas. Cuando los neutrófilos son estimulados con amibas previamente fijadas, los PMN forman rosetas alrededor de la amiba pero no hay formación de NETs. Las imágenes donde se forman rosetas también concuerdan con los reportes en modelos in vivo que afirman que trofozoítos de *E. histolytica* fijados o membranas del parásito inducen la atracción de neutrófilos hacia el sitio donde las amibas se encuentran (105) (29).

Al exponer los neutrófilos a *E. dispar* una amiba morfológicamente indistinguible de *E. histolytica* pero sin capacidad invasiva se observó que ésta no induce NETs, no induce degranulación, no genera formación de ROS ni tampoco afecta la cantidad de

NETs inducidas por *E. histolytica* cuando ambas amibas se encuentran juntas. Las imágenes tomadas muestran que cuando se ponen las dos especies de amibas éstas quedan atrapadas sobre una nube de ADN. Muchos reportes epidemiológicos afirman que algunas infecciones pueden corresponder a una mezcla de los dos tipos de amibas (19). Es probable entonces que las NETs liberadas en respuesta a *E. histolytica* también puedan atrapar a *E. dispar* y contribuir a la defensa en contra de esta amiba. *E. dispar* aunque no es invasiva si es un comensal (34).

Este es el primer trabajo que reporta que *E. dispar* no induce NETs, es probable que este sea un proceso en que la patogenicidad del microorganismo es un factor importante en la respuesta del sistema inmune y en la liberación de NETs. Ya se ha reportado que los neutrófilos pueden discriminar entre diferentes tipos de lipopolisacáridos (LPS) proveniente de fuentes diferentes de bacterias y que sólo algunos serotipos de LPS activan la liberación de NETs (93). Es muy probable que si un microorganismo no representa riesgo para el anfitrión la respuesta del sistema inmune sea más débil como en el caso de *E. dispar*. Esta idea tiene sentido ya que la liberación de NETs también libera sustancias inflamatorias que podría producir daño en el anfitrión (68).

No sólo la patogenicidad parece ser una característica importante sino además la capacidad invasiva de microorganismo. Es claro que cuando la amiba pierde la viabilidad o se le restringe su movilidad, los neutrófilos no la consideran una amenaza y por tanto no liberan NETs. Todo esto se correlaciona con ensayos en que las amibas que son inactivadas por calor, por amebicidas no pueden inducir lisis de neutrófilos (66). Igualmente las especies no patógenas tampoco causan la lisis de neutrófilos (66).

Las NETs inducidas con *E. histolytica* son inhibidas cuando los trofozoítos son pretratados con citocalasina B, un inhibidor de la polimerización de actina (116). Los videos tomados durante dos horas y 30 minutos cuando las amibas son pretratadas con citocalasina B indican que no fue posible inhibir completamente la movilidad del parásito. Este hecho podría ser la razón por la cual la inhibición de las NETs en presencia de citocalasina B es parcial y no total. Los datos también demuestran que las amibas con el citoesqueleto inhibido conservan la actividad quimioatrayente hacia los neutrófilos. Ya en estudios anteriores se había demostrado que el uso de citocalasina B disminuye la capacidad citolítica de las amibas hacia células blanco como las células CHO y los mismos neutrofilos (98) (54). Es probable que el mecanismo de acción de la inhibición de NETs con el uso de citocalasina B, este relacionado con la disminución en la capacidad de adhesión entre las amibas y los neutrófilos previniendo el contacto íntimo entre el parásito y el neutrófilo (110) (99).

Cuando se adiciona galactosa al medio en donde los neutrófilos se estimulan con *E. histolytica*, la formación de NETs se inhibe en una forma dependiente de la concentración de la galactosa. La inhibición de NETs por adición de galactosa en el medio indica que se puede requerir la participación de receptores tipo lectina en el reconocimiento

6. DISCUSIÓN

entre el neutrófilo y el parásito y la posterior inducción de NETs. Una posible molécula que puede participar en la unión amiba–neutrófilo es la lectina Gal/GalNAc, la cual es reconocida como ser un factor de virulencia responsable de la actividad citolítica de la amiba (83) (89) (36) (91). Se ha descrito que esta lectina reconoce exclusivamente residuos de galactosa y de N-acetil-D-galactosamina (101). Sin embargo, un hallazgo muy importante en este trabajo es que la manosa también inhibe la liberación de NETs, aunque en menor proporción que la galactosa. Estos resultados nos permiten proponer que algún receptor tipo lectina del neutrófilo puede ser el responsable de la inducción de NETs inducidas por *E. histolytica*. Muchos receptores tipo lectina en el neutrófilo reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (136) (30).

Un resultado curioso e inesperado es el hecho de que la formación de NETs inducidas por PMA fue inhibida en presencia de manosa. Los mecanismos por los cuales este fenómeno ocurre no están comprendidos. La viabilidad de los neutrófilos no se ve comprometida por la presencia de los azúcares.

Aquí se demostró que la liberación de NETs inducida por *E. histolytica* se inhibe por el DPI, un inhibidor de la NADPH oxidasa y por tanto de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto inicialmente sugiere que la formación de NETs provocada por *E. histolytica* es también dependiente de ROS. Sin embargo, encontramos que esta inhibición parcial era en realidad a causa de la pérdida de viabilidad de las amibas. Aunque se ha reportado que *E. histolytica* induce formación de ROS en neutrófilos (113), la producción de ROS no se evaluó directamente sino que se interpretó como un efecto de la apoptosis del neutrófilo inducido por la amiba (113). En este trabajo, con el uso de tres metodologías diferentes, se demostró que la liberación de NETs inducidas por *E. histolytica* es un proceso independiente de la formación de ROS. Esto ha sido también reportado para la formación de NETs inducida por otros microorganismos, como *Leishmania donovani* (45), *Streptococcus pneumoniae* (86) *Staphylococcus aureus* (94), *Candida albicans*(24) .

El receptor del neutrófilo involucrado en el reconocimiento de la amiba y en la inducción de la formación de NETs se desconoce. Sin embargo, el receptor Dectina 1 es un candidato interesante. En infecciones con el hongo *candida albicans* los neutrófilos forman NETs en un proceso que es independiente de especies reactivas de oxígeno (24) (63). Además se ha propuesto que el β -glucano de *c. albicans* es la molécula responsable de inducir la liberación de NETs (63). Dadas las similitudes en el proceso de formación de NETs inducida por *c. albicans* y *E. histolytica* pensamos que Dectina 1 es el posible receptor que el neutrófilo usa para reconocer a la amiba e inducir la formación de NETs.

La vía de señal que induce la formación de NETs no se conoce completamente. Para el caso de estimular a los neutrófilos con PMA, un fuerte inductor farmacológico de NETs, se ha reportado que PMA activa a PKC y activa la vía Raf/MEK/ERK (51),(56). Aunque esta forma de activación ha sido muy útil para describir el proceso

de NETosis, la vía o vías que son activadas por receptores específicos se desconocen. De los varios receptores que pueden reconocer microorganismos los TLRs se han propuesto como posibles iniciadores de NETs, pero esto no ha sido comprobado experimentalmente. Solamente dos receptores en el neutrófilo han sido identificados como iniciadores de la formación de NETs, el Fc γ RI (6) y el Fc γ RIIIb (4) (16). Para el receptor Fc γ RIIIb la vía de señal se ha descrito parcialmente (5). En este caso el receptor activa a la cinasa TAK1 y está se conecta con la vía MEK/ERK. Tal como lo mencionamos antes, el receptor del neutrófilo que reconoce a la amiba y que lleva a la formación de NETs no se conoce, pero aún así exploramos si la vía de señal que se activa por la amiba es la misma que activa el PMA o la que activa el Fc γ RIIIb.

En esta tesis encontramos que la PKC no participa en la formación de NETs inducida por *E. histolytica*. Este resultado no es del todo sorprendente, ya que también vimos que la formación de NETs es un proceso independiente de especies reactivas de oxígeno. Ya se ha reportado que el PMA, a través de PKC, lleva a la activación de NADPH oxidasa para generar ROS (43) (80) (31) (39). Entonces, es probable que PKC no se requiera en el caso de las amibas ya que las NETs se forman independientemente de ROS.

Sin embargo, la vía de señal inducida por *E. histolytica* para formar NETs, comparte la cascada de Raf/MEK/ERK. En el caso de otro parásito, *Toxoplasma gondii*, también se ha reportado que la vía de señalización Raf/MEK/ERK participa en la formación de NETs (1). Entonces parece que varios receptores pueden iniciar señalización en forma diferente, pero todos convergen en la vía Raf/MEK/ERK para inducir la formación de NETs.

Por otro lado, también se reportó que las NETs inducidas por PMA requieren de la activación del factor nuclear NF- κ B para formarse (72). El mecanismo por el cual NF- κ B participa en NETosis se desconoce y por tanto el significado de esto es oscuro. En el caso de la formación de NETs inducida por el Fc γ RIIIb, NF- κ B no parece ser importante (4). En el caso de las amibas el factor nuclear NF- κ B es activado y también se requiere para la formación de NETs. ¿Por qué NF- κ B parece ser necesario en algunos casos y no en otros para la formación de NETs? Esta es una pregunta interesante que queda sin resolver y que requerirá estudios más detallados en el futuro.

Conclusiones

- La liberación de NETs inducidas por *E. histolytica* ocurre desde los primeros minutos de estimulación, en este proceso es necesario el contacto membrana-membrana entre el neutrófilo y el trofozoíto.
- Los neutrófilos estimulados con *E. dispar* no liberan NETs, no producen especies reactivas de oxígeno y no degranulan.
- Las NETs inducidas por *E. histolytica* son dependientes de la viabilidad y la movilidad del parásito.
- La adición de manosa y galactosa al medio en el cual interaccionan las células inhibe la formación de NETs inducidas por *E. histolytica*.
- La formación de NETs inducidas por *E. histolytica* son independientes de la formación de especies reactivas de oxígeno.
- La vía de señalización en la formación de NETs inducidas por *E. histolytica* es Raf/MEK/ERK y la activación de NF- κ B.
- PKC, Syk, PI3-K, TAK-1 y p38 MAP no participan en la vía de señalización para la formación de NETs inducidas por *E. histolytica*.

Perspectivas

- La formación de NETs inducidas por *E. histolytica* en presencia otros monosacáridos o polisacáridos podría ayudar a aclarar que tipo de interacción ocurre entre el parásito y el neutrófilo en la formación de NETs, y el posible receptor o receptores involucrados en este proceso.
- La adición de manosa inhibe fuertemente la formación de NETs inducidas por PMA, es necesario realizar mas ensayo para determinar el mecanismo por el cual ocurre esta inhibición.
- Los experimentos en este trabajo se realizaron en un modelo *in vitro*. El estudio de este fenómeno en modelos *in vivo* podría dar información de como las NETs influyen en la amibiasis.
- se determino que NF- κ se activa en lo neutrófilos durante la liberación de NETs inducidas por *E. histolytica*, sin embargo aun no se ha establecido como se activa este factor nuclear.

Bibliografía

- [1] D. S. A. ABDALLAH AND E. Y. DENKERS, *Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites*, *Frontiers in immunology*, 3 (2012). [19](#), [81](#)
- [2] D. S. A. ABDALLAH, C. LIN, C. J. BALL, M. R. KING, G. E. DUHAMEL, AND E. Y. DENKERS, *Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps*, *Infection and immunity*, 80 (2012), pp. 768–777. [4](#)
- [3] M. AGUIRRE-GARCÍA, M. ANAYA-RUIZ, AND P. TALAMÁS-ROHANA, *Membrane-bound acid phosphatase (MAP) from entamoeba histolytica has phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells*, *Parasitology*, 126 (2003), pp. 195–202. [11](#)
- [4] O. R. ALEMÁN, N. MORA, R. CORTES-VIEYRA, E. URIBE-QUEROL, AND C. ROSALES, *Differential use of human neutrophil Fc γ receptors for inducing neutrophil extracellular trap formation*, *Journal of immunology research*, 2016 (2016). [4](#), [71](#), [81](#)
- [5] ———, *Transforming growth factor- β -activated kinase 1 is required for human Fc γ B μ ib-induced neutrophil extracellular trap formation*, *Frontiers in immunology*, 7 (2016). [81](#)
- [6] E. ALEYD, M. W. VAN HOUT, S. H. GANZEVLES, K. A. HOEBEN, V. EVERTS, J. E. BAKEMA, AND M. VAN EGMOND, *IgA enhances NETosis and release of neutrophil extracellular traps by polymorphonuclear cells via Fc α receptor I*, *The Journal of Immunology*, 192 (2014), pp. 2374–2383. [4](#), [81](#)
- [7] I. K. M. ALI, C. G. CLARK, AND W. A. PETRI, *Molecular epidemiology of amebiasis*, *Infection, Genetics and Evolution*, 8 (2008), pp. 698–707. [9](#)
- [8] B. AMULIC, C. CAZALET, G. L. HAYES, K. D. METZLER, AND A. ZYCHLINSKY, *Neutrophil function: from mechanisms to disease*, *Annual review of immunology*, 30 (2012), pp. 459–489. [3](#), [17](#), [18](#), [56](#)

-
- [9] A. ASGHARPOUR, C. GILCHRIST, D. BABA, S. HAMANO, AND E. HOUP, *Resistance to intestinal entamoeba histolytica infection is conferred by innate immunity and Gr-1+ cells*, Infection and immunity, 73 (2005), pp. 4522–4529. [2](#), [17](#), [78](#)
- [10] J. AUCOTT AND J. RAVDIN, *Amebiasis and "nonpathogenic" intestinal protozoa.*, Infectious disease clinics of North America, 7 (1993), pp. 467–485. [7](#)
- [11] N. AUTHORS LISTED, *WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997*, Epidemiol Bull, 18 (1997), pp. 13–14. [5](#)
- [12] E. E. ÁVILA, N. SALAIZA, J. PULIDO, M. C. RODRÍGUEZ, C. DÍAZ-GODÍNEZ, J. P. LACLETTE, I. BECKER, AND J. C. CARRERO, *Entamoeba histolytica trophozoites and lipopeptidophosphoglycan trigger human neutrophil extracellular traps*, PLoS one, 11 (2016), p. e0158979. [4](#), [19](#), [77](#), [78](#)
- [13] P. BAEUERLE AND D. BALTIMORE, *I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor*, Science, 242 (1988), pp. 540–546. [64](#)
- [14] D. BANSAL, P. AVE, S. KERNEIS, P. FRILEUX, O. BOCHÉ, A. C. BAGLIN, G. DUBOST, A.-S. LEGUERN, M.-C. PREVOST, R. BRACHA, ET AL., *An ex-vivo human intestinal model to study Entamoeba histolytica pathogenesis*, PLoS neglected tropical diseases, 3 (2009), p. e551. [13](#)
- [15] I. BECKER, R. PÉREZ-TAMAYO, I. MONTFORT, A. M. ALVIZOURI, AND R. PÉREZ-MONTFORT, *Entamoeba histolytica: role of amebic proteinases and polymorphonuclear leukocytes in acute experimental amebiasis in the rat*, Experimental parasitology, 67 (1988), pp. 268–280. [2](#)
- [16] M. BEHNEN, C. LESCHCZYK, S. MÖLLER, T. BATEL, M. KLINGER, W. SOLBACH, AND T. LASKAY, *Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via Fc γ RIIIB and mac-1*, The Journal of Immunology, 193 (2014), pp. 1954–1965. [4](#), [81](#)
- [17] K. BEITER, F. WARTHA, B. ALBIGER, S. NORMARK, A. ZYCHLINSKY, AND B. HENRIQUES-NORMARK, *An endonuclease allows streptococcus pneumoniae to escape from neutrophil extracellular traps*, Current Biology, 16 (2006), pp. 401–407. [19](#)
- [18] N. BORREGAARD, O. E. SØRENSEN, AND K. THEILGAARD-MÖNCH, *Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins*, Trends in immunology, 28 (2007), pp. 340–345. [18](#)
- [19] L. L. B. C. BRAGA, M. L. GOMES, M. W. D. SILVA, C. PAIVA, A. SALES, AND B. J. MANN, *Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar infections as detected by monoclonal antibody in an urban slum in fortaleza, Northeastern Brazil*, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 34 (2001), pp. 467–471. [79](#)
-

- [20] K. BRANITZKI-HEINEMANN, H. MÖLLERHERM, L. VÖLLGER, D. M. HUSEIN, N. DE BUHR, S. BLODKAMP, F. REUNER, G. BROGDEN, H. Y. NAIM, AND M. VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, *Formation of neutrophil extracellular traps under low oxygen level*, *Frontiers in immunology*, 7 (2016). [19](#)
- [21] V. BRINKMANN, U. REICHARD, C. GOOSMANN, B. FAULER, Y. UHLEMANN, D. S. WEISS, Y. WEINRAUCH, AND A. ZYCHLINSKY, *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*, *science*, 303 (2004), pp. 1532–1535. [3](#), [4](#), [17](#), [18](#), [19](#), [77](#)
- [22] S. BRUNS, O. KNIEMEYER, M. HASENBERG, V. AIMANIANDA, S. NIETZSCHE, A. THYWISSEN, A. JERON, J.-P. LATGÉ, A. A. BRAKHAGE, AND M. GUNZER, *Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA*, *PLoS pathogens*, 6 (2010), p. e1000873. [19](#)
- [23] G. BURCHARD AND R. BILKE, *Adherence of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* strains to neutrophils*, *Parasitology research*, 78 (1992), pp. 146–153. [2](#)
- [24] A. S. BYRD, X. M. O'BRIEN, C. M. JOHNSON, L. M. LAVIGNE, AND J. S. REICHNER, *An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans**, *The Journal of Immunology*, 190 (2013), pp. 4136–4148. [19](#), [80](#)
- [25] A. CABALLERO-SALCEDO, M. VIVEROS-ROGEL, B. SALVATIERRA, R. TAPIA-CONYER, J. SEPULVEDA-AMOR, G. GUTIERREZ, AND L. ORTIZ-ORTIZ, *Seroepidemiology of amebiasis in Mexico*, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 50 (1994), pp. 412–419. [7](#)
- [26] R. CAMPOS-RODRÍGUEZ, M. GUTIÉRREZ-MEZA, R. A. JARILLO-LUNA, M. E. DRAGO-SERRANO, E. ABARCA-ROJANO, J. VENTURA-JUÁREZ, L. M. CÁRDENAS-JARAMILLO, AND J. PACHECO-YEPEZ, *A review of the proposed role of neutrophils in rodent amebic liver abscess models*, *Parasite*, 23 (2016). [2](#)
- [27] K. CHADEE AND E. MEEROVITCH, *The pathogenesis of experimentally induced amebic liver abscess in the gerbil (*Meriones unguiculatus*)*, *The American journal of pathology*, 117 (1984), p. 71. [14](#)
- [28] K. CHADEE AND E. MEEROVITCH, **Entamoeba histolytica*: early progressive pathology in the cecum of the gerbil (*Meriones unguiculatus*)*, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 34 (1985), pp. 283–291. [2](#), [14](#), [15](#), [77](#)
- [29] K. CHADEE, F. MOREAU, AND E. MEEROVITCH, **Entamoeba histolytica*: chemotactant activity for gerbil neutrophils in vivo and in vitro*, *Experimental parasitology*, 64 (1987), pp. 12–23. [2](#), [13](#), [15](#), [77](#), [78](#)
- [30] I. M. DAMBUZA AND G. D. BROWN, *C-type lectins in immunity: recent developments*, *Current opinion in immunology*, 32 (2015), pp. 21–27. [80](#)

-
- [31] F. R. DELEO AND M. T. QUINN, *Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins.*, Journal of leukocyte biology, 60 (1996), pp. 677–691. [81](#)
- [32] V. DELGADO-RIZO, M. A. MARTÍNEZ-GUZMÁN, L. IÑIGUEZ-GUTIERREZ, A. GARCÍA-OROZCO, A. ALVARADO-NAVARRO, AND M. FAFUTIS-MORRIS, *Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview*, Frontiers in immunology, 8 (2017). [19](#)
- [33] M. DENIS AND K. CHADEE, *Human neutrophils activated by interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha kill Entamoeba histolytica trophozoites in vitro.*, Journal of leukocyte biology, 46 (1989), pp. 270–274. [13](#)
- [34] L. S. DIAMOND AND C. G. CLARK, *A redescription of entamoeba histolytica schaudinn, 1903 (emended walker, 1911) separating it from entamoeba dispar brumpt, 1925*, Journal of Eukaryotic Microbiology, 40 (1993), pp. 340–344. [7](#), [8](#), [79](#)
- [35] L. S. DIAMOND, D. R. HARLOW, AND C. C. CUNNICK, *A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba*, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 72 (1978), pp. 431–432. [21](#)
- [36] J. M. DODSON, C. G. CLARK, L. A. LOCKHART, B. M. LEO, J. W. SCHROEDER, AND B. J. MANN, *Comparison of adherence, cytotoxicity, and Gal/GalNAc lectin gene structure in entamoeba histolytica and entamoeba dispar*, Parasitology International, 46 (1997), pp. 225–235. [80](#)
- [37] S. S. DOLABELLA, J. SERRANO-LUNA, F. NAVARRO-GARCÍA, R. CERRITOS, C. XIMÉNEZ, J. M. GALVÁN-MOROYOQUI, E. F. SILVA, V. TSUTSUMI, AND M. SHIBAYAMA, *Amoebic liver abscess production by entamoeba dispar*, parasite, 13 (2012), p. 15. [8](#)
- [38] L. ECKMANN, S. L. REED, J. R. SMITH, AND M. F. KAGNOFF, *Entamoeba histolytica trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha.*, Journal of Clinical Investigation, 96 (1995), p. 1269. [13](#)
- [39] J. EL BENNA, L. FAUST, AND B. M. BABIOR, *The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases.*, Journal of Biological Chemistry, 269 (1994), pp. 23431–23436. [81](#)
- [40] C. M. ESPINOSA, G. G. CASTAÑÓN, AND A. MARTÍNEZ-PALOMO, *In vivo pathogenesis of entamoeba dispar.*, Archives of medical research, 28 (1997), p. 204. [2](#), [15](#)
-

- [41] M. ESPINOSA-CANTELLANO AND A. MARTÍNEZ-PALOMO, *Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease*, Clinical microbiology reviews, 13 (2000), pp. 318–331. [1](#), [5](#), [8](#)
- [42] M. FAURSCHOU AND N. BORREGAARD, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*, Microbes and Infection, 5 (2003), pp. 1317–1327. [17](#)
- [43] A. FONTAYNE, P. M.-C. DANG, M.-A. GOUGEROT-POCIDALO, AND J. EL BENNA, *Phosphorylation of p47 p hox sites by PKC α , β ii, δ , and ζ : Effect on binding to p22 phox and on NADPH oxidase activation*, Biochemistry, 41 (2002), pp. 7743–7750. [81](#)
- [44] T. A. FUCHS, U. ABED, C. GOOSMANN, R. HURWITZ, I. SCHULZE, V. WAHN, Y. WEINRAUCH, V. BRINKMANN, AND A. ZYCHLINSKY, *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*, The Journal of cell biology, 176 (2007), pp. 231–241. [19](#)
- [45] C. GABRIEL, W. R. MCMASTER, D. GIRARD, AND A. DESCOTEAUX, *Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps*, The Journal of Immunology, 185 (2010), pp. 4319–4327. [19](#), [80](#)
- [46] J. M. GALVÁN-MOROYOQUI, M. DEL CARMEN DOMÍNGUEZ-ROBLES, AND I. MEZA, *Pathogenic bacteria prime the induction of Toll-like receptor signalling in human colonic cells by the Gal/GalNAc lectin carbohydrate recognition domain of entamoebahistolytica*, International journal for parasitology, 41 (2011), pp. 1101–1112. [13](#)
- [47] E. GARCÍA-GARCÍA, E. URIBE-QUEROL, AND C. ROSALES, *A simple and efficient method to detect nuclear factor activation in human neutrophils by flow cytometry*, Journal of visualized experiments: JoVE, (2013). [21](#)
- [48] G. GARCIA-RIVERA, M. RODRIGUEZ, R. OCADIZ, M. MARTINEZ-LOPEZ, R. ARROYO, A. GONZALEZ-ROBLES, AND E. OROZCO, *Entamoeba histolytica: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein*, Molecular microbiology, 33 (1999), pp. 556–568. [11](#)
- [49] E. GARCÍA-ZEPEDA, A. ROJAS-LÓPEZ, M. ESQUIVEL-VELÁZQUEZ, AND P. OSTOA-SALOMA, *Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis*, Parasite immunology, 29 (2007), pp. 679–684. [10](#), [13](#)
- [50] J. GÓMEZ, J. A. CORTÉS, S. I. CUERVO, AND M. C. LÓPEZ, *Amebiasis intestinal*, Infectio, 11 (2007), pp. 36–45. [10](#)
- [51] R. D. GRAY, C. D. LUCAS, A. MACKELLAR, F. LI, K. HIERSEMENZEL, C. HASLETT, D. J. DAVIDSON, AND A. G. ROSSI, *Activation of conventional*

-
- protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps*, *Journal of Inflammation*, 10 (2013), p. 12. [80](#)
- [52] J. L. GRIFFIN, *Human amebic dysentery*, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 21 (1972), pp. 895–906. [x](#), [2](#), [16](#), [77](#), [78](#)
- [53] N. GRINBERG, S. ELAZAR, I. ROSENSHINE, AND N. Y. SHPIGEL, *β -hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic escherichia coli*, *Infection and immunity*, 76 (2008), pp. 2802–2807. [4](#)
- [54] R. L. GUERRANT, J. BRUSH, J. I. RAVDIN, J. A. SULLIVAN, AND G. L. MANDELL, *Interaction between entamoeba histolytica and human polymorphonuclear neutrophils*, *Journal of infectious diseases*, 143 (1981), pp. 83–93. [2](#), [77](#), [79](#)
- [55] A. B. GUIMARÃES-COSTA, M. T. NASCIMENTO, G. S. FROMENT, R. P. SOARES, F. N. MORGADO, F. CONCEIÇÃO-SILVA, AND E. M. SARAIVA, *Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (2009), pp. 6748–6753. [19](#)
- [56] A. HAKKIM, T. A. FUCHS, N. E. MARTINEZ, S. HESS, H. PRINZ, A. ZYCHLINSKY, AND H. WALDMANN, *Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation*, *Nature chemical biology*, 7 (2011), pp. 75–77. [19](#), [59](#), [60](#), [80](#)
- [57] T. W. HALVERSON, M. WILTON, K. K. POON, B. PETRI, AND S. LEWENZA, *DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps*, *PLoS pathogens*, 11 (2015), p. e1004593. [18](#)
- [58] R. HAQUE, I. M. ALI, R. B. SACK, B. M. FARR, G. RAMAKRISHNAN, AND W. A. PETRI JR, *Amebiasis and mucosal IgA antibody against the entamoeba histolytica adherence lectin in Bangladeshi children*, *The Journal of infectious diseases*, 183 (2001), pp. 1787–1793. [14](#)
- [59] R. HAQUE, P. DUGGAL, I. M. ALI, M. B. HOSSAIN, D. MONDAL, R. B. SACK, B. M. FARR, T. H. BEATY, AND W. A. PETRI JR, *Innate and acquired resistance to amebiasis in Bangladeshi children*, *The Journal of infectious diseases*, 186 (2002), pp. 547–552. [14](#)
- [60] R. HAQUE, C. D. HUSTON, M. HUGHES, E. HOUP, AND W. A. PETRI JR, *Amebiasis*, *New England journal of medicine*, 348 (2003), pp. 1565–1573. [1](#), [5](#), [6](#)
- [61] R. D. HEREDIA, J. A. FONSECA, AND M. C. LÓPEZ, *Entamoeba moshkovskii perspectives of a new agent to be considered in the diagnosis of amebiasis*, *Acta tropica*, 123 (2012), pp. 139–145. [9](#)
- [62] A. HOFFMANN, G. NATOLI, AND G. GHOSH, *Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module*, *Oncogene*, 25 (2006), pp. 6706–6716. [64](#)
-

- [63] A. HOPKE, N. NICKE, E. E. HIDU, G. DEGANI, L. POPOLO, AND R. T. WHEELER, *Neutrophil attack triggers extracellular trap-dependent candida cell wall remodeling and altered immune recognition*, PLoS pathogens, 12 (2016), p. e1005644. [80](#)
- [64] T. JACOBS, I. BRUCHHAUS, T. DANDEKAR, E. TANNICH, AND M. LEIPPE, *Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of entamoeba histolytica*, Molecular microbiology, 27 (1998), pp. 269–276. [8](#), [11](#)
- [65] R. A. JARILLO-LUNA, R. CAMPOS-RODRÍGUEZ, AND V. TSUTSUMI, *Entamoeba histolytica: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance*, Experimental parasitology, 101 (2002), pp. 40–56. [16](#)
- [66] R. JARUMILINTA AND F. KRADOLFER, *The toxic effect of entamoeba histolytica on leucocytes*, Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 58 (1964), pp. 375–381. [1](#), [2](#), [77](#), [79](#)
- [67] S. J. KAMMANADIMINTI, B. J. MANN, L. DUTIL, AND K. CHADEE, *Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of Entamoeba histolytica*, The FASEB journal, 18 (2004), pp. 155–157. [14](#)
- [68] M. J. KAPLAN AND M. RADIC, *Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity*, The Journal of Immunology, 189 (2012), pp. 2689–2695. [79](#)
- [69] M. KARIN, *How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex.*, Oncogene, 18 (1999). [64](#)
- [70] W. E. KEENE, M. G. PETITT, S. ALLEN, AND J. H. MCKERROW, *The major neutral proteinase of entamoeba histolytica.*, Journal of Experimental Medicine, 163 (1986), pp. 536–549. [10](#)
- [71] R. S. KESHARI, A. VERMA, M. K. BARTH WAL, AND M. DIKSHIT, *Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils*, Journal of cellular biochemistry, 114 (2013), pp. 532–540. [3](#)
- [72] M. J. LAPPONI, A. CARESTIA, V. I. LANDONI, L. RIVADENEYRA, J. ETULAIN, S. NEGROTTI, R. G. POZNER, AND M. SCHATTNER, *Regulation of neutrophil extracellular trap formation by anti-inflammatory drugs*, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 345 (2013), pp. 430–437. [56](#), [64](#), [81](#)
- [73] R. C. LAUGHLIN, G. C. MCGUGAN, R. R. POWELL, B. H. WELTER, AND L. A. TEMESVARI, *Involvement of raft-like plasma membrane domains of entamoeba histolytica in pinocytosis and adhesion*, Infection and immunity, 72 (2004), pp. 5349–5357. [9](#)

-
- [74] R. C. LAUGHLIN AND L. A. TEMESVARI, *Cellular and molecular mechanisms that underlie entamoeba histolytica pathogenesis: prospects for intervention*, Expert Reviews in Molecular Medicine, 7 (2005), pp. 1–19. [x](#), [9](#), [10](#), [11](#), [12](#)
- [75] D.-Y. LEE, C.-M. HUANG, T. NAKATSUJI, D. THIBOUTOT, S.-A. KANG, M. MONESTIER, AND R. L. GALLO, *Histone H4 is a major component of the antimicrobial action of human sebocytes*, Journal of investigative dermatology, 129 (2009), pp. 2489–2496. [13](#), [18](#)
- [76] J. LEE, M. H. RHEE, E. KIM, AND J. Y. CHO, *BAY 11-7082 is a broad-spectrum inhibitor with anti-inflammatory activity against multiple targets*, Mediators of inflammation, 2012 (2012). [64](#)
- [77] W. L. LEE, R. E. HARRISON, AND S. GRINSTEIN, *Phagocytosis by neutrophils*, Microbes and infection, 5 (2003), pp. 1299–1306. [18](#)
- [78] M. LEIPPE, *Amoebapores*, Parasitology Today, 13 (1997), pp. 178–183. [10](#)
- [79] J.-Y. LIN, R. SEGUIN, K. KELLER, AND K. CHADEE, *Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against Entamoeba histolytica by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene.*, Infection and immunity, 62 (1994), pp. 1534–1541. [14](#)
- [80] V. LODEWIJK, M. LEITGES, G. ALTSCHULER, N. MISTRY, A. MC-DERMOTT, R. JURGEN, AND A. W. SEGAL, *Protein kinase C- β contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils*, Biochemical Journal, 347 (2000), pp. 285–289. [81](#)
- [81] V. MARCOS, Z. ZHOU, A. Ö. YILDIRIM, A. BOHLA, A. HECTOR, L. VITKOV, E.-M. WIEDENBAUER, W. D. KRAUTGARTNER, W. STOIBER, B. H. BELOHRADSKY, ET AL., *CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation*, Nature medicine, 16 (2010), pp. 1018–1023. [19](#)
- [82] A. MAUER, J. ATHENS, H. ASHENBRUCKER, G. CARTWRIGHT, AND M. WINTROBE, *Leukokinetic studies. II. a method for labeling granulocytes in vitro with radioactive diisopropylfluorophosphate (DFP32)*, Journal of Clinical Investigation, 39 (1960), p. 1481. [17](#)
- [83] J. J. MCCOY, B. J. MANN, AND W. A. PETRI JR, *Adherence and cytotoxicity of entamoeba histolytica or how lectins let parasites stick around.*, Infection and immunity, 62 (1994), p. 3045. [10](#), [80](#)
- [84] A. MÓCSAI, M. ZHOU, F. MENG, V. L. TYBULEWICZ, AND C. A. LOWELL, *Syk is required for integrin signaling in neutrophils*, Immunity, 16 (2002), pp. 547–558. [68](#)
-

BIBLIOGRAFÍA

- [85] S. N. MOONAH, N. M. JIANG, AND W. A. PETRI JR, *Host immune response to intestinal amebiasis*, PLoS pathogens, 9 (2013), p. e1003489. [14](#)
- [86] Y. MORI, M. YAMAGUCHI, Y. TERAOKA, S. HAMADA, T. OOSHIMA, AND S. KAWABATA, *α -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* induces formation of neutrophil extracellular traps*, Journal of Biological Chemistry, 287 (2012), pp. 10472–10481. [19](#), [80](#)
- [87] K. NAKADA-TSUKUI AND T. NOZAKI, *Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica**, Frontiers in immunology, 7 (2016). [14](#)
- [88] A. OLIVOS-GARCIA, M. NEQUIZ-AVENDAÑO, E. TELLO, R. MARTÍNEZ, A. GONZÁLEZ-CANTO, R. LÓPEZ-VANCELL, M. G. DE LEÓN, I. MONTFORT, AND R. PÉREZ-TAMAYO, *Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters*, Experimental and molecular pathology, 77 (2004), pp. 66–71. [15](#)
- [89] J. PACHECO-YÉPEZ, *Daño a los hepatocitos por lectina inhibible por D-Galactosa/N-Acetil D-Galactosamina de *Entamoeba Histolytica*.*, Revista del Centro de Investigación de la Universidad la Salle, 7 (2006), pp. 13–32. [9](#), [80](#)
- [90] V. PAPAYANNOPOULOS, K. D. METZLER, A. HAKKIM, AND A. ZYCHLINSKY, *Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps*, The Journal of cell biology, 191 (2010), pp. 677–691. [19](#)
- [91] W. PETRI, T. JACKSON, V. GATHIRAM, K. KRESS, L. SAFFER, T. SNODGRASS, M. CHAPMAN, Z. KEREN, AND D. MIRELMAN, *Pathogenic and non-pathogenic strains of *entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin.*, Infection and immunity, 58 (1990), pp. 1802–1806. [80](#)
- [92] W. A. PETRI JR, C. G. CLARK, AND L. S. DIAMOND, *Host-parasite relationships in amebiasis: conference report*, Journal of Infectious Diseases, 169 (1994), pp. 483–484. [1](#)
- [93] E. PIETERSE, N. ROTHER, C. YANGINLAR, L. B. HILBRANDS, AND J. VAN DER VLAG, *Neutrophils discriminate between lipopolysaccharides of different bacterial sources and selectively release neutrophil extracellular traps*, Frontiers in immunology, 7 (2016). [79](#)
- [94] F. H. PILSCZEK, D. SALINA, K. K. POON, C. FAHEY, B. G. YIPP, C. D. SIBLEY, S. M. ROBBINS, F. H. GREEN, M. G. SURETTE, M. SUGAI, ET AL., *A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *staphylococcus aureus**, The Journal of Immunology, 185 (2010), pp. 7413–7425. [3](#), [19](#), [80](#)
- [95] B. S. PRITT AND C. G. CLARK, *Amebiasis*, in Mayo Clinic Proceedings, vol. 83, Elsevier, 2008, pp. 1154–1160. [8](#)

-
- [96] X. QUE, S.-H. KIM, M. SAJID, L. ECKMANN, C. A. DINARELLO, J. H. MCKERROW, AND S. L. REED, *A surface amebic cysteine proteinase inactivates interleukin-18*, *Infection and immunity*, 71 (2003), pp. 1274–1280. [8](#), [11](#)
- [97] V. RAMOS-KICHIK, R. MONDRAGÓN-FLORES, M. MONDRAGÓN-CASTELÁN, S. GONZALEZ-POZOS, S. MUÑIZ-HERNANDEZ, O. ROJAS-ESPINOSA, R. CHACÓN-SALINAS, S. ESTRADA-PARRA, AND I. ESTRADA-GARCÍA, *Neutrophil extracellular traps are induced by Mycobacterium tuberculosis*, *Tuberculosis*, 89 (2009), pp. 29–37. [19](#)
- [98] J. I. RAVDIN, B. Y. CROFT, AND R. L. GUERRANT, *Cytopathogenic mechanisms of entamoeba histolytica.*, *Journal of Experimental Medicine*, 152 (1980), pp. 377–390. [79](#)
- [99] J. I. RAVDIN AND R. L. GUERRANT, *Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of entamoeba histolytica: study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes*, *Journal of Clinical Investigation*, 68 (1981), p. 1305. [2](#), [10](#), [79](#)
- [100] J. I. RAVDIN, C. F. MURPHY, R. A. SALATA, R. L. GUERRANT, AND E. L. HEWLETT, *N-Acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of entamoeba histolytica. I. partial purification and relation to amoebic virulence in vitro*, *Journal of Infectious Diseases*, 151 (1985), pp. 804–815. [10](#)
- [101] J. I. RAVDIN, P. STANLEY, C. F. MURPHY, AND W. PETRI, *Characterization of cell surface carbohydrate receptors for entamoeba histolytica adherence lectin.*, *Infection and immunity*, 57 (1989), pp. 2179–2186. [1](#), [2](#), [10](#), [80](#)
- [102] Q. REMIJSSEN, T. KUIJPERS, E. WIRAWAN, S. LIPPENS, P. VANDENABEELE, AND T. V. BERGHE, *Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality*, *Cell Death & Differentiation*, 18 (2011), pp. 581–588. [18](#)
- [103] L. RIVERO-NAVA, A.-G. JESÚS, M. SHIBAYAMA-SALAS, R. HERNÁNDEZ-PANDO, V. TSUTSUMI, AND J. CALDERÓN, *Entamoeba histolytica: acute granulomatous intestinal lesions in normal and neutrophil-depleted mice*, *Experimental parasitology*, 101 (2002), pp. 183–192. [2](#), [16](#)
- [104] M. ROMERO-DÍAZ, C. GÓMEZ, I. LÓPEZ-REYES, M. B. MARTÍNEZ, E. OROZCO, AND M. A. RODRÍGUEZ, *Structural and functional analysis of the Entamoeba histolytica EhrabB gene promoter*, *BMC molecular biology*, 8 (2007), p. 82. [11](#)
- [105] R. A. SALATA, P. AHMED, AND J. I. RAVDIN, *Chemoattractant activity of entamoeba histolytica for human polymorphonuclear neutrophils*, *The Journal of parasitology*, (1989), pp. 644–646. [78](#)
-

BIBLIOGRAFÍA

- [106] R. A. SALATA AND J. I. RAVDIN, *The interaction of human neutrophils and entamoeba histolytica increases cytopathogenicity for liver cell monolayers*, Journal of Infectious Diseases, 154 (1986), pp. 19–26. [2](#)
- [107] J. SERRANO-LUNA, C. PIÑA-VÁZQUEZ, M. REYES-LÓPEZ, G. ORTIZ-ESTRADA, AND M. DE LA GARZA, *Proteases from entamoeba spp. and pathogenic free-living amoebae as virulence factors*, Journal of tropical medicine, 2013 (2013). [8](#), [11](#), [14](#)
- [108] K. B. SEYDEL, E. LI, P. E. SWANSON, AND S. L. STANLEY, *Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis.*, Infection and immunity, 65 (1997), pp. 1631–1639. [13](#)
- [109] K. B. SEYDEL, T. ZHANG, AND S. STANLEY, *Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscesses in severe combined immunodeficient mice.*, Infection and immunity, 65 (1997), pp. 3951–3953. [3](#), [78](#)
- [110] S. D. SHARMA AND W. F. PIESSENS, *Tumor cell killing by macrophages activated in vitro with lymphocyte mediators: III. inhibition by cytochalasins, colchicine, and vinblastine*, Cellular immunology, 38 (1978), pp. 276–285. [79](#)
- [111] S. SIM, K. A. KIM, T.-S. YONG, S.-J. PARK, K.-I. IM, AND M. H. SHIN, *Ultrastructural observation of human neutrophils during apoptotic cell death triggered by entamoeba histolytica*, The Korean journal of parasitology, 42 (2004), p. 205. [2](#), [77](#)
- [112] S. SIM, S.-J. PARK, T.-S. YONG, K.-I. IM, AND M. H. SHIN, *Involvement of β 2-integrin in ROS-mediated neutrophil apoptosis induced by Entamoeba histolytica*, Microbes and infection, 9 (2007), pp. 1368–1375. [68](#)
- [113] S. SIM, T.-S. YONG, S.-J. PARK, K.-I. IM, Y. KONG, J.-S. RYU, D.-Y. MIN, AND M. H. SHIN, *NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of ERK1/2 is required for apoptosis of human neutrophils induced by entamoeba histolytica*, The Journal of Immunology, 174 (2005), pp. 4279–4288. [80](#)
- [114] S. L. STANLEY, *Amoebiasis*, The Lancet, 361 (2003), pp. 1025–1034. [7](#)
- [115] W. STOIBER, A. OBERMAYER, P. STEINBACHER, AND W.-D. KRAUTGARTNER, *The role of reactive oxygen species (ROS) in the formation of extracellular traps (ETs) in humans*, Biomolecules, 5 (2015), pp. 702–723. [3](#)
- [116] S. W. TANENBAUM ET AL., *Cytochalasins. biochemical and cell biological aspects.*, Cytochalasins. Biochemical and cell biological aspects., (1978). [79](#)
- [117] H. TRABELSI, F. DENDANA, A. SELLAMI, H. SELLAMI, F. CHEIKHROUHO, S. NEJI, F. MAKNI, AND A. AYADI, *Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review*, Pathologie Biologie, 60 (2012), pp. 399–405. [9](#)

-
- [118] J. TREJOS-SUÁREZ AND J. C. CASTAÑO-OSORIO, *Factores de virulencia del patógeno intestinal entamoeba histolytica*, Infectio, 13 (2009), pp. 100–110. [2](#), [5](#)
- [119] V. TSUTSUMI AND A. MARTINEZ-PALOMO, *Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. an ultrastructural study.*, The American journal of pathology, 130 (1988), p. 112. [2](#), [15](#)
- [120] V. TSUTSUMI, R. MENA-LOPEZ, F. ANAYA-VELAZQUEZ, AND A. MARTINEZ-PALOMO, *Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation.*, The American journal of pathology, 117 (1984), p. 81. [x](#), [14](#), [15](#), [77](#)
- [121] D. M. UNDERHILL AND A. OZINSKY, *Phagocytosis of microbes: complexity in action*, Annual review of immunology, 20 (2002), pp. 825–852. [18](#)
- [122] C. F. URBAN, D. ERMERT, M. SCHMID, U. ABU-ABED, C. GOOSMANN, W. NACKEN, V. BRINKMANN, P. R. JUNGBLUT, AND A. ZYCHLINSKY, *Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against candida albicans*, PLoS pathogens, 5 (2009), p. e1000639. [3](#)
- [123] C. F. URBAN, U. REICHARD, V. BRINKMANN, AND A. ZYCHLINSKY, *Neutrophil extracellular traps capture and kill candida albicans yeast and hyphal forms*, Cellular microbiology, 8 (2006), pp. 668–676. [4](#), [19](#)
- [124] C. VELAZQUEZ, M. SHIBAYAMA-SALAS, J. AGUIRRE-GARCIA, V. TSUTSUMI, AND J. CALDERON, *Role of neutrophils in innate resistance to entamoeba histolytica liver infection in mice*, Parasite immunology, 20 (1998), pp. 255–262. [3](#)
- [125] J. VENTURA-JUAREZ, M. CAMPOS-ESPARZA, J. PACHECO-YEPEZ, J. LÓPEZ-BLANCO, A. ADABACHE-ORTÍZ, M. SILVA-BRIANO, AND R. CAMPOS-RODRÍGUEZ, *Entamoeba histolytica induces human neutrophils to form NETs*, Parasite immunology, 38 (2016), pp. 503–509. [4](#), [19](#), [77](#)
- [126] R. M. R. VIEIRA, *Amebíase e outras parasitoses intestinais no município de são joão do piauí, PI - brasil*, 2004. [10](#)
- [127] Y. T. WACHTFOGEL, U. KUCICH, J. GREENPLATE, P. GLUSZKO, W. ABRAMS, G. WEINBAUM, R. K. WENGER, B. RUCINSKI, S. NIEWIAROWSKI, AND L. J. EDMUNDS, *Human neutrophil degranulation during extracorporeal circulation*, Blood, 69 (1987), pp. 324–330. [36](#)
- [128] Y. WANG, M. LI, S. STADLER, S. CORRELL, P. LI, D. WANG, R. HAYAMA, L. LEONELLI, H. HAN, S. A. GRIGORYEV, ET AL., *Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation*, J Cell Biol, 184 (2009), pp. 205–213. [19](#)
- [129] WHO, *Amoebiasis*, Wkly Epidemiol Rec, 72 (1997), pp. 97–100. [1](#)

BIBLIOGRAFÍA

- [130] —, *Expert committee on malaria: twentieth report*, no. 892, World Health Organization, 2000. [6](#)
- [131] U. WILLHOEFT, L. HAMANN, AND E. TANNICH, *A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in entamoeba histolytica is present and positionally conserved but highly degenerated in entamoeba dispar*, *Infection and immunity*, 67 (1999), pp. 5925–5929. [11](#)
- [132] C. XIMÉNEZ, R. CERRITOS, L. ROJAS, S. DOLABELLA, P. MORÁN, M. SHIBAYAMA, E. GONZÁLEZ, A. VALADEZ, E. HERNÁNDEZ, O. VALENZUELA, ET AL., *Human amebiasis: breaking the paradigm?*, *International journal of environmental research and public health*, 7 (2010), pp. 1105–1120. [1](#)
- [133] C. XIMÉNEZ, P. MORÁN, L. ROJAS, A. VALADEZ, AND A. GÓMEZ, *Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art*, *Infection, Genetics and Evolution*, 9 (2009), pp. 1023–1032. [7](#)
- [134] C. XIMÉNEZ, P. MORÁN, L. ROJAS, A. VALADEZ, A. GÓMEZ, M. RAMIRO, R. CERRITOS, E. GONZÁLEZ, E. HERNÁNDEZ, AND P. OSWALDO, *Novelties on amoebiasis: a neglected tropical disease*, *Journal of global infectious diseases*, 3 (2011), p. 166. [6](#), [7](#)
- [135] B. G. YIPP AND P. KUBES, *NETosis: how vital is it?*, *Blood*, 122 (2013), pp. 2784–2794. [18](#)
- [136] A. N. ZELENSKY AND J. E. GREARY, *The c-type lectin-like domain superfamily*, *The FEBS journal*, 272 (2005), pp. 6179–6217. [80](#)