



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA VIABILIDAD Y DE LA PRESENCIA DEL AMIBOPORO EN
LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LÍNEAS CELULARES COINCUBADAS
CON *ENTAMOEBA HISTOLYTICA***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

YURUBI BARRÓN OSCOY



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: JOSÉ CORDERO HERNÁNDEZ
VOCAL: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA
SECRETARIO: AUGUSTO JOSÉ GONZÁLEZ CANTO
1er. SUPLENTE: HECTOR ENRIQUE ESPINOSA ARNIEGA
2° SUPLENTE: ALBERTO GARCIA LOZANO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN MEDICINA EXPERIMENTAL, FACULTAD DE
MEDICINA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

AUGUSTO JOSÉ GONZÁLEZ CANTO

SUSTENTANTE:

YURUBI BARRÓN OSCOY YURUBI

A mi madre:

María Susana Osoy López

Gracias por siempre estar a mi lado apoyándome y dándome la fuerza para salir adelante, por tener las palabras precisas en esos momentos difíciles.

A mis hermanos:

Marley Berenice Minero Osoy

Josué Eduardo Barrón Osoy

Les agradezco por siempre estar llenando mi vida de felicidad y de muchas ocurrencias.

A mis amigos:

Gracias por compartir conmigo este recorrido y siempre apoyarme.

A mi compañero de vida:

Ismael Adrián Noguerrón Mendoza

Te agradezco por siempre apoyarme y animarme día con día para poder concluir con este trabajo.

Agradezco al Dr. Ruy Pérez Tamayo y Dr. Ruy Pérez Montfort por permitirme crecer en conocimientos para mi desarrollo profesional.

Agradezco a la Dra. Norma Lilia Salaiza Suazo por la asesoría técnica y académica para la realización de la tesis.

Agradezco a la Q.F.B Ma. Dolores Jarillo Quijada, al Dr. Ángel Hernández Manjarrez por el apoyo con la donación de diferentes líneas celulares empleadas en el trabajo y al Biól. Mario Nequiz Avendaño por apoyarme con las células amibianas.

Agradezco al I.Q Efrén Pérez Vázquez por su apoyo en el tratamiento estadístico de la tesis.

Agradezco al Dr. Jaime Zamora Chimal por ser una guía para poder avanzar en la tesis, así como el apoyo con la donación de líneas celulares empleadas en el trabajo.

Agradezco a la Dra. Alma Reyna Escalona Montaña por su apoyo con la donación de líneas celulares y por su tiempo y dedicación para la revisión del presente trabajo.

Agradezco a la Ing. Angélica Leticia Serrano Ahumada por su apoyo con la impresión, copias requeridas para la revisión y entrega del presente trabajo.

También a cada uno de los miembros del jurado por el tiempo, la dedicación y la atención prestada para la revisión del presente trabajo.

Gracias profesores:

- José Cordero Hernández
- Octavio Castro Escamilla
- Augusto José González Canto
- Héctor Enrique Espinosa Arniega
- Alberto García Lozano

ÍNDICE

	Pág.
I.-Abreviaturas.....	9
II.-Introducción.....	11
1.-Amibiasis.....	11
2.-Morfología de <i>Entamoeba histolytica</i>	12
2.1.-Quiste.....	12
2.2.-Trofozoíto.....	12
3.-Ciclo de vida.....	13
4.-Epidemiología de la amibiasis en México y el mundo.....	15
5.-Patogénesis de <i>Entamoeba histolytica</i>	18
6.-Mecanismos de muerte celular que induce <i>Entamoeba histolytica</i>	18
6.1.-Beso de la muerte.....	19
6.2.-Fagocitosis.....	19
6.3.-Moléculas que participan en la inducción de muerte celular.....	20
6.3.1.-Lectinas de <i>Entamoeba histolytica</i>	21
6.3.2.-Amiboporos.....	22
6.3.4.-Proteasas de cisteína	23
7.-Participación de la microbiota bacteriana.....	25

8.-Amibiasis extraintestinal y su relación con: las células HepG2, la línea celular RAW, los macrófagos peritoneales, los macrófagos diferenciados de médula ósea, las células HeLa, las células HEp-2, las células A549 y las células Vero.....	26
8.1.-Amibiasis hepática.....	26
8.2.-Amibiasis y macrófagos (línea RAW, macrófagos peritoneales, macrófagos diferenciados de médula ósea.....	28
8.3.-Amibiasis epiteal (HeLa y HEp-2).....	29
8.4.-Amibiasis pulmonar.....	30
8.5.-Amibiasis renal.....	31
9.-Células y líneas celulares de interés.....	31
9.1.-HepG2.....	31
9.2.-RAW.....	32
9.3.-Macrófagos peritoneales y macrófagos diferenciados de médula ósea.....	32
9.4.-HeLa.....	35
9.5.-HEp-2.....	36
9.6.-A549.....	36
9.7.-Vero.....	37
10.-Inmunocitoquímica.....	38
III.-Planteamiento del problema.....	41

IV.-Hipótesis.....	41
V.-Objetivos.....	41
1.-Objetivos general.....	41
2.-Objetivos particulares.....	41
VI.-Metodología.....	42
1.-Cultivo de líneas celulares.....	42
2.-Obtención de amibas.....	43
3.-Ensayos para el monitoreo de la viabilidad de las células.....	44
4.-Análisis estadístico.....	44
5.-Inmunocitoquímica.....	44
VII.-Diagrama de flujo.....	46
VIII.-Resultados.....	47
1.-Análisis de la viabilidad de HepG2 incubada con trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> y presencia de amiboporo.....	47
2.-Análisis de la viabilidad de macrófagos incubados con trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> y presencia de amiboporo.....	48
3.-Análisis de la viabilidad de HeLa y HEp-2 (HeLa no axénica) incubadas con trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> y presencia de amiboporo.....	50
4.-Análisis de la viabilidad de A549 incubada con trofozoítos de	

<i>Entamoeba histolytica</i> y presencia de amiboporo.....	52
5.-Análisis de la viabilidad de Vero incubada con trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> y presencia de amiboporo.....	53
6.-Resumen de los resultados	54
IX.-Discusión.....	54
X.-Conclusiones.....	58
XI.-Referencias.....	59

I.- ABREVIATURAS

ATTC: Por sus siglas en inglés The American Type Culture Collection

Balb/c: Siglas empleadas para indicar que la cepa es proveniente de ratón albino

°C: Grado Celsius

C3, C4, C8 y C9: Fracciones 3, 4, 8 y 9 del complemento

C3a y C5a: Fracciones del complemento 3a y 5a

Ca²⁺: Ion Calcio

Células/L: Número de células por litro

CINVESTAV: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

CO₂: Dióxido de Carbono

CP5: Cistein peptidasa 5

CP: Cistein peptidasa

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

DNA: Ácido desoxirribonucleico

Eh: *Entamoeba histolytica*

HeLa: Nombre que deriva de las primeras dos letras del donador de las células, Henrietta Lacks

IFN- γ : Interferón gamma

IgA: Inmunoglobulina A

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

Igs: Inmunoglobulinas

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-1, 6, 8 y 10: Interleucinas 1, 6, 8 y 10

MAPK: Protein cinasa activada por mitógeno

MUC2: Glicoproteína secretora mucina-2

NADPH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
O-GlcNAc: O-GlucosilNAcetilación
NO: Óxido nítrico
PBS: Solución amortiguadora de fosfatos
PBS-A: Solución amortiguadora de fosfatos amibiana
pH: Potencial de hidrógeno
RPM: Revoluciones por minuto
RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute
SFB: Suero Fetal Bovino
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
TY1-S-33: Medio de cultivo amibiano
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
 μm : Micrometro
 μL : Microlitro

II.- INTRODUCCIÓN

1.- Amibiasis

La amibiasis es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo sarcodino *Entamoeba histolytica* (*Eh*). Es la única reconocida como patógena, mientras que *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba hartmanni* entre otras se consideran como no patógenas (Gomila et al., 2011). Las infecciones por *Eh* tienen alta incidencia en países pobres provocando cerca de cien mil muertes por año en el mundo, motivo por el cual hoy en día se continúa realizando estudios para comprender mejor su patología. La infección suele contraerse cuando se ingiere agua o alimentos contaminados con quistes del parásito, por contacto sexual, por contacto con objetos contaminados, solo por mencionar algunos. *Eh* invade principalmente el intestino, lugar donde se desinque y se presenta en su forma invasiva que es como trofozoíto. Durante el estadio del trofozoíto en el intestino, puede provocar colitis amibiana (lesiones ulceradas en las capas de las mucosas y submucosas) y en ocasiones, puede manifestarse de forma extraintestinal provocando lo que se conoce como absceso hepático, el parásito puede perforar la mucosa intestinal (Quach et al., 2014; Singh et al., 2019) e invadir diversos tipos de tejidos del cuerpo dentro de los que ya se han reportado casos de: riñón, pulmón, cerebro, zona anal entre otros. (Pérez et al., 2006).

Los únicos seres vivos que son susceptibles de infectarse por este parásito son el ser humano, ciertos primates en cautiverio, el hámster y el jerbo (Pérez et al., 2006). La amibiasis provocada por este parásito se caracteriza por inflamación aguda y necrosis en el intestino grueso y otros órganos. Se han reportado diferentes mecanismos de muerte celular dentro de los cuales encontramos: el beso de la muerte, la fagocitosis (Shibayama & Tsutsumi ,2013) y moléculas que participan en la inducción de muerte como: amiboporos, fosfolipasas, colagenasas, adhesinas y proteasas de cisteína (Pérez et al., 2006), considerando también la participación de microbiota bacteriana, que si bien no es un mecanismo de muerte es un factor que contribuye de forma importante en su patogenicidad.

2.- Morfología de *Entamoeba histolytica*

Durante el ciclo de vida de *Eh* se encuentra en dos formas: quiste el cual es resistente a diferentes factores ambientales, no cuenta con movilidad y el trofozoíto que es la forma invasiva y móvil. (Pérez et al., 2006; Vázquez et al., 2012).

2.1.- Quiste

Es la forma infecciosa de *Eh* y mide de 10 a 15 micras de diámetro, tiene forma esférica u oval, durante su ciclo de vida se divide por mitosis sucesivas hasta tener un total de cuatro núcleos. Cuenta con una pared resistente de quitina y su citoplasma tiene barras cromatoidales de bordes curvos y una masa de glucógeno cuando es inmaduro. Cuando los quistes maduros son ingeridos por un hospedero, estos se desenquistan en el intestino delgado dando origen a los trofozoítos (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2015).

Los quistes sobreviven a condiciones húmedas durante el período de una semana con una temperatura de 28 °C a 34 °C y hasta un mes si la temperatura es menor. Son resistentes al ácido clorhídrico y no mueren con el tratamiento de cloración, para generar su muerte se recomiendan procesos como ebulliciones, desecación, exposición a luz solar, yodo y calor (Romero et al., 2008; Gomila et al., 2011).

2.2.- Trofozoíto

Es la forma invasiva de *Eh*, tiene diferentes dimensiones según su localización por lo general van de entre 10 a 60 micras. Los trofozoítos son anaerobios facultativos con forma irregular amebode alargada (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2015) y se caracteriza por producir pseudópodos, filopodios cortos y largos, grandes uropódos retráctiles en la parte posterior, pseudópodos, ampollas y otras estructuras, lo que le permite desplazarse (Sierra et al., 2018). En el citoplasma existe un citoesqueleto formado por microfilamentos de actina y miosina, el aparato de Golgi es ausente es reemplazado por un sistema vacuolar, formado por una red de canales y vacuolas digestivas en cuyo interior se encuentra la fosfatasa ácida y las nucleotidasas. También cuenta con ribosomas y varias inclusiones de distinta naturaleza, tiene un

núcleo con endosoma en posición central y cromatina periférica regularmente distribuida (Romero et al., 2008).

Los trofozoítos de lesiones intestinales tiene un tamaño de 20 a 40 micras, sobrevive poco tiempo fuera del organismo, mueren muy rápido con ácido clorhídrico, enzimas digestivas y diferentes cambios ambientales fisicoquímicos (Romero et al., 2008).

3.- Ciclo de vida

El ciclo de infección por *Eh* es generado por vía oral-fecal y comienza con la ingestión de quistes maduros. La transmisión ocurre por medio de diversos factores como son: contacto directo, fómites, transmisores biológicos en el arrastre mecánico de los quistes (Saavedra & Olivos, 2017).

Eh es un parásito microaerófilo el cual obtiene su energía mediante la conversión de glucosa a piruvato. A pesar de carecer de mitocondrias este cuenta con el ciclo de los ácidos tricarbónicos y tiene una cadena respiratoria lo que permite que el trofozoíto sea capaz de sobrevivir en una atmósfera con baja presencia de oxígeno (Romero et al., 2008).

En forma de quiste que es como se encuentra en el medio ambiente, es capaz de sobrevivir semanas y hasta meses, siendo diseminado por agua, tierra, aire, alimentos, bebidas, objetos, etc, hasta que el quiste es ingerido por el individuo. Una vez que llega al estómago, la pared quística comienza a reblandecerse, por la interacción con los jugos duodenales hasta que se rompe y deja libre al trofozoíto metacíclico. El desenquistamiento inicia con 4 núcleos que darán origen a 8 trofozoítos uninucleados eso lo hacen por medio de su forma de reproducción la cual es división binaria (Berrueta, 2019), cuando el parásito vuelve a realizar el proceso de enquistamiento ocurre una partición múltiple del núcleo antes de que se divida el citoplasma. El procesos inicia con la formación de un prequiste, el cual se genera cuando las condiciones del medio ambiente son poco favorables,

comienza a inmovilizarse hasta que deja de emitir pseudópodo y aparece una pared gruesa, conocida como pared quística, para posteriormente ser expulsado junto con las heces y comenzar nuevamente su ciclo Figura 1 (Gómez et al., 2007; Romero et al., 2008).

Por otra parte hay trofozoítos que no salen al medio ambiente, se adhieren a la superficie del intestino e invaden los tejidos hasta romper la integridad de la superficie de la mucosa, produciendo lesiones ulcerosas que van creciendo hasta que el trofozoíto puede llegar a los vasos sanguíneos del intestino, una vez en la circulación enterohepática llega al hígado en donde puede causar lesiones y la ruptura de la cápsula de Glisson permitiendo la invasión de tejidos cercanos como el diafragma, vísceras, pared abdominal entre otros. Además es posible que del hígado también salgan trofozoítos a la circulación y se distribuyan a cualquier órgano, aparato o sistema mediante la sangre (Romero et al., 2008; Berrueta, 2019).

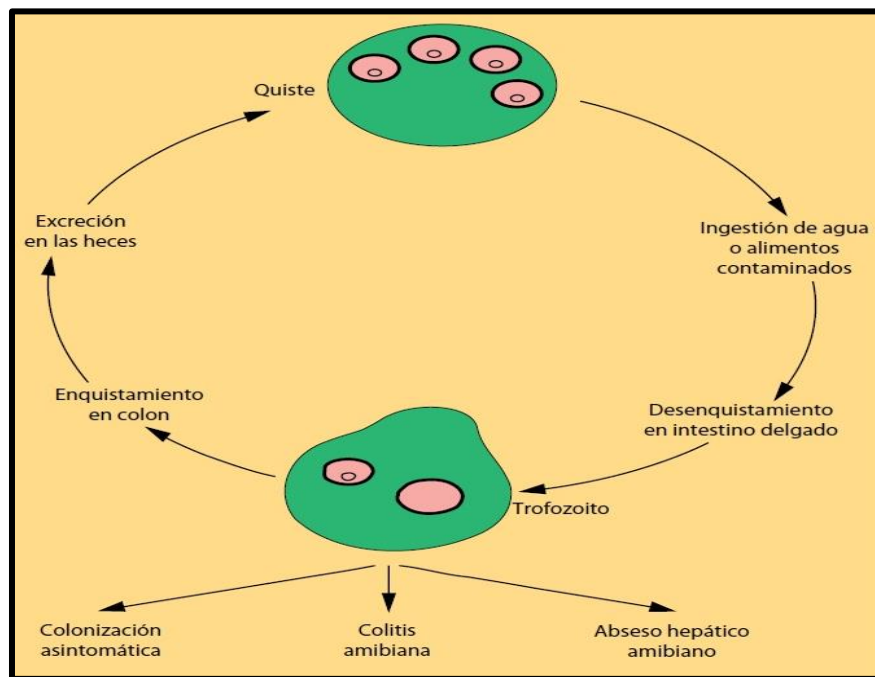


Figura 1. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica* y las manifestaciones clínicas de la infección en humanos (Huston et al., 1999).

4.- Epidemiología de la amibiasis en México y el mundo

La amibiasis continua siendo un problema de salud pública a nivel mundial, su prevalencia es principalmente en áreas tropicales y subtropicales con condiciones higiénico-sanitarias deficientes. Esta enfermedad es endémica en México, India, Indonesia, Asia, las regiones semiáridas y tropicales de África y partes de América Central y de América del Sur (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2015), es la responsable de 40,000 a 100,000 muertes al año. Además se encuentra relacionada con aspectos sociales, económicos, culturales, históricos y políticos, en países en desarrollo es muy común debido a la migración de poblaciones procedentes de zonas endémicas. Las complicaciones de la amibiasis son: amibiasis hepática, cerebral, pulmonar, mediastino-pericárdica, pleuropulmonar solo por mencionar algunas (Gómez et al., 2007; Romero et al., 2008). Se ha descrito que la amibiasis afecta alrededor del 10% al 20% de la población mundial y alcanza prevalencias de 30% y hasta 55% en regiones tropicales y subtropicales con malas prácticas de higiene. En Colombia y Brasil se calculan prevalencias de hasta 40%, en Costa Rica del 27% al 55%, en Bangladesh y Arabia hasta 30%, en la ciudad de México se informaron valores de prevalencia del 55%, mientras que en el área rural de Michoacán se encontró una prevalencia de 7.2%. A la fecha se considera la tercera parasitosis causante de muerte en el mundo, sólo después del paludismo y la esquistosomiasis, con 40 a 110 mil muertes (Mora & Zerpa, 1992).

Eh afecta ambos sexos sin embargo en forma hepática se presenta de 7 a 10 veces más en el sexo masculino, como complicación de colitis fulminante o necrosante hay un 0.5 % de casos, con una mortalidad del 40%, mientras que la forma hepática con ruptura intraperitoneal es del 2% al 7% (Romero et al., 2008), infecta alrededor del 10% de la población a nivel mundial, de ella solo 1% desarrolla la enfermedad y se calcula que cerca de 100,000 enfermos mueren por complicaciones (Gómez et al., 2007; Saavedra E. & Olivos A., 2017).

La amibiasis en México constituye uno de los principales motivos de consulta con aproximadamente medio millón de casos al año (Gómez et al., 2007; Saavedra E.

& Olivos A., 2017). Se han encontrado los siguientes porcentajes promedio sobre población total: 20% de portadores, 2% de enfermos, 5.9% de seropositivos y muertes entre 0.1% y 0.2% de los enfermos (en números: 16 millones de portadores, 1.3 millones de enfermos y 10 mil a 30 mil muertes). Con base a estos datos, puede afirmarse que la amibiasis se encuentra entre las primeras causas de morbimortalidad en el país (Gutiérrez, 1987; Martínez, 1989; Saavedra E. & Olivos A., 2017).

La amibiasis en México está dentro de las 20 principales causas de enfermedad en la población de ahí su importancia (Tabla 1). Un estudio seroepidemiológico reportó que al menos el 8.41% de la población tiene anticuerpos anti-amibianos. (Romero et al., 2008; Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud del Gobierno Federal, 2018).

Número	Padecimiento	Código de la lista detallada CIE10a. Revisión
1	Infecciones respiratorias agudas	J00-J06, J20, J21 excepto J02.0 y J03.0
2	Infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas	A04, A08-A09 excepto A08.0
3	Infección de vías urinarias	N30, N34, N39.0
4	Úlceras, gastritis y duodenitis	K25-K29
5	Gingivitis y enfermedad periodontal	K05
6	Conjuntivitis	H10
7	Otitis media aguda	H65.0-H65.1
8	Obesidad	E66
9	Vulvovaginitis	N76
10	Hipertensión arterial	I10-I15
11	Diabetes mellitus no insulino dependiente (Tipo II)	E11-E14
12	Intoxicación por picadura de alacrán	T63.2, X22
13	Asma	J45, J46
14	Insuficiencia venosa periférica	I87.2
15	Faringitis y amigdalitis estreptocócicas	J02.0, J03.0
16	Amebiasis intestinal	A06.0-A06.3, A06.9
17	Candidiasis urogenital	B37.3-B37.4
18	Otras helmintiasis	B65-B67, B70-B76, B78, B79, B81-B83 excepto B73 y B75
19	Varicela	B01
20	Accidentes de transporte en vehículos con motor	V20-V29, V40-V79
Total 20 principales causas		
Otras causas		

Tabla 1. Principales causas de enfermedades nacionales ubicando a la amebiasis en la posición dieciséis (Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud del Gobierno Federal, 2018).

5.- Patogénesis de *Entamoeba histolytica*

Eh comienza su infección cuando es ingerida como quiste por alimentos, agua u objetos contaminados, una vez en el intestino se desenquista para dar origen a los trofozoítos que es su forma invasiva, como ya se ha mencionado anteriormente algunos vuelven a generar el proceso de enquistamiento y salen junto con las heces, otros trofozoítos se quedan en el intestino y dan comienzo a la invasión, la cual inicia con el beso de la muerte es decir que los trofozoítos interaccionan con las células blanco generando en primera instancia el proceso de fagocitosis, seguido de la liberación de sus diferentes moléculas comenzando con las lecitinas las cuales le ayudan a adherirse a las células intestinales y degradan la mucosa con el objetivo de que después los amiboporos puedan adherirse y generar poros en la membrana de las células blanco provocando la liberación de su contenido el cual posteriormente será degradado por las proteasas de cisteína para que la amiba puede consumir los nutrientes y pueda continuar con su ciclo de vida. A continuación se describe de forma más detallada cada uno de los procesos de mecanismo de muerte celular de *Eh* (Garza et al., 1982; Shibayama & Tsutsumi, 2013).

6.- Mecanismo de muerte celular que induce *Entamoeba histolytica*

Como ya se ha mencionado anteriormente este parásito es capaz de invadir diferentes tipos de tejidos, produciendo principalmente lo que se conoce como colitis amibiana y absceso hepático (Quach et al., 2014; Singh et al., 2019). Para la invasión en los diferentes tejidos del hospedero, este realiza diferentes mecanismos con los cuales induce la muerte de las células blanco en cuestión, dentro de ellos encontramos: el beso de la muerte, la fagocitosis (Shibayama & Tsutsumi ,2013) y moléculas que participan en la inducción de muerte como: amiboporos, fosfolipasas, colagenasas, adhesinas y proteasas de cisteína (Pérez et al., 2006), considerando también la participación de microbiota bacteriana, que si bien no es un mecanismo de muerte es un factor que contribuye de forma importante en su patogenicidad (Shibayama & Tsutsumi ,2013).

6.1- Beso de la muerte

Se piensa que el primer paso para la invasión es la adhesión de los trofozoítos a las células blanco, sin embargo se ha encontrado que en microcinematografía se observa cómo las amibas tocan a las células blanco pero no se aferran a ellas; lo que se conoce como el *hit and run*, "golpear y huir". Hay consenso general de que esa interacción, es necesaria ya que de no ocurrir, no se inicia la fase siguiente, la del daño de la célula. Esto sugiere que por sí solas, las amibas no liberan al medio los componentes que afectan las células sino que requieren de algún tipo de activación, por ejemplo: la interacción con la células blanco que les permite liberar sus toxinas amibianas que en algún punto se concentran y ejercen su acción lítica, comenzando la adhesión de los trofozoítos por medio de la adhesinas (Garza et al., 1982).

Se han realizado experimentos en los se indujo la formación de abscesos hepáticos amibianos en los ratones, los resultados mostraron lesiones amibianas en el absceso del hígado de los ratones lo que sugiere que la citólisis inducida por los trofozoítos en estas condiciones pueden contribuir al desarrollo del absceso hepático y que el contacto directo de las amibas (beso de la muerte) puede ser el primer paso de la muerte celular (Shibayama & Tsutsumi, 2013).

6.2- Fagocitosis

Es la ingestión de microorganismos o partículas de materia resultantes de la rotura del tejido por los leucocitos polimorfonucleares, monocitos o fagocitos hísticos. El proceso de fagocitosis se realiza mediante varios procesos que son: opsonización (recubrimiento de inmunoglobulinas o complemento a las bacterias o antígenos), ingestión (después de la fijación la bacteria es incorporada a la célula, rodeándola con pseudópodos del fagocito), y por último destrucción de las bacterias o antígenos mediante la degradación por enzimas, pH ácido en la vacuola, proteínas catiónicas, lactoferrinas, anión superóxido o peróxido de hidrógeno (Shibayama & Tsutsumi, 2013).

Eh es un parásito que también realiza la fagocitosis de glóbulos rojos (eritrofagocitosis) es una característica muy común en las amibas invasoras y su

presencia en el citoplasma fue uno de los criterios biológicos usados para poder reconocerlas en heces disentéricas y lesiones hepáticas. Sin embargo, en estudios recientes se demuestra que no necesariamente realizan eritrofagocitosis en todos los casos (Shibayama & Tsutsumi, 2013).

La fagocitosis es un proceso que requiere la presencia de miosinas las cuales son proteínas motoras que se mueven sobre el citoesqueleto de actina para impulsar los procesos celulares (Gautam, 2019). Durante la fagocitosis amibiana participan diversas adhesinas, el citoesqueleto y enzimas digestivas, entre otras moléculas de las amibas. Una vez adherida a las células blanco causa su muerte para después fagocitarla y procesarla en vacuolas (lisosomas y fagosomas) en donde se degradan los fragmentos celulares (Shibayama & Tsutsumi, 2013).

6.3- Moléculas que participan en la inducción de muerte celular

El primer paso de *Eh* para la agresión a las células blanco, es la interacción que tiene *Eh* con estas para comenzar a liberar sus toxinas, seguido de la adhesión que se genera por medio de la lectina. Esta funciona como una adhesina que tiene gran afinidad por la galactosa sustancia que es abundante en células del colon. Una vez que *Eh* se adhiere, las células blanco muestran alteraciones como la desaparición de microvellosidades, pérdida de cohesión en uniones intercelulares, creando espacio entre las células. Las alteraciones provocadas en las células blanco también pueden deberse a proteínas liberadas por la amiba, como el amiboporo. Esta proteína produce poros en la célula, permitiendo la entrada y salida de iones rompiendo el gradiente iónico indispensable para las funciones de las células (Garza et al., 1982; Shibayama & Tsutsumi, 2013).

La degradación y lisis celular continúa con la liberación de proteasas como la fosfolipasa, la colagenasa y la proteasa de cisteína que son capaces de degradar la laminina, la fibronectina y la colágena. Además el trofozoíto puede destruir células polimorfonucleares desde el inicio del proceso infeccioso liberando enzimas que lo ayudan con la lisis celular (Romero et al., 2008).

Las amibas se movilizan hacia espacios intercelulares provocando un mayor daño a las células blanco (Garza et al., 1982). Además es importante mencionar que para el desarrollo de la amibiasis se requiere de determinados factores característicos del hospedero como son: estado nutricional, pH intestinal, biota intestinal, estasis fecal y estado inmunológico (Romero et al., 2008).

6.3.1- Lectinas de *Entamoeba histolytica*

Son proteínas que se unen a azúcares, con las que se inicia el proceso de invasión por la amiba, solo una de ellas se encuentra perfectamente caracterizada y se conoce con el nombre de lectina galatosa/N-acetil D-galactosamina (Gal/GalNAc), su proteína nativa está compuesta como un heterodímero de 260 kDa, consistiendo de una subunidad pesada (170 kDa) unida por un enlace disulfuro a la subunidad ligera (35/31 kDa, los cuales se asocian de forma no covalente con una segunda subunidad intermedia (150 kDa)(Shibayama & Tsutsumi ,2013; Min et al., 2016). Las funciones de las subunidades intermedias son desconocidas; aunque parece haber alguna relación para la subunidad ligera en la citotoxicidad y la subunidad intermedia puede ser el antígeno que se ha caracterizado como una molécula de unión a la fibronectina similar a la integrina (Ralston & Petri, 2011). Por otra parte se ha demostrado que la adherencia amibiana puede inhibirse con diferentes tipos celulares, como son células epiteliales, eritrocitos, neutrófilos entre otros. Además la lectina como mecanismo de defensa se une a moléculas del complemento como: C8 y C9 provocando que ya no se genere el ensamble del complejo a la membrana de las proteínas de los trofozoítos (Romero et al., 2008).

Existen otras proteínas implicadas en la adherencia tales como la lectina de superficie celular de 220 kDa, la cual es inhibida en presencia de polímeros de N-acetil glucosamina y la adhesina de 112 kDa, esta fue descubierta cuando se realizaban estudios con uso de mutantes deficientes en adherencia, esta última presenta actividad de proteasa de cisteína lo cual pareciera indicar que también participa en la degradación de distintas moléculas durante la invasión (Shibayama & Tsutsumi,2013; Kato et al., 2017). Todas las adhesinas mencionadas

anteriormente participan en la unión de *Eh* a la superficie de glóbulos rojos y a la eritrofagocitosis ya que los glóbulos rojos las proveen de hierro que es indispensable para la adherencia y citotoxicidad de esta (Romero et al., 2008; Ralston & Petri, 2011).

6.3.2.- Amiboporos

Una vez que la amiba ha iniciado la infección en el hospedero por medio de lectinas procede a utilizar otros mecanismos para continuar con su proceso de invasión. Esto lo hace mediante el empleo de péptidos que producen poros en las membranas de las células diana a los cuales se les conoce como amiboporos (Andra et al., 1996). Estos son indispensables para la virulencia de *Eh* ya que estudios realizados en los últimos años indican que la ausencia de amiboporo o el bloqueo de su actividad disminuye la virulencia de esta (Zhang et al., 2004). El amiboporo tienen gran similitud de secuencia con las proteínas NK-lisina y granulisina las cuales permeabilizan la membrana de los mamíferos (Ralston & Petri, 2011). Su peso moleculares va de 5 a 30 kDa (Shibayama & Tsutsumi, 2013) y pertenecen a la familia de la SAPLINPs (saposin-like proteins), son dependientes del pH y de la presencia de sales en el medio en el que se encuentre. Además pueden inducir la formación de poros en liposomas sintéticos y son máximamente activos a pH 5.2 (Ralston & Petri, 2011), ya que su actividad se ve marcadamente disminuida a pH con valores por encima de 6 (Bruhnet al., 2003).

La protonación de su único residuo de histidina y el proceso de dimerización son indispensables para la actividad del amiboporo. Este genera una estructura con forma de anillo que cuenta con una superficie exterior hidrofóbica y un interior hidrofílico, lo cual le permite la perforación sobre la membrana de la célula blanco (Hecht et al, 2004).

Existen tres isoformas del amiboporo: A (Figura 2), B y C cada una con un tamaño de 77 residuos de aminoácidos estabilizados por tres enlaces disulfuro, dispuesto en cuatro dominios de α -hélice en su mayoría anfipáticos (Andra et al., 1996). Se

ha encontrado que estos tienen actividad citolítica *in vitro*, ya que se puede insertar en la membrana de células eucariotas y bacterianas provocando una lisis celular (Romero et al., 2008).

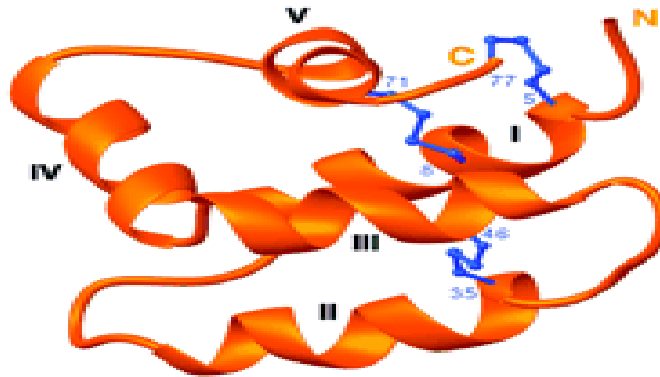


Figura 2. Estructura de amiboporo A. Representación en cinta de la estructura promedio minimizada de energía. Los enlaces disulfuro se representan en azul, y los términos N y C están etiquetados, las hélices están numeradas por números romanos (Hecht et al, 2004). Nota: Figura creada usando GRASP

Se sabe que hay diferentes tipos de amibas que están clasificadas como virulentas y no virulentas. Sin embargo hay estudios que revelan que una amiba no virulenta (*E. dispar*) es capaz de generar daño a tejidos por medio de amiboporo A. Esta molécula tiene una relación estrecha con el amiboporo A de *Eh*, hay estudios *in vitro* en los que ambas amibas son capaces de matar células blancas empleando el amiboporo A. Si se compara la actividad formadora de poros es considerablemente más alta en *Eh* que en *E. dispar* (Nickel et al, 1999).

Por otro lado hay indicativos de que la maquinaria de apoptosis es activada por los amiboporos cuando afectan a los hepatocitos (Shibayama & Tsutsumi, 2013). Además se ha demostrado que los amiboporos son capaces de destruir hepatocitos a distancia ya que estos muestran condensación de la cromatina nuclear y fragmentación del DNA internucleosomal (Romero et al., 2008).

6.3.4- Proteasas de cisteína

Como paso final de la infección *Eh* hace uso de proteasas de cisteína las cuales realizan una actividad proteolítica (Ralston & Petri, 2011). Estas proteínas realizan

la degradación de los componentes de la matriz extracelular, de la colágena, la elastina, el fibrinógeno y la laminina. Las proteasas de cisteína (CP) tienen como función el desprendimiento de las monocapas celulares en *in vivo*. Además interfieren con la función del sistema inmune al hidrolizar a C3, IgG, IgA y a las anafilotoxinas C3a y C5a, las cuales afectan la actividad de los neutrófilos en el absceso hepático amibiano (Shibayama & Tsutsumi, 2013).

La función de las CP es la digestión de las bacterias y los glóbulos rojos (Romero et al., 2008), también tienen participación en la degradación de la mucina del intestino para permitir que *Eh* penetre más fácilmente entre las células (Cornick & Chadee, 2017) y realiza la activación de diferentes enzimas implicadas en su virulencia. Se ha encontrado a una CP de interés que pertenece a la superfamilia de la papaína, es conocida como CP5, fue encontrada en la membrana de los trofozoítos y su función es la destrucción tisular (Romero et al., 2008; Shibayama & Tsutsumi, 2013). En estudios recientes se mostró que la eliminación de esta proteinasa en las amibas genera una disminución en la degradación de la mucina y mayor destrucción celular. Además de que amibas deficientes en esta enzima mostraron menor actividad fagocítica y reducción en el tamaño del absceso hepático experimental (Shibayama & Tsutsumi, 2013).

Otras evidencias indican que la amiba se une con alta afinidad a la mucina MUC2 a través de una lectina de adherencia de subunidad pesada de 170 kDa que se dirige específicamente a las cadenas laterales de Gal / GalNAc, provocando con ello que se deje de producir mucina y que las proteasas de cisteína degraden el resto, para poder introducirse entre los espacios celulares y continuar con la lisis celular (Cornick et al., 2016).

La cantidad de proteinasas secretadas por los trofozoítos de *Eh* es lo que la diferencia de la especie no patógena *E. dispar*, los trofozoítos amibianos pueden secretar de 10-10,000 veces más niveles de CP que las de *E. dispar* (Romero et al., 2008).

7.- Participación de microbiota bacteriana

La interacción entre las amibas y la microbiota bacteriana del intestino grueso constituye el inicio de las primeras interacciones hospedero-parásito que podrían dar inicio a la enfermedad (Shibayama & Tsutsumi, 2013). Estudios realizados por el CINVESTAV han demostrado que las bacterias favorecen a que las amibas generen muerte celular. Se encontró que los individuos que manifestaron la enfermedad, además de ser portadores del parásito, tienen asociada alguna bacteria enteropatógena como se ha observado a *Shigella* la cual “activa” al patógeno (Meza, 2011). Por otra parte se ha observado que animales libres de gérmenes son resistentes a la infección por *Eh*, pero la introducción de una especie bacteriana restableció la patogénesis amibiana. Se ha demostrado que la axenización (es decir, la eliminación de bacterias asociadas) de trofozoítos cultivados xénicamente disminuye la virulencia y además la incubación de trofozoítos axénicos con bacterias vivas restauró la virulencia, lo cual es dependiente de la interacción (Nakada & Nozaki, 2016).

Algunos reportes indican que las bacterias sensibilizan el epitelio intestinal y facilitan la adhesión de las amibas sobre las células intestinales propiciando un ambiente para que se manifieste la amibiasis. Al adherirse las amibas a las células intestinales pueden causar inflamación, este efecto se incrementó cuando hay presencia de bacterias. Ante estos hallazgos, se podría pensar en una estrategia para bloquear la unión entre la amiba y la célula epitelial durante la infección mixta, con lo que disminuiría el estado inflamatorio de los pacientes y la amibiasis no podría manifestarse (Meza, 2011).

8.- Amibiasis extraintestinal y su relación con: las células HepG2, la línea celular RAW, los macrófagos peritoneales, los macrófagos diferenciados de médula ósea, las células HeLa, las células HEP-2, las células A549 y las células Vero

La amibiasis por *Eh* se presenta de dos formas intestinal y extraintestinal esto debido a factores exógenos y endógenos. La manera extraintestinal llega al hígado produciendo amibiasis hepática que a su vez puede por vía hematógena llegar a diseminarse al sistema nervioso central, pulmón, riñón, peritoneo etc. (Pérez et al., 2006). *Eh* puede llegar a cualquier parte del cuerpo incluso hay casos de la amibiasis epitelial debido a una mala higiene entre otras cosas como la sexualidad (Romero et al., 2008; Quach et al., 2014). Para fines de este trabajo nos centraremos en: el hígado el pulmón, el riñón, cutáneo y para el caso de los macrófagos será con respecto al sistema inmune así como su relación con la línea celular RAW, macrófagos peritoneales, macrófagos diferenciados de médula ósea, células HeLa, células HEP-2, células HepG2, células A549 y células Vero.

8.1.- Amibiasis hepática

Se sabe que entre los sitios más favorables para el desarrollo de los parásitos intestinales es el duodeno, íleon, ciego e intestino grueso (Romero et al., 2008), tal es el caso de *Eh* la cual habita en el lumen intestinal. De forma extraintestinal suele colonizar en el hígado, generando lo que se conoce como absceso hepático amibiano (AHA), este último ocurre en al menos el 1% de los individuos infectados (Rodríguez et al., 2010).

Un absceso hepático es una necrosis de los hepatocitos y múltiples microabscesos que confluyen (Castillo et al., 2014) y generan una cavidad supurativa en el hígado cuyo resultado es debido a la invasión y proliferación de microorganismos a través de la lesión por vía hematógena o biliar. Suelen localizarse en el lóbulo derecho, debido al flujo sanguíneo porta secundario que es donde se encuentra la mayor irrigación (Romero et al., 2008).

La generación de un absceso hepático amibiano comienza por la invasión del tejido la cual es favorecida por la motilidad que posee el parásito. Para el movimiento del parásito a través de células intestinales y en el hígado es esencial la miosina II. Mientras que las lectinas unidas a galactosa/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc) modulan la distribución de los trofozoítos en el hígado y su capacidad para migrar en el tejido hepático. La Gal/GalNAc actúa como un antígeno de superficie que activa a las células endoteliales desencadenando la patología. Las células estimuladas muestran un incremento en Ca^{+2} , lo cual activa nucleótidos cíclicos y protein-cinasas llevando a la activación de la cascada de protein-cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Esta vía es la implicada en los procesos de apoptosis, proliferación, rearrreglos del citoesqueleto y cambios de permeabilidad (Romero et al., 2008).

El absceso hepático amibiano se presenta de 7 a 12 veces más frecuente en hombres de 20 a 40 años (Castillo, 2014), ya que el suero de las mujeres es significativamente más efectivo para eliminar trofozoítos mediante el complemento (Romero et al., 2008). Cuando se realiza la exploración física del paciente se observa fiebre de hasta 40 °C, con escalofríos, palidez y cansancio, con hepatomegalia dolorosa, hiperestesia en la zona del hígado. Cuando el absceso se encuentra en el lado izquierdo el paciente puede tener dolor epigástrico, la ventilación del pulmón derecho puede estar restringida. Entre los signos más alarmantes se encuentra resistencia abdominal, signo de rebote, ausencia de ruidos intestinales y frote pleural o pericárdico. Además puede presentar diarrea, (aunque sólo se da en un tercio de los casos) con características de consistencia líquida con moco y sangre. También puede haber ictericia pero son casos raros y de estar presente es un indicador de que el absceso es grande. El absceso puede extenderse al peritoneo, órganos abdominales, grandes vasos, pericardio, pleura, árbol bronquial y pulmones (Romero et al., 2008; Girón, 2011; Castillo, 2014).

Por otra parte se han reportado estudios *in vitro* referentes a las células HepG2, en los que se indica que la O-GlcNAc inducida por *Eh* en células HepG2 es un proceso importante requerido para la muerte celular de hepatocitos inducida por la adherencia de *Eh* y liberación de LDH (Lee et al., 2018). Cabe destacar que se ha

demostrado que en hígados con absceso hepático hay áreas de daño y áreas sin daño con presencia de trofozoítos en ambos casos. Esto relatando el hecho de que los hepatocitos en las áreas sin daño se encuentran junto con los trofozoítos y no presentan signos de muerte celular (Ventura et al., 2003), nos lleva a preguntar si *Eh* es capaz de dañar a los hepatocitos (HepG2).

8.2.- Amibiasis y macrófagos (línea RAW, macrófagos peritoneales, macrófagos diferenciados de médula ósea)

Se ha encontrado que dentro de los principales mecanismos de defensa ante la presencia de *Eh* se encuentran los macrófagos, sus mecanismos citotóxicos *Eh* no han sido completamente dilucidados (Romero et al., 2008; Ralston & Petri, 2011). Sin embargo estudios recientes demuestran que los macrófagos secretan altas cantidades de citocinas proinflamatorias como el TNF- α y el IFN- γ , las cuales poseen actividad amibicida a través de la liberación de NO. La secreción de TNF- α se ha asociado con un aumento de la enfermedad diarreica, mientras que el NO y el IFN- γ son protectores. Los M ϕ solo secretan IL-1 β cuando interactúan de forma directa con *Eh* que depende de la adhesión inicial por Gal-lectina, por otro lado se observa que el citoesqueleto de los macrófagos, actúa como un sensor que puede distinguir la amenaza que representa la invasión de patógenos vivos dentro del tejido intestinal. Además el citoesqueleto de estos es modificado al tener interacción con la amiba ya que la tubulina se observa muy concentrada en el sitio de contacto macrófago-*Eh* (Pierre et al., 2017).

En cuanto a las líneas de interés se ha encontrado estudios de macrófagos peritoneales aislados de jerbos estimulados con extractos proteicos de *Eh* o interaccionados con el parásito y se observó que producen concentraciones elevadas de PGE₂ (prostaglandina E2) y LTC₄ (leucotreno C4) contribuyendo con la inflamación (Sánchez & Talamás, 2002; Pierre et al., 2017), si bien es un estudio con macrófagos, las células empleadas en el presente trabajo son de origen murino tanto los macrófagos de la línea RAW, macrófagos peritoneales, macrófagos diferenciados de médula ósea y de estos aún no se han reportado estudios relacionados a lo presentado en esta investigación.

8.3.- Amibiasis epitelial (HeLa y HEp-2)

En el presente trabajo se emplearon líneas celulares cuyo origen es el cérvix, se tomó la decisión de clasificarla en el grupo de amibiasis epitelial debido a que una de sus complicaciones es el cáncer en cérvix.

La localización de la amibiasis epitelial es realmente rara, a nivel de piel se señala una frecuencia entre el 0.03% al 0.07% de las dermatosis. La ubicación suele ser cutáneo-genital la cual ha tenido un incremento debido al contacto sexual anal sin protección, las lesiones se deben a la invasión parasitaria directa, el trofozoíto invade la piel por inoculación directa, por contacto buco-anal o genito-anal. (Romero et al., 2008).

La ubicación más común es el área ano-genital y la región toracoabdominal (absceso hepático amibiano), la lesión que aparece con mayor frecuencia es la ulceración. Además puede observarse tejido de granulación cubierto con exudado purulento e incluso sanguíneo, además de necrosis. En la mujer puede presentarse vulvitis, vaginitis, cervicitis e incluso salpinginitis y endometritis cuando las amibas alcanzan regiones genitales por maniobras incorrectas al practicarse el aseo anal post defecación. En cuanto al hombre puede producir balanitis, uretritis y prostatitis, pero la lesión más común es la ulceración fagedénica que es capaz de destruir todo el pene. También se encuentran las llamadas amébides que pueden manifestarse como lesiones rosaceiformes, acneiformes, urticariformes o tipo prurigo. Entre los síntomas se encuentra la fiebre, la astenia y la consunción que puede conducir a la muerte, este tipo de caso se presenta en abscesos hepáticos abiertos a pared abdominal o torácica con potencial peritonitis (Romero et al., 2008).

A pesar de los daños que provoca este tipo de amibiasis debido a su baja incidencia no se ha puesto gran interés para la realización de estudios *in vitro* para conocer mejor la interacción de la amiba con células de los órganos involucrados (Romero et al., 2008). Se ha reportado que las proteasas de cisteína purificadas

de *Eh* tienen efecto citopático sobre monocapas de células HeLa (Pérez et al., 2006), que son células de cérvix, mientras que en las células HEp-2 no se cuenta con ningún reporte de estudios *in vitro* (Romero et al., 2008).

Existen varios casos informados localizados en cérvix, los descritos en región vulvar son muy raros. A nivel mundial, la localización de la amibiasis en el aparato genital femenino ha sido reportada en varias ocasiones, principalmente a nivel de cérvix, infección en vulva, vagina, trompas de Falopio, endometrio y piel de la región genital. Los dos primeros casos de carcinoma de cérvix y amibiasis los reportó Lee en 1932, tres años después Wu y Chi reportaron un caso de amibiasis cervical uterina sin neoplasia. En México, Acevedo y Cols informaron los tres primeros casos en 1964 (Cornejo & Avilés, 2003).

Los pocos casos reportados de amibiasis epitelial se atribuyen a: 1) el medio ácido y el epitelio escamoso vaginal funcionan como barrera natural a la infección, 2) la falta de sospecha clínica y 3) a que frecuentemente se utiliza metronidazol en el tratamiento de la vaginosis, por lo que se puede administrar en forma inadvertida contra la amibiasis (Cornejo & Avilés, 2003).

8.4.- Amibiasis pulmonar

La amibiasis pulmonar es una forma rara de amibiasis extraintestinal producida por vía hematógena, esto quiere decir que el parásito primero invade el hígado hasta que logra salir al torrente sanguíneo y de ahí puede partir al pulmón. En los últimos tiempos ya se han presentado varios casos, por lo cual es importante el estudio de la amibiasis en esta forma, en este trabajo se hizo uso de células pulmonares conocidas como A549 de las cuales no se encontraron reportes de estudios *in vitro* (Zhu et al., 2014).

Cuando *Eh* invade el pulmón debido a la ruptura o extensión del AHA el cual se localiza en el lóbulo derecho del hígado, el paciente puede presentar tos, dolor pleurítico, disnea, dificultad respiratoria, dolor súbito entre otros. La invasión pulmonar es una complicación severa y frecuentemente mortal, lo que sucede es

que a través del diafragma se abre el pulmón generando un absceso pulmonar o gangrena pulmonar (Romero et al., 2008).

8.5.- Amibiasis renal

Las complicaciones que se presentan en este órgano ya sea por continuidad o vía hematógena son: la nefritis, la cistitis y la prostatitis subagudas. La nefritis generalmente es necrozante y se asocia con una lesión en el lóbulo derecho del hígado en su parte posterior, la cistitis está relacionada con las mujeres con un problema genito urinario, mientras que la prostatitis se establece por vía hematógena asociada al absceso hepático, es igual de rara que la presencia de amibiasis pulmonar (Sharma et al., 2005; Romero et al., 2008). Por otra parte se ha sugerido que este tipo de amibiasis generada por *Eh* puede ser ocasionada en asociación con *Escherichia coli* (Malaki, 2014).

Un tipo de células localizadas en este órgano son las células Vero (Sharma et al., 2005; Romero et al., 2008), de las cuales hoy en día no se encuentra reportados estudios *in vitro*

9.- Células y líneas celulares de interés

9.1.- HepG2

Fue obtenida de un carcinoma hepático de un varón caucásico de 15 años en 1975, son células epiteliales, adherentes que crecen como monocapas en pequeños agregados, producen una variedad de proteínas: alfafetoproteína, albúmina, alfa2-macroglobulina, alfa1-antitripsina, transferrina, alfa1-antiquimotripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, plasminógeno, complemento (C3, C4), C3 activador, fibrinógeno, glicoproteína del ácido alfa1, glicoproteína alfa2-HS, β -lipoproteína, retinol proteína de unión, 3-hidróxi-3-metilglutarilCoA reductasa y lipasa de triglicéridos hepático (Innoprot, 2017). Las células HepG2 han sido utilizadas para el estudio de desarrollo de hígados bioartificiales así como para el estudio en cánceres hepáticos, ahí la importancia de su aplicación en el campo de

la ciencia (Ramirez et al., 2012). Su medio de crecimiento es Eagle modificado por Dulbecco complementado con 5% de SFB, incubada a una temperatura de 37 ° C con una atmosfera de CO₂ al 10% (ATTC, 2018).

9.2.- RAW

Las células RAW son células de tipo monocito/macrófago originadas a partir de la línea celular transformada por el virus de la leucemia de Abelson, derivada de ratones BALB/c (Lambris, 2007) y son capaces de realizar pinocitosis y fagocitosis. Con la estimulación de lipopolisacáridos aumentan la producción de óxido nítrico (NO) y aumentan su fagocitosis. Tienen la capacidad de destruir las células diana mediante citotoxicidad dependiente de anticuerpos, se diferencian en osteoclastos los cuales una vez diferenciados adquieren actividad de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP, por sus siglas en inglés), que es el mejor marcador conocido de osteoclastos (Taciak et al., 2018). Su medio de crecimiento es Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero fetal bovino (SFB) hasta una concentración final del 10% incubada a una temperatura de 37 ° C con una atmosfera de CO₂ al 5% (ATTC, 2002).

9.3.- Macrófagos peritoneales y macrófagos diferenciados de médula ósea

Los macrófagos empleados para el presente trabajo fueron obtenidos de los ratones cuya especie se conoce como *Mus musculus*, cepa Balb/c, su medio de crecimiento es Roswell Park Memorial Institute médium complementado con 10% SFB incubada a una temperatura de 37° C con una atmosfera de CO₂ al 5% (Mesa et al., 2010).

Los monocitos se originan en la médula ósea donde una vez liberados circulan durante varios días en la sangre periférica, cuando hay daño tisular o infección, los monocitos abandonan el torrente sanguíneo y entran en el tejido u órgano afectado y se someten a una serie de cambios para convertirse en macrófagos. Estos pueden modificarse para formar diferentes estructuras para combatir diferentes microbios e invasores, la morfología de los macrófagos indica que

tienen alrededor de 21 micrómetros de diámetro, poseen un núcleo en herradura, en su citoplasma se ve un abundante retículo endoplásmico rugoso y gran número de mitocondrias, cabe mencionar que como monocito tiene un menor tamaño de 0-18 μm de diámetro (Iáñez, 1999).

Los macrófagos desempeñan un papel importante en la inmunidad, asumen un papel defensivo exhibido por su capacidad para llevar a cabo la fagocitosis de parásitos y distintos microorganismos. Regulan la activación y proliferación de linfocitos y son esenciales en el proceso de activación de los linfocitos T y B por los antígenos, alógenos y células (Elhelu, 1983; Mesa et al., 2010). Son células especializadas que reconocen, envuelven y destruyen las células diana. El término macrófago está formado por la combinación de los términos griegos "*makro*" que significa grande y "*phagein*" que significa comer (Iáñez, 1999).

Los M ϕ pueden sobrevivir durante meses y también están involucrados en el desarrollo de la inmunidad innata, este tipo de inmunidad se adquiere cuando un macrófago digiere un microorganismo y presenta el antígeno del microorganismo en su superficie para alertar a otros glóbulos blancos de la presencia de la partícula invasora, luego otros glóbulos blancos se multiplican y producen una respuesta inmunitaria contra el patógeno (Gordon & Tylor, 2005; Gordon & Martínez, 2017). Existen diferentes tipos de macrófagos, los cuales son nombrados de acuerdo a su ubicación anatómica Tabla 3 (Iáñez, 1999).

Tipo de macrófago	Ubicación anatómica
Macrófagos del tejido adiposo	Tejido adiposo (grasa)
Monocitos	Médula ósea / sangre
Células Kupffer	Hígado
Histiocitos del seno	Ganglios linfáticos
Macrófagos alveolares (células de polvo)	Alvéolos pulmonares de los pulmones.
Macrófagos tisulares (histiocitos) que conducen a células gigantes.	Tejido conectivo
Microglia	Sistema nervioso central
Células de Hofbauer	Placenta
Células mesangiales intraglomerulares	Riñón
Osteoclastos	Hueso
Células epitelioides	Granulomas
Macrófagos de pulpa roja (células de revestimiento sinusoidal)	Pulpa roja del bazo.
Macrófagos peritoneales	Cavidad peritoneal
LysoMac	Placa de Peyer

Tabla 3. Ejemplos de tipos de macrófagos y su ubicación anatómica (Láñez, 1999).

9.4.- HeLa

Son células derivadas de un carcinoma cervical de una mujer de 31 años conocida con el nombre Henrietta Lacks, son susceptibles a Poliovirus tipo I y adenovirus tipo 3, han sido identificadas como contaminante en muchas otras líneas celulares y se ha encontrado que contienen secuencias del virus del papiloma humano 18 (HPV-18), su medio de crecimiento es Eagle modificado por Dulbecco complementado con 10% de SFB, incubada a una temperatura de 37 ° C con una atmosfera de CO₂ al 5% (ATTC, 2003).

La historia de la obtención de la línea celular comenzó cuando Henrietta acudió al hospital Hopkins debido a que presentaba un sangrado vaginal anormal (Dosne, 2006), se le hizo el diagnóstico de cáncer de cuello de útero y fue tratada con radioterapia local con radio intrauterino y radioterapia con rayos X pero el tumor siguió su curso invadiendo pulmón, hígado, peritoneo y cavidad pelviana rápidamente provocándole la muerte en el año de 1951 (Álvarez, 2013; Portillo, 2014).

Desde 1952 a la fecha las células HeLa han estado involucradas en miles de estudios. Incluso en algún momento infectaron otras líneas celulares y obligaron a desarrollar medidas de aislamiento y purificación de cultivos celulares (Álvarez, 2013), en 1965 se logró fusionar células HeLa con células de ratones obteniéndose las primeras células híbridas humano-animal (Portillo, 2014). Finalmente se llegó a la creación de un comité especial que se preocupara del asunto en Estados Unidos para mantener las distintas líneas celulares desarrolladas en estado puro. Su aporte a todas las ramas del conocimiento ha sido invaluable. Incluso han ido al espacio exterior, dentro de algunos protocolos de estudio (Álvarez, 2013; Portillo, 2014).

9.5.- HEp-2

Las células de esta línea contienen cromosomas marcadores HeLa, se derivaron a través de la contaminación HeLa. Originalmente se pensó que esta línea se originaba de un carcinoma epidermoide de laringe, pero posteriormente según el análisis de isoenzimas, los cromosomas marcadores HeLa y las huellas dactilares de ADN se habían establecido a través de la contaminación de las células HeLa, la línea HEp-2 presenta un crecimiento más lento pero alcanza la confluencia deseada en comparación con las células HeLa (Carrea et al., 2015), es reconocida por su capacidad *in vitro* de reorganizar su citoesqueleto de actina lo cual permite que la interacción con *Salmonella* pueda semejar lo que ocurre en el humano en estudios realizados anteriormente (Cardona & Sánchez, 2005), ha sido utilizada para diferentes estudios clínicos y de infección, siendo de gran ayuda en la creación de vacunas y péptidos antimicrobianos (ATTC, 2003; Carrea et al., 2015).

En 1952 un año después del descubrimiento de la línea celular HeLa, se comenzaron a realizar diversos estudios con diferentes medios y diferentes condiciones para establecer la forma adecuada de crecimiento (Carrea et al., 2015), su medio de crecimiento es Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero bovino fetal hasta una concentración final del 5% incubada a una temperatura de 37 ° C con una atmósfera de CO₂ al 5% (ATTC, 2003; Cardona & Sánchez, 2005).

9.6.- A549

Esta línea fue iniciada en 1972 por DJ Giard a través de un cultivo de tejido carcinomatoso pulmonar de un varón caucásico de 58 años en un estudio para intentar establecer líneas continuas a partir de 200 tumores diferentes, la línea celular A549 fue desarrollada como una herramienta para la investigación del cáncer, se caracterizó por ser representativa de los neumocitos alveolares tipo II (Cooper, 2012), son células que cubren el 5% restante de la superficie alveolar del pulmón humano y tienen múltiples funciones, debido a esto la línea celular ha sido un pilar de la investigación respiratoria durante casi cuarenta años (Cooper, 2012; Cooper et al., 2016). Su medio de crecimiento es Eagle modificado por Dulbecco

formulado complementado con 5% de SFB, incubada a una temperatura de 37 ° C con una atmosfera de CO₂ al 5% (ATTC, 2018).

La línea celular A549 es empleada en la investigación del cáncer, la generación de modelos epiteliales del pulmón distal para estudios en las vías respiratorias y se ha encontrado que es un hospedero adecuado para muchos virus humanos respiratorios incluyendo adenovirus (Cooper, 2012).

9.7.- Vero

Se obtuvo del riñón de un mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) adulto normal el 27 de marzo de 1962, por Y. Yasumura e Y. Kawakita en la Universidad de Chiba Japón (Sheets, 2000), su medio de crecimiento es Eagle modificado por Dulbecco complementado con 5% de SFB, incubada a una temperatura de 37 °C con una atmosfera de CO₂ al 5% (ATTC, 2003).

Es una de las líneas celulares continuas de mamíferos más utilizadas en microbiología e investigación de biología molecular y celular. Se ha usado en muchas otras aplicaciones, incluyendo la propagación y el estudio de bacterias intracelulares (*Rickettsia spp.*), parásitos (*Neospora*) y la evaluación de los efectos de los productos químicos, toxinas y otras sustancias en las células de mamíferos a nivel molecular, estas células también han sido autorizadas para la producción de vacunas virales tanto vivas (rotavirus, viruela) como inactivadas (poliovirus), en todo el mundo se han utilizado para la producción de una serie de otros virus, incluidos el virus de la rabia, reovirus y virus de la encefalitis japonesa (Ammerman NC et al., 2008).

El motivo por el cual se realiza el uso de células Vero en lugar de células diploides es que las células Vero pueden ser más fácilmente adaptados para el crecimiento en biorreactores y proporcionan consistentemente mayores rendimientos de virus permitiendo una mayor pureza de la vacuna (menos residuos de células contaminantes), lotes más grandes de vacunas (mayor disponibilidad de vacunas) y más económicos (Sheets, 2000).

10.- Inmunocitoquímica

Esta técnica es utilizada en la búsqueda de antígenos celulares que van desde aminoácidos y proteínas hasta agentes infecciosos y poblaciones celulares específicas. La inmunocitoquímica (ICC) es una herramienta para la investigación científica y técnica complementaria para la elucidación de diagnósticos diferenciales que no pueden determinarse mediante análisis convencionales con hematoxilina y eosina (The human protein atlas, 2006; Matos LL et al., 2010).

La ICC es una técnica para la visualización de proteínas y péptidos en células utilizando biomoléculas capaces de unirse a la proteína de interés. Por lo general, la biomolécula es un anticuerpo que está unido a un marcador, por ejemplo, un fluoróforo, un colorante fluorescente o una enzima. El marcador dará lugar a una señal, como puede ser una fluorescencia o color de una reacción enzimática, que luego es detectable por un microscopio apegado a su fuente de iluminación. El tipo de microscopio utilizado para la adquisición de imágenes va a depender del tipo de marcador (The human protein atlas, 2006).

La técnica se realiza a menudo en cuatro pasos secuenciales. Primero, las células se siembran en un soporte sólido, puede ser una placa de pocillos con fondo de vidrio o en un portaobjetos de vidrio. Dependiendo del tipo de célula y de la técnica de siembra, podría ser necesario un tiempo de incubación antes de proceder con la inmunotinción, en el caso de sembrar células adherentes. Las células se unirán a la superficie del soporte sólido durante la incubación, que varía de media hora a 24 h para los diferentes tipos de células. En el segundo paso, las células se fijan, se permeabilizan y se tiñen con anticuerpos. La fijación retiene las proteínas en la célula y conservan su estado químico y estructural en el momento de la fijación. Se puede hacer por reticulación o precipitando las proteínas. Durante la permeabilización, los lípidos a menudo se eliminan de las membranas permitiendo que los anticuerpos crucen las membranas. Sin este paso, los anticuerpos se restringen al exterior de la célula debido a su tamaño, la permeabilización requiere fijación. Después de la inmunotinción, se aplican pasos de lavado para eliminar cualquier anticuerpo no unido. En el tercer paso, las células se visualizan

utilizando un microscopio y las imágenes adquiridas. En el paso final, se analizan las imágenes y se anotan las estructuras celulares (Matos LL et al., 2010).

En una ICC, hay diferentes marcadores, uno es el uso de anticuerpos acoplados a enzimas: después de la adición de un sustrato, las enzimas catalizan una reacción de color visible en el lugar donde el anticuerpo acoplado a enzimas se une a la muestra. Por ejemplo, la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) comúnmente utilizada puede convertir 3,3'-diaminobenzidina (DAB) en un precipitado marrón que se deposita en la muestra en el lugar de la reacción. La mancha de color marrón se puede ver usando microscopía de luz. Otra propiedad es la fluorescencia, que se basa en las características físicas de una molécula para ser excitada a un estado de mayor energía al absorber la luz de una longitud de onda. Posteriormente, la molécula se relaja hasta el estado fundamental, mientras emite luz de una longitud de onda más larga. Estas moléculas se llaman fluoróforos, y pueden visualizarse utilizando un microscopio de fluorescencia (Matos LL et al., 2010).

Hay diferentes tipos de inmunoensayos, los directos, donde el anticuerpo primario es el que se une directamente al antígeno, es el que va marcado y por lo tanto el que producirá la señal, son mucho más sencillos de ejecutar (con un menor número de incubaciones y lavados), y evitan posibles uniones inespecíficas que pueda dar el anticuerpo secundario (The human protein atlas, 2006; Matos LL et al., 2010).

Sin embargo, hay casos en los que los bajos niveles de proteína de interés en la muestra, nos obligan a recurrir a métodos que nos permitan amplificar la señal para poder detectarla. En estos casos, se elegirá un ensayo indirecto, utilizando un segundo anticuerpo que reconozca al anticuerpo primario unido al antígeno. En este caso el anticuerpo secundario es el que deberá conjugarse para transformar la señal (The human protein atlas, 2006).

Si bien es cierto que los ensayos indirectos proporcionan una mayor sensibilidad al generar una señal más intensa, tienen el inconveniente de que en general la

especificidad de los anticuerpos secundarios es mucho menor, pudiendo dar lugar a uniones inespecíficas no deseadas, por lo que en estos casos es necesario prestar especial atención a los pasos de bloqueo, lavado y controles adicionales (Abyntek, 2016).

El tipo de marcador que nos interesa para fines de este trabajo es el de Biotina / Estreptavidina el cual es utilizado para detectar proteínas presentes en muy bajos niveles, insuficientes para ser detectadas ni siquiera con un anticuerpo secundario marcado, ya que la utilización de biotina / estreptavidina permite una mayor amplificación de la señal. El anticuerpo secundario suele ir marcado con biotina, una molécula de pequeño tamaño que permitirá la unión de varias de ellas a un mismo anticuerpo. Además, la biotina presenta una muy alta afinidad por la estreptavidina, lo que unido a lo anterior, posibilitará que la señal resultante se amplifique considerablemente (Abyntek, 2016)

La interpretación de la expresión de la inmunohistoquímica se realiza generalmente de forma cualitativa y subjetiva, mientras que la cuantificación se considera de poca o ninguna importancia. Con frecuencia, una decisión de diagnóstico se basa en la presencia celular o la ausencia de una molécula en particular (Matos LL et al., 2010).

III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha encontrado que *Eh* es capaz de invadir diversos tejidos generando diferentes tipos de amibiasis como son: amibiasis hepática, amibiasis pulmonar, amibiasis renal y amibiasis epitelial así como la interacción que presenta cuando entra en contacto con el sistema inmune donde participan los macrófagos. Sin embargo no se cuenta con estudios que nos permitan dilucidar de manera más específica la susceptibilidad de estos tipos de células ante los mecanismos de daño que está empleando *Eh*, particularmente ante la presencia del amiboporo, molécula que se piensa tiene una participación relevante en la patogenicidad del parásito. La amibiasis es una de las principales enfermedades en México y en el mundo, motivo por el cual se decidió realizar el siguiente trabajo.

IV.- HIPÓTESIS

Eh es un parasito capaz de destruir células de diferentes tejidos debido a los diversos mecanismos de muerte que posee. Por lo tanto si se conincuba con células de tejido que infecta provocará que su viabilidad disminuya en gran proporción.

V.- OBJETIVOS

1.- Objetivo general:

Determinar el índice de mortalidad por *Eh* y la presencia de amiboporo en las membranas de diferentes células blanco a diferentes períodos de coincubación.

2.- Objetivos particulares:

- Analizar la viabilidad de macrófagos de la línea celular RAW, macrófagos peritoneales, macrófagos diferenciados de médula ósea, células HeLa, células HEp-2, células HepG2, células A549 y células Vero coincubadas con trofozoítos de *Eh* a tiempos de una, dos y tres horas.
- Determinar la presencia de amiboporo por medio de la técnica de inmunocitoquímica en macrófagos de la línea celular RAW, macrófagos peritoneales, macrófagos diferenciados de médula ósea, células HeLa,

células HEp-2, células HepG2, células A549 y células Vero coincubadas con trofozoítos de *Eh*.

VI.- METODOLOGÍA

1.-Cultivo de líneas celulares

En el presente trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares: RAW, macrófagos peritoneales, macrófagos diferenciados de médula ósea, HeLa, HEp-2, HepG2, A549 y Vero. Estas células se mantuvieron en cultivo de la siguiente manera, se crecieron en cajas para cultivo celular de 25 cm² con diferentes medios de cultivo (Tabla 1) a 37.5 °C con 5% de CO₂. Cuando las células se encontraron al 80% de confluencia eran recuperadas para iniciar un cultivo nuevo. Para los pases de cultivo, se colocaron 3 mL de PBS estéril para enjuagar las células que se encontraban adheridas en las cajas, posteriormente se añadieron 2 mL de tripsina y se dejaron reposar las células por aproximadamente 6 minutos a 37.5 °C con 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo las células desprendidas por efecto de la tripsina fueron recuperadas en un tubo cónico de 15 mL estéril, después la suspensión celular fue centrifugada a 1200 rpm por 3 min, desechándose el sobrenadante. Para eliminar el excedente de tripsina, las células fueron lavadas con 3 mL de PBS estéril, posteriormente se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en 5 mL del medio de cultivo como se describe en la Tabla 1. Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer con azul tripán al 0.4% como marcador vital. Por último, se sembraron las células en una nueva caja de cultivo de 25 cm² a una densidad de 500 mil células en 5 mL de medio de cultivo.

Línea celular	Medio de cultivo
RAW	DMEM 10 % SFB
Macrófagos diferenciados de médula ósea	RPMI 10% SFB
Macrófagos peritoneales	RPMI 10% SFB
HeLa	DMEM 10% SFB
HEp-2	DMEM 5% SFB
HepG2	DMEM 10% SFB
A549	DMEM 10% SFB
Vero	DMEM 10% SFB

Tabla 4. Medios de cultivo empleados para el mantenimiento de diferentes líneas celulares.

2.- Obtención de amibas

Los trofozoítos de *Eh* de la cepa HM1:IMSS fueron cultivados axénicamente en medio de cultivo TY1-S-33 a 37 °C. Las amibas eran cosechadas en su fase logarítmica de crecimiento, la cual generalmente fue obtenida a las 72 horas de cultivo. Para facilitar su desprendimiento, las células se mantuvieron a 4°C por 5 minutos con el fin de eliminar su adherencia a la caja de cultivo. La suspensión celular de los trofozoítos se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Las células fueron lavadas con PBS-A para eliminar el excedente del medio de cultivo. Posteriormente las células fueron resuspendidas en medio de cultivo fresco y fueron contadas con una cámara de Neubauer con azul tripán al 0.4% como marcador de viabilidad, para la realización de los ensayos.

3.- Ensayos para el monitoreo de la viabilidad de las células

Para el análisis de la viabilidad de las células, se coincubaron los trofozoítos con los distintos tipos celulares en las siguientes proporciones 1:10, 1:25 y 1:50 (trofozoíto/línea celular) por 1, 2 y 3 horas a 37 °C. Posteriormente se determinó el porcentaje de muerte por exclusión de células vivas y muertas utilizando azul tripán al 0.4% como marcador de viabilidad.

4.- Análisis estadístico

Se realizó una prueba no paramétrica (Kruskal Wallis) a los resultados obtenidos de las diversas líneas celulares empleando el programa GraphPad Prism 7.02, con una *($p \leq 0.05$), **($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$).

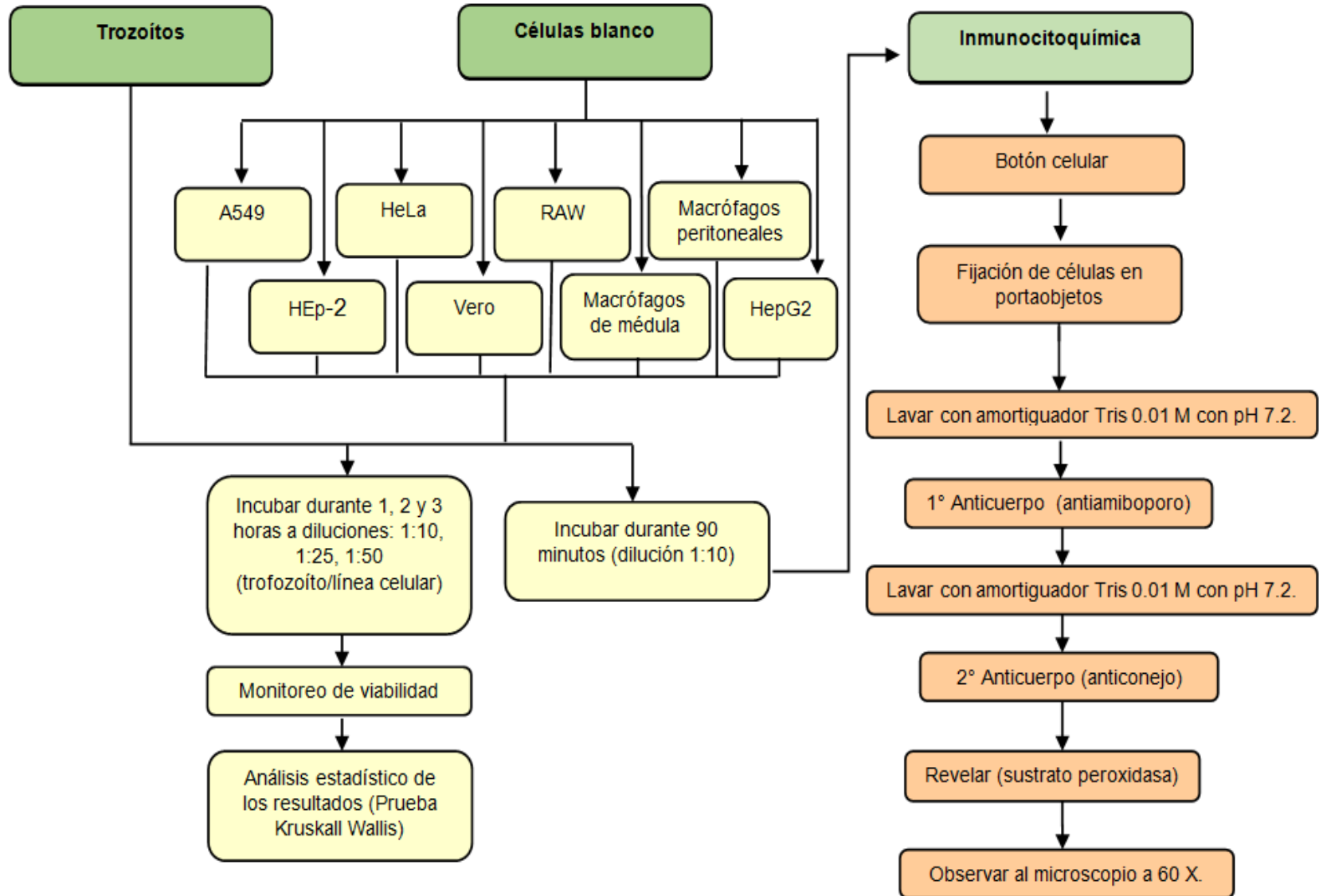
5.- Inmunocitoquímica

Para la determinación de la presencia de amiboporo en la coincubación de los trofozoítos con las líneas celulares, se realizó la técnica de inmunocitoquímica utilizando anticuerpo anti-amiboporo obtenido de un suero de conejo. Para la realización de la técnica se utilizó únicamente la condición de 1:10 trofozoíto: línea celular (condición donde se observó el mayor efecto de inducción de muerte). La incubación se detuvo a los 90 minutos de interacción, posteriormente se concentraron las células centrifugando a 1200 rpm durante un período de 3 minutos y se desechó el sobrenadante. Las células fueron lavadas nuevamente con 500 μ L de PBS durante otros 3 minutos para eliminar el excedente de medio de cultivo y finalmente fueron resuspendidas en 50 μ L de PBS. Se colocaron 100 μ L de las distintas muestras en cada uno de los portaobjetos (1. Línea celular-antiamiboro, 2. Amiba-antiamiboporo, 3. Control primario-antiamiboro y 4. Control secundario-anticonejo) y se dejaron secar a temperatura ambiente para posteriormente fijar con 10 mL de acetona fría. Después, se inhibió la actividad de peroxidasa presente en las muestras con metanol-peroxidasa al 3%. Se procedió a lavar tres veces con amortiguador Tris 0.01 M con pH de 7.2 y se dejó incubar con el anticuerpo primario (anti-amiboporo) en una dilución 1:200 (1 μ g/ml) durante un día. Una vez transcurrido el tiempo indicado las muestras fueron lavadas tres veces con amortiguador Tris 0.01 M con pH de 7.2 y se dejó incubando con

anticuerpo secundario (anti-conejo acoplado a biotina) por un período de 30 min en una dilución 1:1000 (1 µg/ml) y después se incubó con estreptavidina por 30 minutos. Para evaluar el marcaje se tomaron fotos utilizando un microscopio marca Carl Zeiss modelo Axioimager M1 cámara AxioCam MRc5.

El amiboporo empleado para fines del presente trabajo, fue donado por el Dr. Augusto José González Canto quién purificó y produjo anticuerpos anti-amiboporo en conejo como se menciona en su tesis de maestría "*Localización del amiboporo Entamoeba histolytica en abscesos hepáticos amibianos en hámsters*".

VII. DIAGRAMA DE FLUJO



VIII.- RESULTADOS

1.- Análisis de la viabilidad de línea celular HepG2 incubados con trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y presencia de amiboporo

Se observó que las células HepG2 morían en presencia de los trofozoítos y que su viabilidad disminuyó conforme paso el tiempo de coincubación y conforme se disminuyó el número de células de HepG2 por trofozoítos, observándose mayor efecto en la relación 1:10 (1 trofozoíto por 10 células de HepG2) al tiempo de 3 h, obteniendo un porcentaje de viabilidad de 85.1% (Figura 3A), con lo que respecta al marcaje del amiboporo se pudo apreciar una coloración café marcada alrededor de las células blanco, en algunas el marcaje se observó en toda su periferia. (Figura 4B).

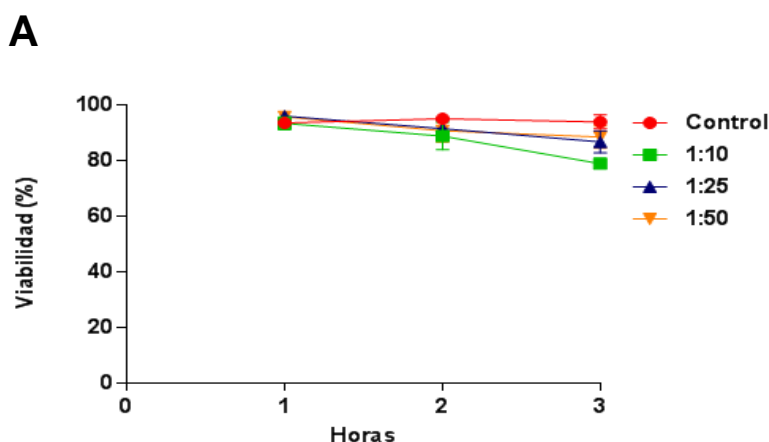


Figura 3. Cuantificación de la viabilidad en células HepG2 incubadas en presencia de trofozoítos. Viabilidad de células HepG2 incubadas con trofozoítos de *Eh*, se muestra en A. Los puntos de la cinética en las gráficas representan los datos de 5 experimentos independientes, se muestra la media \pm la desviación estándar. * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$). Nota: Para esta línea celular no se aprecia diferencia significativa entre ensayos.

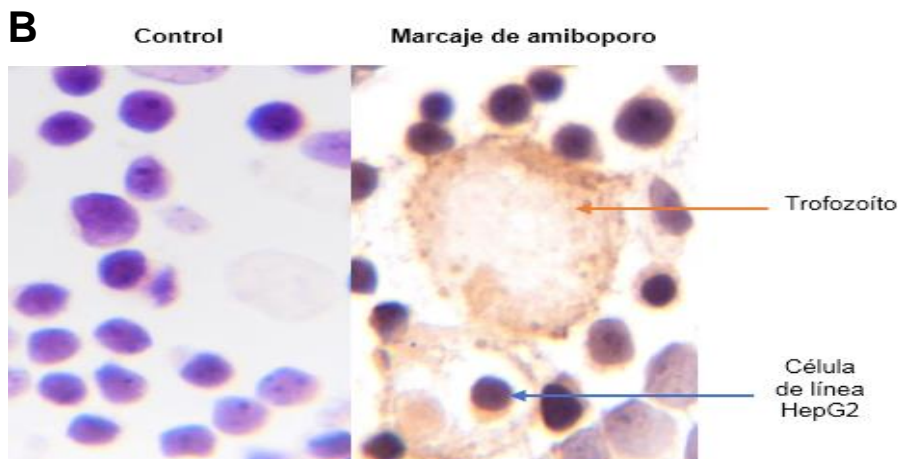


Figura 4. Presencia de amiboporo en las células HepG2 incubadas con trofozoítos. Marcaje de amiboporo en la muestra de células HepG2 incubadas con trofozoítos de *Eh* en relación 1:10 en B, en el lado izquierdo del panel de fotos se observa el control negativo (células HepG2 sin trofozoítos), del lado derecho se muestra la presencia de amiboporo en color café. Las fotos fueron tomadas a un aumento de 60 X en campo claro.

2.- Análisis de la viabilidad de macrófagos incubados con trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y presencia de amiboporo

Se observó que los macrófagos de las diferentes estirpes celulares que fueron incubados con los trofozoítos morían en diferentes proporciones, el menor índice de viabilidad obtenido fue en la relación 1:10 al tiempo de 3 h, obteniendo el menor porcentaje de viabilidad para la línea celular RAW con un valor de 42.9% (Figura 5C), seguido de los macrófagos derivados de médula ósea con el 58.3 % (Figura 5D) y por último los macrófagos peritoneales con el 73.4% (Figura 5E), en cuanto a la presencia de amiboporo, se pudo apreciar mayor coloración café en la línea celular RAW (Figura 6F), mientras que para resto de los estirpes celulares la presencia de amiboporo es apreciada con menor coloración café en comparación con la línea celular RAW (Figura 6G y 6H) .

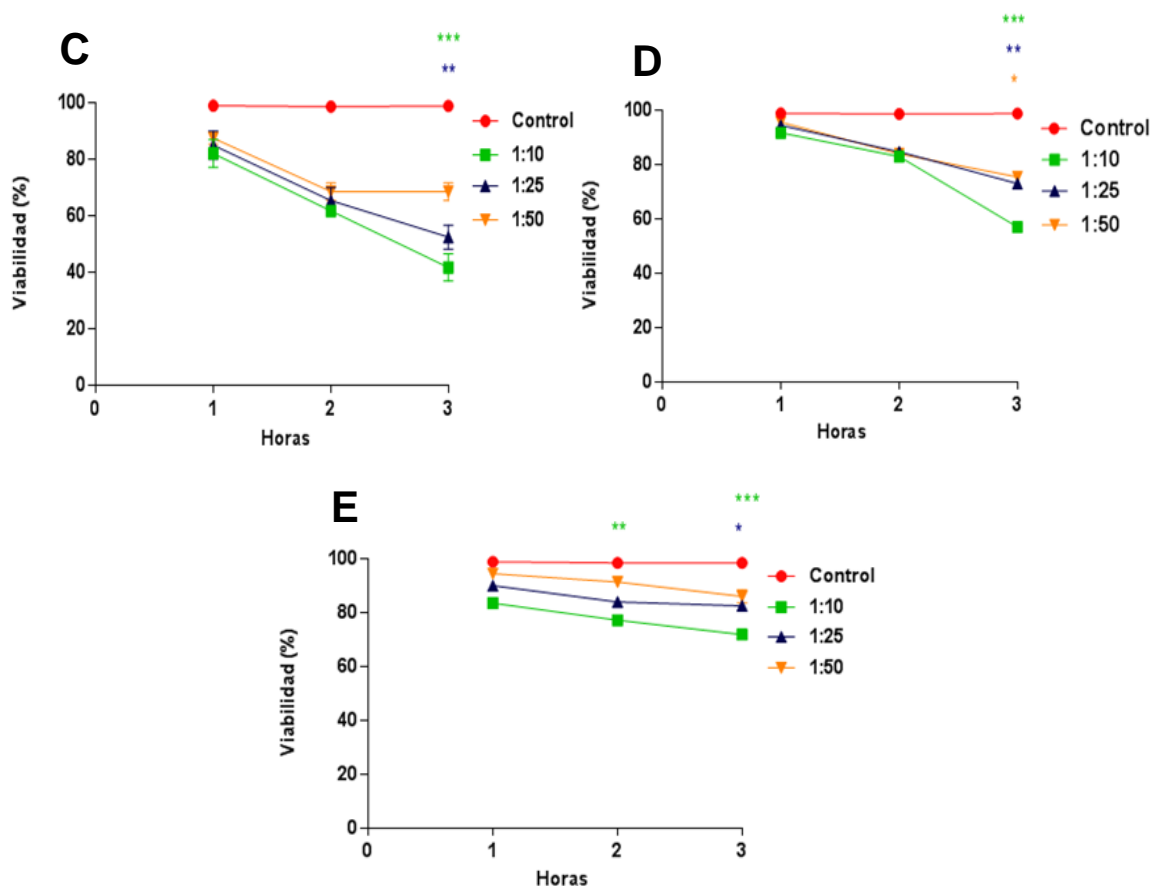


Figura 5. Cuantificación de la viabilidad en macrófagos incubados en presencia de trofozoítos. Viabilidad de los macrófagos incubados con trofozoítos de *Eh*, se muestra en la fig. C macrófagos de línea celular RAW, en la fig. D macrófagos diferenciados de precursores de médula ósea y en la fig. E macrófagos peritoneales. Los puntos de la cinética en las gráficas representan los datos de 5 experimentos independientes, se muestra la media \pm la desviación estándar. * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$).

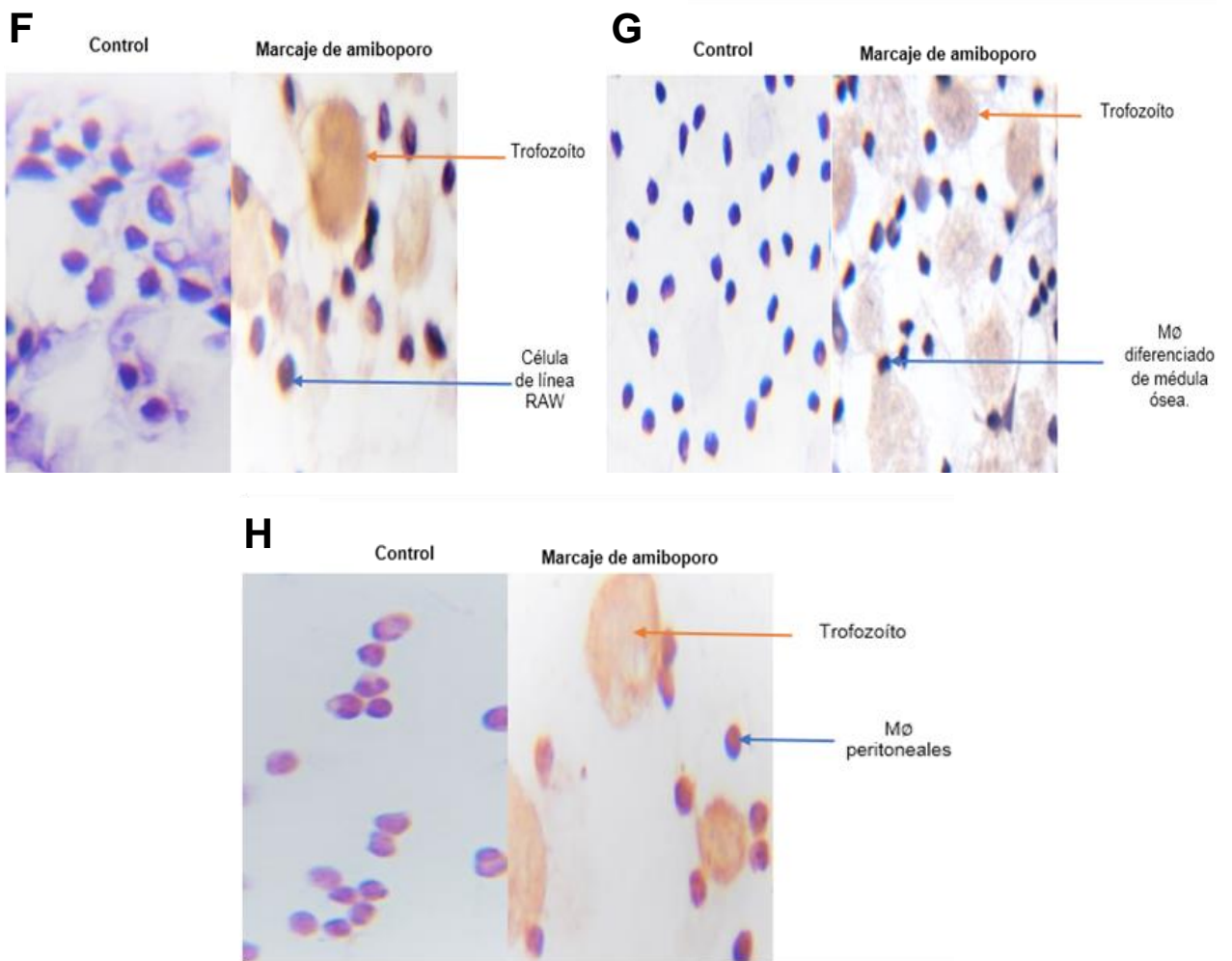


Figura 6. Presencia de amiboporo en macrófagos incubados con trofozoítos. Marcaje de amiboporo en las muestras de las diferentes líneas celulares de macrófagos incubadas con trofozoítos de *Eh* en relación 1:10 fig. (F, G, H), en el lado izquierdo de cada panel de fotos se observa el control negativo (macrófagos sin trofozoítos), del lado derecho se muestra la presencia de amiboporo en color café. Las fotos fueron tomadas a un aumento de 60 X en campo claro.

3.- Análisis de la viabilidad de las líneas celulares HeLa y HEp-2 (no axénica) incubados con trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y presencia de amiboporo

Se observó que en las líneas celulares HeLa y HEp-2 su índice de viabilidad fue disminuyó de acuerdo al paso del tiempo, encontrando al igual que en las líneas celulares anteriores, el mayor efecto en la proporción 1:10 al tiempo de 3 h, obteniendo un valor de viabilidad para las células HeLa de 61.4% (Figura 7I) y para las células HEp-2 un valor de 88.9% (Figura 7J). La presencia de amiboporo se pudo apreciar con una coloración café similar en ambas líneas celulares (Figura 8K y 8L).

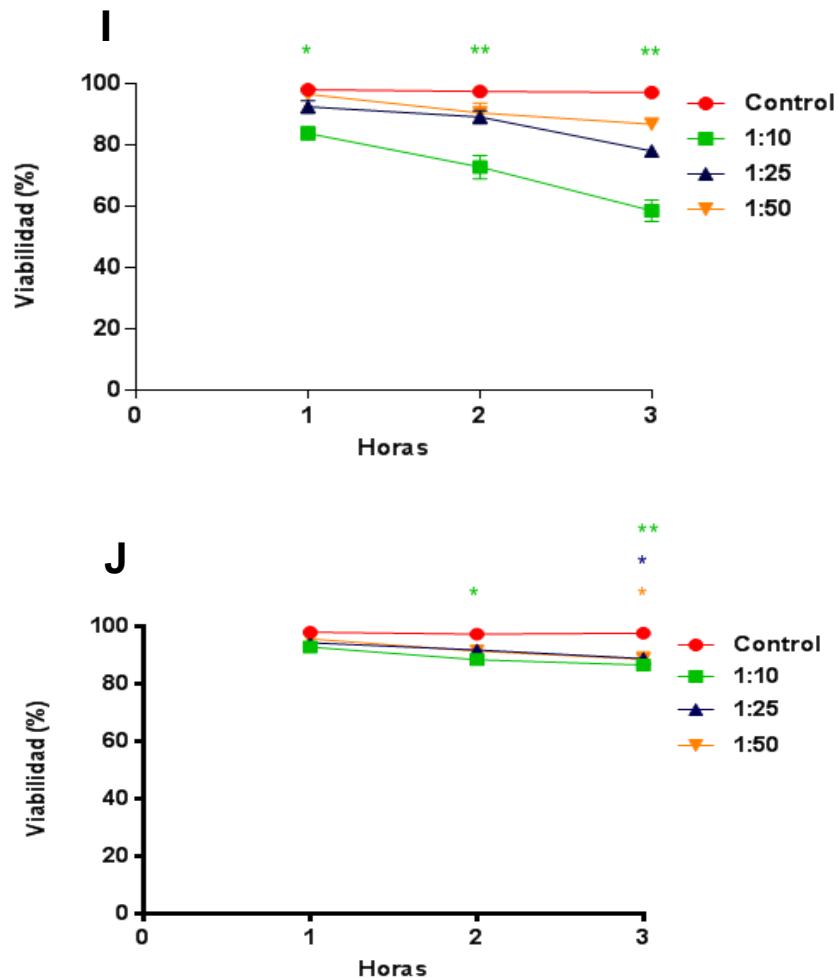


Figura 7. Cuantificación de la viabilidad en células HeLa y HEp-2 incubados en presencia de trofozoítos. Viabilidad de las células HeLa y HEp-2 incubadas con trofozoítos de *Eh*, se muestran en I y J respectivamente. Los puntos de la cinética en las gráficas representan los datos de 5 experimentos independientes, se muestra la media \pm la desviación estándar. * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$).

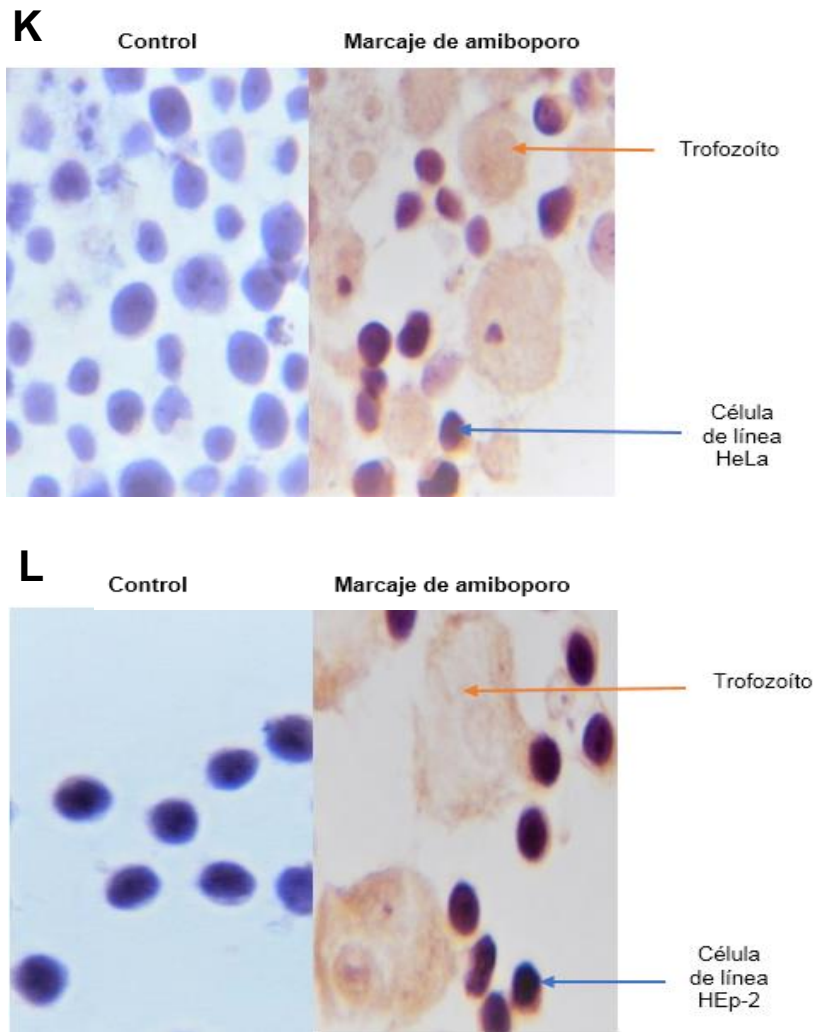


Figura 8. Presencia de amiboporo en células HeLa y HEp-2 incubados con trofozoítos. Marcaje de amiboporo en las muestras de las diferentes líneas celulares, HeLa y HEp-2 incubadas con trofozoítos de *Eh* en relación 1:10 fig. (K, L) respectivamente, en el lado izquierdo del panel de fotos se observa el control negativo (células HeLa y HEp-2 sin trofozoítos), del lado derecho la presencia de amiboporo en color café. Las fotos fueron tomadas a un aumento de 60 X en campo claro.

4.- Análisis de la viabilidad de la línea celular A549 incubados con trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y presencia de amiboporo

Se observó que las células A549 morían en gran proporción en presencia de los trofozoítos observándose el menor porcentaje de viabilidad en la relación 1:10 al tiempo de 3 h, con un valor de 41.6 % (Figura 9M), por otra parte el marcaje de amiboporo se observó con una coloración café intensa alrededor de las células A549 (Figura 10N).

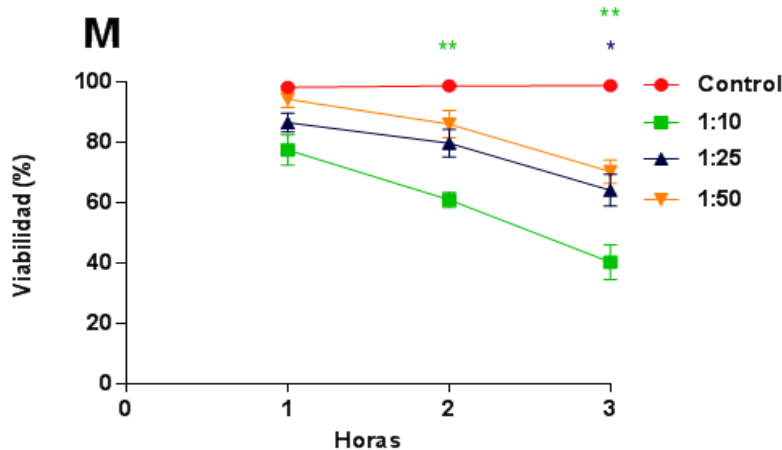


Figura 9. Cuantificación de la viabilidad en células A549 incubadas en presencia de trofozoítos. Viabilidad de células A549 incubadas con trofozoítos de *Eh*, se muestra en M. Los puntos de la cinética en las gráficas representan los datos de 5 experimentos independientes, se muestra la media \pm la desviación estándar. * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$).

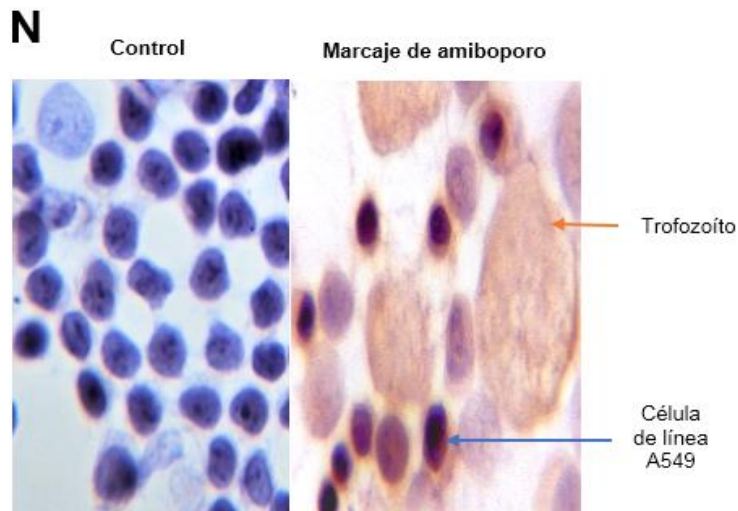


Figura 10. Presencia de amiboporo en células A549 incubadas con trofozoítos. Marcaje de amiboporo en la muestra de células A549 incubadas con trofozoítos de *Eh* en relación 1:10 en N, en el lado izquierdo del panel de fotos se observa el control negativo (células A549 sin trofozoítos), del lado derecho se muestra la presencia de amiboporo en color café. Las fotos fueron tomadas a un aumento de 60 X en campo claro.

5.- Análisis de la viabilidad de la línea celular Vero incubados con trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y presencia de amiboporo

Se obtuvo el menor índice de viabilidad en la proporción 1:10 al tiempo de 3 h, con un valor del 81.5% (Figura 11O), para la presencia de amiboporo se observó un coloración café de color claro en las membranas de las células blanco (Figura 12P).

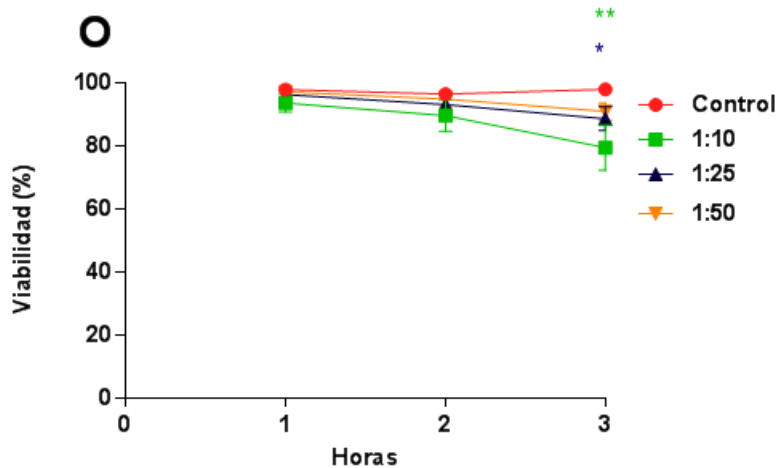


Figura 11. Cuantificación de la viabilidad en células Vero incubados en presencia de trofozoítos. Viabilidad de células Vero incubadas con trofozoítos de *Eh*, se muestra en O. Los puntos de la cinética en las gráficas representan los datos de 5 experimentos independientes, se muestra la media \pm la desviación estándar. * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$).

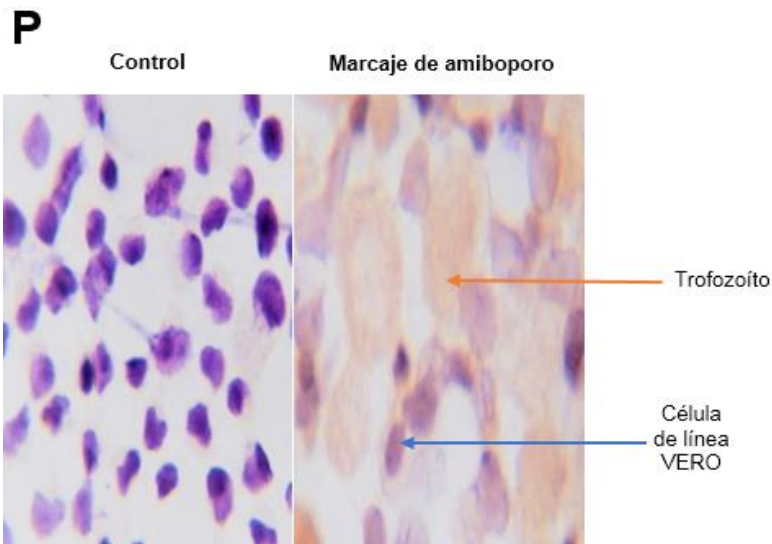


Figura 12. Presencia de amiboporo en células Vero incubadas con de trofozoítos. Marcaje de amiboporo en la muestra de células Vero incubadas con trofozoítos de *Eh* en relación 1:10 en (P), en el lado izquierdo del panel de fotos se observa el control negativo (células Vero sin trofozoítos), del lado derecho se muestra la presencia de amiboporo en color café. Las fotos fueron tomadas a un aumento de 60 X en campo claro.

6.- RESUMEN DE LOS RESULTADOS

Se observó que todas las células empleadas presentaron marcaje en su membrana celular, mientras que para el índice de mortalidad se encontró que las células con el mayor porcentaje de mortalidad fueron las A549 con un valor de 58.4 % y las de menor porcentaje fueron las células HEp-2 con el 11.1 %.

Línea celular	Presencia de amiboporo	% Mortalidad Dilución 1:10 a 3 horas
A549	Si	58.4
RAW	Si	57.1
Macrófagos diferenciados de médula ósea	Si	41.7
HeLa	Si	38.6
Macrófagos peritoneales	Si	26.6
Vero	Si	18.5
HepG2	Si	14.9
HEp-2	Si	11.1

Tabla 5. Se muestran las líneas celulares en orden descendente de acuerdo al porcentaje de mortalidad obtenido en la proporción 1:10 en el período de tres horas, así como un apartado indicativo de la presencia de amiboporo en la membrana de las diferentes líneas celulares.

IX.- DISCUSIÓN

Se ha observado que las amibas causan daño en diversos tejidos y afectan a distintos tipos celulares como son: los neutrófilos, los linfocitos T, los macrófagos y algunas líneas de tejidos (Ralston & Petri, 2011). Por lo que en este trabajo se decidió estudiar la interacción de los trofozoítos de *Eh* con los diferentes tipos celulares, así como la susceptibilidad de dichas células ante la presencia de la amiba y la posible contribución del amiboporo en su muerte.

En cuanto a la interacción de las amibas con las distintas líneas celulares, se encontró que el índice de viabilidad disminuye a mayor tiempo de coincubación con los trofozoítos y a mayor presencia de éstos. Además se pudo observar que las amibas tenían interacción con las células estudiadas sugiriendo la posibilidad del beso de la muerte. Algunos autores han demostrado que dicho “beso” es necesario para la inducción de muerte por las amibas y que la muerte es mediada por distintas vías, como son: la fagocitosis, la inducción de destrucción celular mediante proteasas de cisteína, la citotoxicidad mediada por lectinas y la inducción de poros en la membrana por el amiboporo entre otros factores (Garza et al., 1982; Shibayama & Tsutsumi ,2013; Pérez et al., 2006). En cuanto a la muerte inducida por el amiboporo, si bien no se realizó alguna prueba o técnica para determinar que la muerte de las células empleadas fue generada directamente por él, se pudo observar que éste fue dirigido a las células de las distintas estirpes celulares estudiadas, lo cual aunado a nuestros resultados de la disminución de viabilidad podría sugerir que uno de los mecanismos de inducción de muerte es el amiboporo que actuaría induciendo poros líticos (Shibayama & Tsutsumi,2013; Garza et al.,1982).

En este trabajo como ya se mencionó anteriormente se estudió la muerte inducida por amibas en distintos tipos celulares, donde se esperaba que cada estirpe celular tuviera distinta susceptibilidad a lisis inducida por los trofozoítos. Primero se analizaron las células HepG2 las cuales son hepatocitos, cabe resaltar que los hepatocitos constituyen más del 80% del volumen hepático (ATTC, 2018; Claria & Titos, 2004). Se observó que las células HepG2 fueron bastante resistentes a la muerte inducida por la amiba, este hecho es interesante, ya que la amibiasis causa absceso hepático, donde se observa gran lisis celular. Cabe resaltar que un factor de riesgo en el absceso hepático es el alcoholismo lo cual podría inducir estrés en las células hepáticas, facilitando la inducción de la muerte celular en los hepatocitos por la amiba en el absceso hepático (Castillo et al., 2014). Adicionalmente, se ha demostrado que en hígados con absceso hepático hay áreas de daño y áreas sin daño con presencia de trofozoítos en ambos casos, relatando el hecho de que los hepatocitos en las áreas sin daño se encuentran junto con los trofozoítos y no presentan signos de muerte celular (Ventura et al.,

2003). Lo cual sugiere que el hepatocito podría presentar cierta resistencia a la muerte inducida por la amiba.

Por otra parte también se estudiaron los macrófagos debido a que en todos los sitios de invasión por *Eh* son células presentes que tratan de atacar a la amiba con especies reactivas de oxígeno, sin embargo la amiba logra evadir dichos mecanismos para finalmente inducir la muerte de estas células (Nakada & Nozaki, 2016). Se observó que los macrófagos de línea celular y los derivados de médula ósea presentaron mayor susceptibilidad a la muerte que los macrófagos peritoneales. Esto puede deberse al tamaño celular de dichos macrófagos, aunque no hay estudios comparativos de todos los estirpes celulares de macrófagos, en la literatura se ha descrito que los macrófagos peritoneales son más grandes que los macrófagos diferenciados de la médula ósea (Wang et al., 2013). Se ha descrito que el tamaño es crítico en el tiempo de inducción de muerte por lisis en otros modelos, por ejemplo en bacterias se sabe que el tiempo de inducción de lisis por bacteriófagos depende del tamaño de dichas bacterias, siendo necesario mayor tiempo para células más grandes (Ryan & Rutenberg, 2007). Lo cual podría sugerir que la resistencia observada por los macrófagos peritoneales a la muerte por la amiba solo sea cuestión de tiempo para ser abatida.

Se estudió la muerte inducida en células epiteliales de cérvix de las líneas celulares HeLa y HEP-2 (ATTC, 2003). Se encontró que ambas líneas celulares son susceptibles a la muerte inducida por amibas, notándose que las células HeLa disminuyen su índice de viabilidad aproximadamente tres veces más rápido que las células HEP-2. Se ha reportado que las proteasas de cisteína purificadas de *Eh* tienen efecto citopático sobre monocapas de células HeLa (Pérez et al., 2006), llevándonos a sugerir que sea este el motivo por el cual HeLa presenta muerte ante la presencia de *Eh*. Aunque no se encuentra reportado en la literatura se sugiere que el motivo por el cual HEP-2 presente mayor resistencia a la amibiasis pueda deberse a que no es axénica y le esté confiriendo algún tipo de resistencia. Sería interesante en un futuro realizar más ensayos para comprender mejor este mecanismo y poder visualizar de manera exacta a que se debe la diferencia en índice de viabilidad.

Para las líneas celulares A549 y Vero que provienen de las células epiteliales alveolares y células epiteliales de riñón, respectivamente (ATTC, 2018), se demostró que son susceptibles a la muerte celular inducida por la amiba. Se esperaba gran inducción de muerte de estos estirpes celulares debido a que cuentan con residuos de D-galactosa en sus cilios, la D-galactosa es un ligando de la galatosa/N-acetil D-galactosamina utilizado por la amiba para adherirse (Shibayama & Tsutsumi ,2013; Min et al., 2016). Se ha encontrado que las lectinas ciliotóxicas PA-IL y PA- IIL de *Pseudomonas aeruginosa* se unen a él epitelio ciliado de las vías aéreas humanas, probablemente en residuos de D-galactosa y L-Fucosa, provocando la inmovilización de los cilios (Mewe et al.,2005) y facilitando así la invasión por el microorganismos, sin embargo, se observó resistencia por células Vero a la inducción de muerte por la amiba.

Y finalmente pudimos observar que *Eh* es capaz de generar la muerte de diversas líneas celulares en diferentes proporciones, parece ser que su inducción de muerte depende de muchos factores siendo este proyecto un comienzo para seguir investigando los mecanismos de muerte de la amiba, un parásito de gran importancia medica debido a su gran índice de morbilidad y mortalidad en el mundo.

X.- CONCLUSIONES

- Las líneas celulares con mayor índice de mortalidad a un tiempo de evaluación de 3 horas y a una proporción de 1:10 son: A549, RAW y macrófagos derivados de médula ósea con un valor de 58.4 %, 57.1 % y 41.7 % respectivamente.
- El amiboporo se fija a la membrana de todas las líneas celulares estudiadas, observando el marcaje con mayor coloración en la línea celular A549 seguido de HepG2 y HEp-2.

XI.- Referencias

1. Abyntek (2016), España Disponible en: <http://www.abynetek.com/guia-sobre-la-conjugacion-de-anticuerpos/>
2. Álvarez J.(2013).Henrietta Lacks: El nombre detrás de las células HeLa, primera línea celular inmortal humana. *Medicina Clinica*,24(4),726-729.
3. Ammerman NC., Beier-Sexton M., Azad AF.(2008). Growth and maintenance of Vero cell lines.
4. Andra J., Berninghausen O., Wiilfken J. & Leippe M. (1996). Shortened amoebapore analogs with enhanced antibacterial and cytolytic activity. *Letters*, 49(3), 96-100.
5. ATTC, A549,(2018). Credible leads to Incredible (México). Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/CCL-185.aspx#characteristics>
6. ATTC, HeLa, (2003). Credible leads to Incredible (México). Disponible en:<https://www.atcc.org/products/all/CCL-2.aspx#characteristics>
7. ATTC, HEP-2, (2003). Credible leads to Incredible (México). Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/CCL-23.aspx#characteristics>
8. ATTC, HEPG2, (2018). Credible leads to Incredible (México). Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/HB-8065.aspx#characteristics>
9. ATTC, RAW, (2002). Credible leads to Incredible (México). Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/tib-71.aspx#characteristics>.
10. ATTC, Vero, (2003). Credible leads to Incredible (México). Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/CCL-81.aspx#characteristics>
11. Berrueta T.(2019).Recursos en Parasitología. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibiasis.html>
12. Bruhn H., Riekens B., Berninghausen O. & Leippe M. (2003). Amoebapores a NK-lysin, members of a class of structurally distinct antimicrobial and cytolytic peptides from protozoa and mammals: a comparative functional analysis. *Biochemical Society*, 11(1), 737-744.
13. Cardona, N. & Sánchez, M.(2005). Evaluación de la capacidad de invasión de serovariedades de Sallmonella. *CES MEDICINA*, 19(2), 6-17.

14. Carrera L., Pirajan I., Urrea M., Gómez M., Monroy L. & Sánchez R. (2015). Comparación de cultivo celular HeLa y HEp-2: Perspectivas de estudios con *Chlamydia trachomatis*. *NOVA*, 12(21), 17-29.
15. Castillo R., Hernández A., Hernández, J., Méndez A., Soria M. & Zavaleta N. (2014). Guía de Práctica Clínica: Diagnóstico y Tratamiento del Absceso Hepático Amibiano no Complicado. *Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica: IMSS 282-10*, 1(2), 2-40.
16. Claria J. & Titos E. (2004). La célula de Kupffer. *Gastroenterol Hepatol*, 27(4), 264-273.
17. Cooper J. (2012). Cell Line Profile A549. *Public Health England*. 1(1). 1-2.
18. Cooper J., Abdullatif M., Burnett E., Kempself K., Conforti F., Tolley H. & Davies D. (2016). Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype. *PloS one*, 11(10), 1-20.
19. Cornejo P. & Avilés A. (2003). Enfermedades Infecciosas y Microbiología, 23 (1), 23-26.
20. Cornick S. & Chadee K. (2017). Entamoeba histolytica: Host parasite interactions at the colonic epithelium. *Tissue barriers*, 5(1), 1-28.
21. Cornick S., Moreau F., & Chadee K. (2016). Entamoeba histolytica Cysteine Proteinase 5 Evokes Mucin Exocytosis from Colonic Goblet Cells via $\alpha\beta 3$ Integrin. *PLoS pathogens*, 12(4), 1-24.
22. Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud del Gobierno Federal. (2018). Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2017/principales/nacional/grupo_edad.pdf
23. Dosne C. (2006). Las células HeLa como prototipo del cultivo celular inmortalizado. *Medina*, 66(5), 487-488.
24. Elhelu M. A. (1983). The role of macrophages in immunology. *Journal of the National Medical Association*, 75(3), 314-7.
25. Garza D., Bracho F., Bessoudo D., Sepúlveda S. & Cruz M. (1982). II ¿Son todas las amibas invasoras?. *La ciencia para todos*, 2(1).
26. Gautam G., Ali M., Bhattacharya A., & Gourinath S. (2019). EhFP10: A FYVE family GEF interacts with myosin IB to regulate cytoskeletal dynamics

- during endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *PLOS PATHOGENS*, 15(2), 1-26.
27. Girón I. (2011). Hepatic Amoebic Abscess: A cases presentation. *Facultad de Ciencias Médicas de Honduras*, 8(2).52-57.
 28. Gómez J., Cortés J., Cuervo S. & López M. (2007). *Amibiasis Intestinal. Asociación Colombiana de Infectología*, 11(1), 36-45.
 29. Gomila B., Toledo R. & Sanchis E. (2011). Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 29(3), 20-28.
 30. González Vázquez M.C., Carabarin Lima A., Baylon Pacheco L. y Rosales Encina J.L. (2012). De amibas y amibiasis: *Entamoeba histolytica*. *Elementos*, 87(1):13-18.
 31. Gordon S., Tylor R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, 5(1), 953-964.
 32. Gordon S., y Martinez-Pomares L. (2017). Papeles fisiológicos de los macrófagos. *Revista europea de fisiología*, 469 (34), 365-374.
 33. Gutiérrez G. (1987). Investigaciones mexicanas sobre vacunas. *Amibiasis. Epidemiología*, 2(1) ,125-133.
 34. Hecht O., Van Nuland, N.A., Schleinkofer K., Dingley A.J., Bruhn H., Leippe M. & Grotzinger J. (2004). Solution structure of the pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17-41.
 35. Hilario E.(2004). Morfología del cérvix uterino. *Symposium Internacional sobre Regulación Natural de la Fertilidad Aplicaciones a la Salud Reproductiva*, 1-6.
 36. Huston CD, Haque R, Petri WA. (1999). Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Exp Rev Mol Med*; 22.
 37. Iáñez E. (1999). Curso de inmunología. Disponible en: https://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_02.htm
 38. Innoprot.(2017). Linterna Cell Lines: Green Fluorescent HepG2 Cells. *Inovative Technologies in Biological Systems*.1-2.
 39. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, México 2015. Disponible en: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Entamoeba%20histolytica%202016.pdf>

40. Kato K., Makiuchi T., Cheng X. & Tachibana H. (2017). Comparison of hemolytic activity of the intermediate subunit of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* lectins. *PloS one*, 12(7), 1-16.
41. Lambris D. (2007). Current Topics In Innate Immunity. Advances in experimental medicine and biology, Pennsylvania, Philadelphia. Springer, 598(1), 64.
42. Lee Y., Min A. & Heyon M. (2018). O-deGlcNAcylation is required for *Entamoeba histolytica*-induced HepG2 cell death. *Microbial Pathogenesis*, 12(3), 285-295.
43. Leippe M. (1997). Amoebapores. *Parasitology Today*, 3(5), 178-183.
44. Malaki M. (2014). Acute renal failure following *Entamoeba histolytica* treatment in a 9-year-old girl. *Ann Trop Med Public Health*, 7(1), 55-70.
45. Martínez-Palomo A. (1989). Amibiasis. Editorial Médica Panamericana.
46. Matos LL, Trufelli DC, de Matos MG, da Silva Pinhal MA. (2010). Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark Insights*, 5(1), 9-20.
47. Mewe M., Tielker D., Schönberg R., Schachner M., Jaeger K. & Schumacher U. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lectins I and II and their interaction with human airway cilia. *J Laryngol Otol*, 119(8): 595-599.
48. Mesa C., Muñoz D., Echeverry M., Velez I., Robledo S. (2010). Susceptibilidad *in vitro* a infección por *Leishmania* y sensibilidad a medicamentos difiere según tipo de macrófagos. *ALUD UIS*, 2(1), 200-211.
49. Meza I., (2011). Presencia de bacterias modifican la virulencia de amibas: Cinvestav. *Divulgación y Cultura Científica Iberoamericana*. Disponible en: https://www.oei.es/historico/divulgacioncientifica/noticias_559.htm
50. Min X., Feng M., Guan Y., Man S., Fu Y., Cheng X. & Tachibana H. (2016). Evaluation of the C-Terminal Fragment of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc Lectin Intermediate Subunit as a Vaccine Candidate against Amebic Liver Abscess. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(1), 1-17.
51. Mora M., Zerpa C. (1992). *Entamoeba histolytica*: un desafío vigente. *Salud Pública de México*, 34(3), 335-341.
52. Nakada K. & Nozaki T. (2016). Immune Response of Amebiasis and Immune Evasion by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Immunology*, 175(7), 1-13.

53. Nickel R., Ott, C., Dandekar T. & Leippe M. (1999). Poro-forming peptides of *Entamoeba dispar*: Similarity and divergence to amebopores in structure, expression and activity. *European Journal of Biochemistry*, 265(3):1002-1007.
54. Pérez R., Montfort, I., Olivos A., Ramos E., Nequiz M. & Tello E. (2006). Amibiasis hepática. *Gastroenterol Mex*, 71(2), 49-72.
55. Portillo S.(2014). Las eternas células HeLa el dilema ético de hoy. *Revista Médica de Honduras*, 82(4),164-167.
56. Quach J., St-Pierre J., & Chadee K. (2014). The future for vaccine development against *Entamoeba histolytica*. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(6), 1514–1521.
57. Ralston K.,& Petri W. (2011). Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends in parasitology*, 27(6), 254-263.
58. Ramirez O., Godinez R., Morales J., Gómez L., Gutiérrez M., Zuñiga E. y Olayo R.(2012). Superficies Modificadas Mediante Polimerización por Plasma Para Cocultivos de Modelos Hepáticos. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 33(2),127-135.
59. Rodríguez R., Carbajal R., Zarco J., Perea A., Pérez L., Lizarraga S., Bernal, M. & Campos T. (2010). Absceso hepático amibiano complicado con ruptura intraabdominal y torácica. *Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 14(94), 64-68.
60. Romero, R. (2008). Amibiasis en el siglo XXI. México, D.F, IDISA, 1era Edición, pp: 11-222.
61. Ryan G. & Rutenberg A.(2007). Clocking Out: Modeling Phage-Induced Lysis of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 189(13).4749-4755.
62. Saavedra E., Olivos A. (2017). Amibiasis. *CIENCIA*, 68(1),14-17.
63. Sánchez B. & Talamas, P.(2002). Importancia de las prostaglandinas en la amibiasis hepática. *Salud Pública de México*, 44(3), 247-257.
64. Sharma, Anuradha et al.,(2005). Amoebic renal cyst: a case report. *Braz J Infectvol*, 9(3), 266-268. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141386702005000300011&lng=en&nrm=iso. ISSN 1413-8670.

65. Sheets, R.(2000).History and Characterization of the Vero Cell Line. *DRAFT*, 10(5), 1-12.
66. Shibayama M., Tsutsumi V. (2013). Patología de la amibiasis: Factores y causas, *CIENCIA*, 7(1), 34-41.
67. Sierra-López F., Baylón-Pacheco L., Espíritu-Gordillo P., Lagunes-Guillén A., Chávez-Munguía B. & Rosales-Encina J. L. (2018). Influence of Micropatterned Grill Lines on *Entamoeba histolytica* Trophozoites Morphology and Migration. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8(1), 295.
68. Singh A., Banerjee T., Kumar R., Shukla SK. (2019). Prevalence of cases of amebic liver abscess in a tertiary care centre in India: A study on risk factors, associated microflora and strain variation of *Entamoeba histolytica*. *PLOS ONE*, 14(4), 15-20.
69. St-Pierre J., Moreau F., Cornick S., Quach J., Begum S., Fernandez L., Gorman H., Chadee K. (2017). The macrophage cytoskeleton acts as a contact sensor upon interaction with *Entamoeba histolytica* to trigger IL-1 β secretion. *PLoS pathogens*, 13(8), 23-35.
70. Taciak B., Białasek M., Braniewska A., Sas Z., Sawicka P., Kiraga Ł., Król M. (2018). Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PloS one*, 13(6), 1-13.
71. The human protein atlas, (2006) Disponible en: <https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunocytochemistry>
72. Ventura J., Jarillo J., Fuentes R., Pineda E., Muñoz A., Madrid L., Campos R. (2003), Human amoebic hepatic abscess: in situ interactions between trophozoites, macrophages, neutrophils and T cells. *Parasite Immunology*, 25(1), 503-511.
73. Wang C., Yu X., Cao Q., Wang Y., Zheng G., Tan T., Zhao H., Zhao Y., Wang T. & Harris D.(2013).Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunology*, 14(6), 1-10.
74. Zhang X., Zhang Z., Alexander D., Bracha R., Mirelman D., & Stanley, S. L. (2004). Expression of amoebapores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not

necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis. *Infection and immunity*, 72(2), 678–683.

75. Zhu H., Min X., Li S., Feng M., Zhang G. & Yi X. (2014). Amebic lung abscess with coexisting lung adenocarcinoma: a unusual case of amoebiasis. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(11), 8251–8254.