



Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

“Análisis del efecto que ejerce la proteína tirosina fosfatasa de *Entamoeba histolytica* en la producción de citocinas en macrófagos a través de los receptores TLR-2 y TLR-4”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Edmundo Axel Juárez Pérez

Directora de tesis: Dra. María Magdalena Aguirre
García



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Vocal: Dra. Miriam Rodríguez Sosa

Secretario: Dra. María Magdalena Aguirre García

1º Suplente: Dra. Elvia Manuela Gallegos Neyra

2º Suplente: Dra. Alma Reyna Escalona Montaña

Este trabajo se realizó gracias al apoyo económico de los proyectos
DGAPA PAPIIT IN220816, SEP-CONACyT 284018 y PAPPIT
IN218619

Cada nuevo amigo que ganamos en la carrera de la vida nos perfecciona y enriquece más aún por lo que de nosotros mismos nos descubre, que por lo que de él mismo nos da. (Miguel de Unamuno)

Facilius est multa facere quam diu – Quintiliano

Agradecimientos

A mi tutora, Dra. María Magdalena Aguirre García por confiar en mi para este proyecto y aceptarme como parte de su equipo.

A la Dra. Alma Reyna Escalona Montaña, gracias por ayudarme en la parte intelectual y técnica a lo largo de este proyecto, por que tu paciencia y amistad permitieron concluir este proyecto de la mejor manera.

A mis sinodales

Dra. Laila Gutierrez Kobeh por facilitarme el material para el cultivo de los macrófagos murinos y la línea celular L929.

Arturo Alfredo Wilkins Rodríguez por darte un tiempo para enseñarme técnicas de laboratorio. El esfuerzo que pones en el laboratorio es contagioso. Sabes transmitir tu conocimiento más que como un profesor, como un amigo que no teme decir lo que piensa.

Adriana Ruiz Remigio, gracias por el tiempo invertido para enseñarme a hacer la técnica de ELISA, por mostrarme que se puede ser muuuy estricto en el laboratorio y a la vez una amiga.

Ing. Omar Agni García Hernández, gracias por el esfuerzo que hiciste para ayudarme a mejorar mis figuras, y por más pesado que pudiera ser el proceso lo hiciste muy agradable.

A Mario Nequiz Abedaño, por proporcionar las amibas necesarias para este proyecto y por toda la ayuda otorgada.

José Augusto González Canto, por siempre tener disposición para asesorarme en las técnicas y mostrarme la importancia de los detalles.

A mis amigos de genética forense, Carmen, Yolanda, Dulce, Marco y Arturo, por compartir sus conocimientos conmigo y enseñarme que un buen trabajo en el laboratorio resultará en un beneficio para la sociedad.

Dedicatorias.

A mi mamá, Teresa porque siempre confiaste en mi, aun y cuando pensaba que no tenias razones. Tu cariño y apoyo me permiten mejorar como persona.

A mi papá, Tomás porque cometí demasiados errores y nunca dudaste en ayudarme. Y se que mientras siga intentando ser mejor, vamos a seguir jugando en el mismo equipo.

A mis hermanas, Jocelyn e Itzel, ustedes son un ejemplo de lo que yo quiero ser. Las admiro y quiero (casi siempre).

A mi gran amigo Alexis, la competencia entre los dos me ayudó a ser mejor en lo que hago. Gracias

A mis amigos de equipaje:

Edith: te convertiste en mi cómplice de locuras, y me enseñaste a mejorar como amigo y como persona.

Lorena: gracias gusana por abrirme los ojos cuando me equivoco y por estar en los momentos difíciles.

Tort: me mostraste que a pesar de todas las complicaciones, uno no tiene que dejar de hacer su mejor esfuerzo.

Bety: admiro como aun en lo mas cotidiano le imprimes tu toque de arte.

Marco: gracias por mostrarme que el no estar de acuerdo puede ser una gran herramienta para enriquecer lo que nos rodea.

Pedro: estoy agradecido de conocer a alguien como tú porque eres una persona demasiado noble y teniendo mucho o poco siempre lo compartes con las personas que aprecias.

A mis amigos de laboratorio: Lucy, Vania, Aura, Pamela, Ofe, Ara, Abril, Paulina, Erick, Daniel. Gracias por hacer mis días en el lab bastante agradables.

A Mariana eres una gran amiga que siempre busca ayudar de cualquier manera a los demás sin ningun interes.

A Stefania (Nueva), hiciste muy agradables las tardes en el laboratorio y me mostraste que no importa que todo se complique, es mas fácil lidiar con cualquier cosa si se mantiene una sonrisa.

A Klia, gracias por ser la persona en la que puedo confiar y que me inspira a ser mejor en todo lo que hago, tu ayuda es incondicional al igual que tu cariño 83-266.

Contenido

	págs.
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Infecciones parasitarias	2
2.2. <i>Entamoeba histolytica</i>	2
2.2.1. Clasificación taxonómica	2
2.2.2. Morfología	4
2.2.3. Ciclo de vida	5
2.2.4. Amibiosis invasiva	7
2.2.4.1 Amibiosis intestinal	7
2.2.5. Factores de virulencia	8
2.3. Proteínas fosfatasas	10
2.4. Sistema inmune	11
2.4.1. Receptores tipo toll	13
2.4.1.1. TLRs activados por PAMPS de parásitos protozoarios	15
2.4.2. Papel de las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en los procesos infecciosos	15
3. Justificación	19
4. Hipótesis	19
5. Objetivos	20
5.1. Objetivo general	20
5.2. Objetivos particulares	20
6. Materiales y métodos	21
6.1. Cosecha de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> (HM1-IMSS)	21
6.2. Lisis de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> y obtención de la fracción solubilizada	21
6.3. Purificación de la PTP de <i>E. histolytica</i> (PTPEh) por cromatografía de afinidad concanavalina A-Sefarosa (Con-A) e intercambio iónico dietilaminoetil (DEAE) celulosa	22
6.4. Determinación de la actividad enzimática y la cuantificación de la proteína	23
6.5. Electroforesis en gel SDS-PAGE	24
6.6. Tinción con plata	25
6.7. Obtención de los macrófagos a partir de médula ósea de ratón BALB/c	25
6.8. Producción de las citocinas en los macrófagos preincubados con los anticuerpos bloqueadores anti-TLRs	26
6.9. Cuantificación de las citocinas por el método de ELISA	27

7. Resultados	29
7.1 Purificación de la PTPEh	29
7.1.1. Fraccionamiento subcelular de los trofozoítos de <i>E.histolytica</i>	29
7.1.2. Purificación por cromatografía de afinidad utilizando Con-A sefarosa	31
7.1.3. Purificación por cromatografía de intercambio iónico DEAE celulosa	31
7.1.4. Análisis electroforético del perfil de proteínas eluidas de las columnas de Con-A sefarosa y DEAE celulosa.	33
7.2. Efecto de la PTPEh en la producción de las citocinas por los macrófagos murinos	34
7.3. Participación de los TLR-2 y TLR-4 en la producción de las citocinas por los macrófagos incubados con la PTPEh	39
8. Discusión	45
9. Conclusiones	52
10. Perspectivas	52
11. Bibliografía	53

Contenido de figuras

Figura1. Clasificación taxonómica de <i>E. histolytica</i>	3
Figura2. Quiste y trofozoíto de <i>E. histolytica</i>	4
Figura3. Proceso de infección por <i>E. histolytica</i>	6
Figura4. Respuesta inmune del hospedero a la amibiasis intestinal	8
Figura5. Localización y señalización de los TLRs	14
Figura6. Fraccionamiento subcelular de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	30
Figura7. Purificación de la PTPEh	32
Figura8. Análisis electroforético en geles SDS-PAGE del perfil de proteínas obtenidas en el proceso de purificación	33
Figura9. Efecto de la PTPEh en la producción de TNF- α por los macrófagos	35
Figura10. Efecto de la PTPEh en la producción de IL-12 por los macrófagos	36
Figura11. Efecto de la PTPEh en la producción de IL-10 por los macrófagos	37
Figura12. Efecto de la PTPEh en la producción de IL-1 β por los macrófagos	38
Figura13. Producción de TNF- α por los macrófagos al incubar con la PTPEh y utilizando anticuerpos bloqueadores de TLR-2 y TLR-4	41
Figura14. Producción de IL-12 por los macrófagos al incubar con la PTPEh y utilizando anticuerpos bloqueadores de TLR-2 y TLR-4	42
Figura15. Producción de IL-10 por los macrófagos al incubar con la PTPEh y utilizando anticuerpos bloqueadores de TLR-2 y TLR-4	43
Figura16. Producción de IL-1 β por los macrófagos al incubar con la PTPEh y utilizando anticuerpos bloqueadores de TLR-2 y TLR-4	44
Figura17. Modelo hipotético de la interacción de PTPEh con los receptores TRL-2 y TLR-4	51

Abreviaturas	
Absceso hepático amibiano	AHA
Adenosin monofosfato	AMP
Alfa metil mano piranósido	α -MM
Célula presentadora de antígeno	APC
Complejo mayor de histocompatibilidad	MHC
Concanavalina- A	Con-A
Dietilaminoetil	DEAE
Especies reactivas de oxígeno	ROS
Estimulador de los genes de interferón	STING
Extracto total	ET
Factor de necrosis tumoral	TNF
Factor estimulador para la formación de colonias de macrófagos	M-CSF
Genoma mitocondrial	mtDNA
Guanosina monofosfato	GMP
Interleucina	IL-
Kilodalton	kDa
Lipopolisacárido	LPS
Micrómetro	μ m
p-nitrofenil fosfato	p-NPP
Patrones moleculares asociados a patógenos	PAMPs
Peptidoglicano	PGN
Proteína activada por mitógeno	MAP
Proteína tirosina fosfatasa	PTP
Proteína tirosina fosfatasa de bajo peso molecular	LMW-PTP
Proteína tirosina fosfatasa de <i>E. histolytica</i> tipo A	EhPTPA
Proteína tirosina fosfatasa purificada de <i>E. histolytica</i>	PTPEh
Quimiocina	CC
Reactivo de desarrollo de imagen	IDR
Receptor tipo toll	TLR
Receptores de reconocimiento patrón	PRRs
Solución de plata	SCS
Solución moderadora de reducción	RMS

1. Resumen

Entamoeba histolytica es un parásito protozoo causante de la amibiasis, esta puede manifestarse de forma intestinal o extraintestinal, esta última, es la fase más invasiva debido a que el parásito puede alojarse en los pulmones, el cerebro y con mayor frecuencia en el hígado ocasionando un absceso hepático. Se ha reportado que *E. histolytica* contiene PTPs (proteínas tirosina fosfatasas) asociada a la membrana del trofozoíto. Las proteínas fosfatasas y en particular las PTPs regulan diversos mecanismos celulares importantes como la adhesión, la secreción, la migración y la proliferación. El objetivo de este proyecto fue purificar y caracterizar la PTP de *E. histolytica* por cromatografía de afinidad e intercambio iónico, para determinar el efecto que esta tiene sobre la secreción de las citocinas por los macrófagos murinos y determinar si esta actividad depende de los receptores TLR-2 y TLR-4. Mediante una columna de afinidad Concanavalina-A y de intercambio iónico Dietilaminoetil-celulosa, se purificó la proteína de *E. histolytica*. Posteriormente con la proteína obtenida, se estimularon a los macrófagos murinos con los anticuerpos bloqueadores anti-TLR-2 y TLR-4. El sobrenadante se utilizó para analizar la secreción de citocinas (TNF- α , IL-12, IL-10 e IL-1 β) por la técnica de ELISA. Se obtuvo la PTP de *E. histolytica* con un peso molecular de aproximadamente 55 kDa. Al bloquear TLR-2 y TLR-4 e incubarlos con la PTPEh se observó una disminución en la producción de las citocinas TNF- α , IL-12, IL-10 e IL-1 β en diferentes proporciones. Los resultados indican que los receptores TLR-2 y 4 están involucrados en el reconocimiento de esta enzima.

2. Introducción

2.1. Infecciones parasitarias

Las infecciones parasitarias intestinales tienen una distribución mundial, con tasas de prevalencia elevadas en diversas regiones, ocasionan problemas sanitarios y sociales debido a su sintomatología y complicaciones, las enteroparasitosis pueden transcurrir durante largo tiempo asintomáticas sin diagnosticar y pueden llegar, a provocar cuadros digestivos, inclusive con severa repercusión sobre el crecimiento y desarrollo del individuo (Acuña *et al.*, 1999). Se estima que la amibiasis causa 50 millones de casos clínicos al año de los cuales 100,000 resultan en muerte, esta enfermedad es ocasionada por *E. histolytica* el cual es un parásito entérico exclusivo de los humanos; la Organización Mundial de la Salud (OMS) la considera como la tercera parasitosis causante de la mortalidad mundial observándose mayor impacto en los países en desarrollo (Quach, *et al.* 2018).

2.2. *Entamoeba histolytica*

2.2.1 Clasificación taxonómica

El vocablo ameba designa un grupo de protozoos, pertenecientes a los géneros: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Entamoeba*, *Endolimax* y *Lodoameba*. En este grupo, coinciden dos aspectos comunes en su fase trófica: presentan protoplasma desnudo y la formación de pseudopodos lobulados como estructuras de locomoción (Fonte, 2003).

El supergrupo, Amebozoa, se refiere a organismos con locomoción ameboidea generalmente con pseudopodia morfológicamente variable no

eruptiva (lobopodia); subpseudopodia común en algunos grupos; células "desnudas" o testadas; crestas tubulares, a menudo ramificadas; generalmente no nucleares, raramente binucleado, a veces multinucleado; quistes comunes, morfológicamente variables; inclusiones celulares (parasomas y tricoquistes) de valor diagnóstico en algunos; etapas de flagelación si están presentes, raramente con dos flagelos, generalmente con un cinético que tiene un solo flagelo (Adl, *et al.* 2005).

El primer nivel, Entamoebida consta de organismos con flagelo y centriolos ausentes; mitocondrias, peroxisomas e hidrogenosomas ausentes; mitosis cerrada con centrosoma endonuclear; Disminución del dictosoma de Golgi (Adl, *et al.* 2005).

El segundo nivel, *Entamoeba* se caracteriza por protozoos ameboides caracterizados por la presencia de cromatina granulada sobre la superficie interna de la membrana nuclear. Sus organismos son parásitos en invertebrados y vertebrados, incluidos los humanos (BVS, 2019).

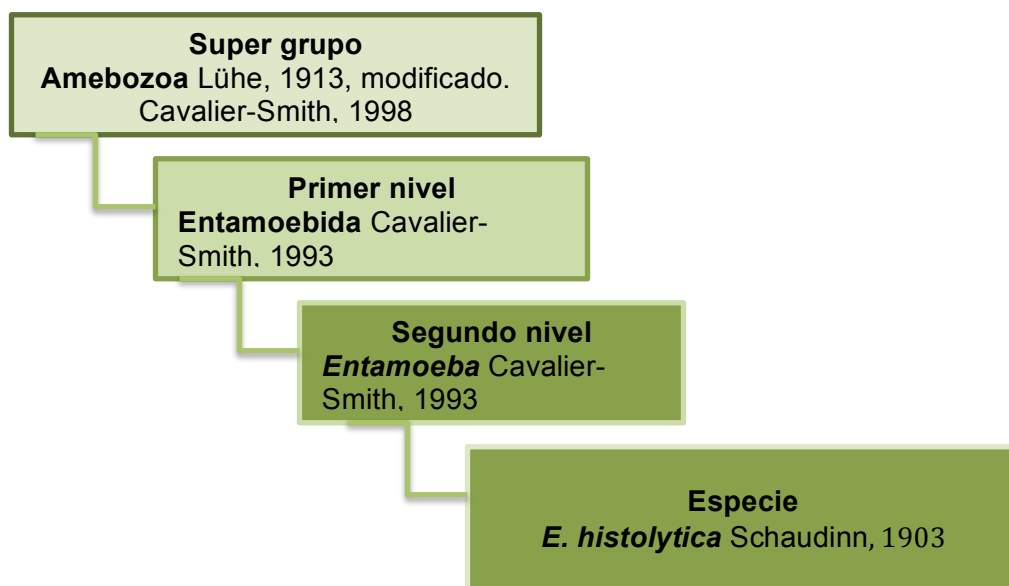


Figura 1. Clasificación taxonómica de *E. histolytica*.

2.2.2 Morfología

El quiste de *E. histolytica* es la fase infectiva no móvil del parásito, además es resistente al ambiente y se encuentra en las heces del humano infectado, por lo cual es considerado como la forma de transmisión de este parásito. El quiste es una estructura redondeada, contiene una cubierta de cromatina gruesa con gránulos uniformes finos, posee cuatro núcleos, el cariosoma es pequeño, compacto y usualmente con localización central, en el citoplasma pueden presentarse cuerpos cromatoides alargados. Los quistes pueden sobrevivir durante semanas en el suelo o en el agua, que son las principales fuentes de infección (Figura 2a) (Loftus *et al.* 2005).

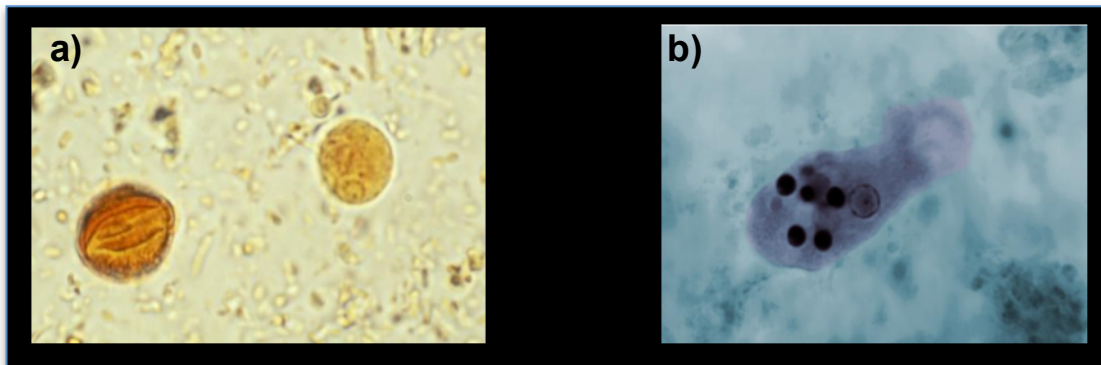


Figura 2. Quiste y trofozoíto de *E. histolytica* a) Quiste de *E. histolytica* maduro, el cual contiene cuatro núcleos; tamaño aproximado = 18 μm . b) Trofozoíto de *E. histolytica*. El úniconúcleo con su endosoma central y cromatina regularmente distribuida es visible; tamaño aproximado = 40 μm (CDC Public Health Image Library (PHIL)).

El trofozoíto (Figura 2b), es la forma móvil del parásito, su cuerpo es alargado y mide de 40 a 60 μm , semitransparente con un solo núcleo y posee pseudópodos que le proporcionan la capacidad de movimiento. Esta forma es susceptible a los cambios bruscos de temperatura y no es capaz de

sobrevivir fuera del hospedero. Puede residir en el intestino del humano y ocasionalmente, invadir la mucosa intestinal, penetrándola e invadiéndola. Por lo que puede llegar a destruir a las células tisulares (Loftus *et al.* 2005).

2.2.3 Ciclo de vida

La infección se adquiere por la ingestión del quiste maduro tetranucleado, el cual, es resistente a los jugos gástricos. El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado. Del quiste sale una amiba tetranuclear que multiplica sus núcleos para formar una amiba con ocho núcleos. Posteriormente, esta se fragmenta en ocho trofozoítos los cuales se establecen en el colon, donde se alimentan de las bacterias y restos celulares. Simultáneamente, los trofozoítos pueden enquistarse, que es un proceso aparente estimulado por condiciones lumbinales no ideales para el organismo. Dentro de quiste continúan el metabolismo y la división nuclear hasta formar los cuatro núcleos. Después de ser eliminados con las heces, los quistes pueden permanecer viables por semanas o meses, dependiendo de las condiciones ambientales (Figura 3).

Los trofozoítos van más allá de la submucosa y llegan a los vasos sanguíneos mesentéricos y, a través de la vena porta, migran a otros órganos, principalmente el hígado, los pulmones y el cerebro en estos organos causan abscesos amibianos (Carrero *et al.*, 2007).

Durante la infección, se pueden generar periodos de colitis aguda, en los que son excretados los trofozoítos los cuales se desintegran rápidamente fuera del cuerpo. Es por esto que como se mencionó, la infección es

generada a partir de quistes maduros (Gómez, *et al.*, 2007).

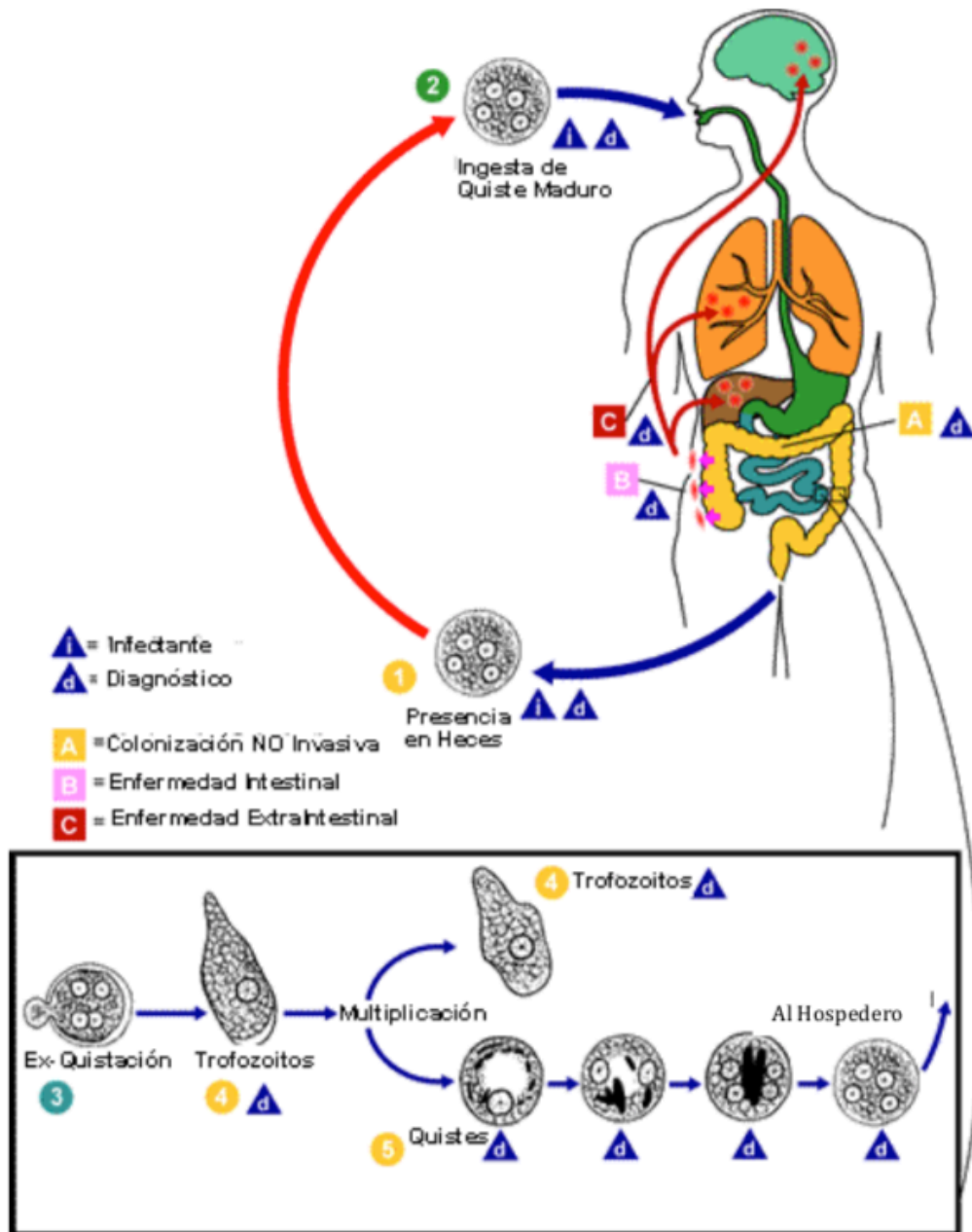


Figura 3. Proceso de infección por *E. histolytica*. Los quistes se encuentran típicamente en las heces (1); Ingestión de quistes maduros (2); Exquistación se produce en el intestino delgado (3); se liberan y migran los trofozoitos al intestino grueso, estos se multiplican por fisión binaria y producen quistes (4); quistes y trofozoitos pasan a las heces (5) (CDC, 2017).

2.2.4 Amibiosis invasiva

2.2.4.1 Amibiosis intestinal

Cuando el parásito invade el intestino grueso del humano, se puede comportar como un comensal inofensivo, o bien invadir la mucosa intestinal y causar destrucción tisular; dentro de estas alteraciones, la más habitual es la colitis amibiana ulcerativa (Olivos *et al.*, 2011).

Si bien, la infección es un proceso dinámico que involucra factores del hospedero y de el microorganismo patógeno. El papel del agresor se puede resumir en cinco mecanismos moleculares: a) **Lesión inespecífica:** se observa engrosamiento de la mucosa, hiperplasia glandular y el edema del estroma. b) **Depresión mucopénica:** en esta etapa se aprecian, pequeñas depresiones asociadas a la pérdida de la mucosa, con adherencia de los trofozoítos a ellas. c) **Lesión invasiva temprana con invasión superficial:** durante esta fase clave se presentan tres fenómenos: erosión epitelial superficial, focos de microinvasión interglandular e infiltración de la lámina propia. d) **Lesión invasiva tardía con ulceración profunda:** a medida que avanza la invasión, la úlcera se extiende profundamente en un área mayor de la submucosa, el macrófago, previamente activado con IFN- γ , es la única célula capaz de enfrentar con éxito al trofozoíto y fagocitarlo. e) **Úlcera en granulación:** la proliferación de pequeños vasos indica curación de la herida y es el marcador de esta etapa (Figura 4). No se tienen reportes que permitan saber si esta etapa ocurre espontáneamente o depende del tratamiento (Gómez *et al.*, 2007, Solaymani-Mohammadi, *et al.*, 2008).

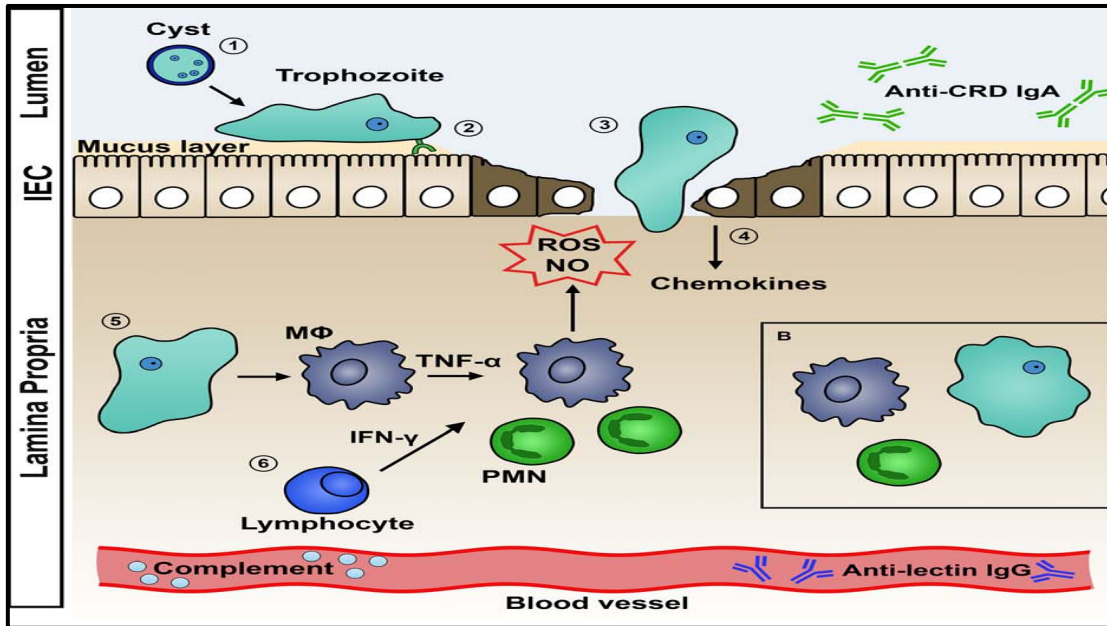


Figura 4. Respuesta inmune del hospedero a la amebiasis intestinal. (1) El ácido del estómago sirve como primera línea de defensa contra los enteropatógenos, pero, los quistes amebianos son altamente resistentes y desenquistan en el lumen intestinal. (2) La mucina, una glicoproteína secretada por las células caliciformes y las glándulas submucosas, es el componente principal de la capa protectora de moco. Los trofozoítos se unen a la superficie del tejido del hospedero a través de lectina Gal / GalNAc. (3) La ameba secreta cisteína proteasas, que interrumpen la capa mucosa y facilitan la invasión de los tejidos. (4) Las células del epitelio intestinal lesionadas, liberan quimiocinas para reclutar células inmunes al sitio de invasión. (5) Los macrófagos activados liberan TNF- α , estimulando células polimorfonucleares (PMN) y macrófagos para liberar ROS y NO, que matan al parásito. ROS y NO, también puede contribuir a la destrucción del tejido. (6) Se libera IFN- γ por los linfocitos los cuales a su vez activan a los macrófagos y PMN (Moonah *et al.*, 2013)

2.2.5 Factores de virulencia

Entamoeba histolytica tiene capacidades fagocíticas, proteolíticas y citolíticas; se sabe que secreta enzimas metabólicas que facilitan su invasión en la mucosa y la submucosa causando úlceras intestinales características en forma de matraces y permitiéndoles llegar a la circulación portal y así a

los órganos internos como; el hígado, los pulmones, la piel, etc. La amibiasis puede involucrar cualquier parte del intestino, pero el ciego y el colon ascendente son los sitios de su predilección (Grosse, 2016).

La virulencia de *E. histolytica* es intrínseca y depende de la capacidad infecciosa (capacidad de colonización intestinal) y de la capacidad invasiva (capacidad de diseminarse y destruir tejidos del hospedero) la cual en amiba es muy elevada (Trejos-Suárez *et al.*, 2009).

El principal factor de virulencia presente en *E. histolytica* es su capacidad de citotoxicidad, que está mediada por una serie de factores y sustancias producidas por la amiba dentro de las cuales destacan los ameboporos y las proteasas de cisteína (Ximénez *et al.*, 2007).

Por otro lado, se encuentra la lectina Gal/GalNAc que se compone por un complejo de proteínas de adhesión que mantiene la invasión del tejido por *E. histolytica*. La interrupción de la función de lectina Gal/GalNAc en los parásitos modificados (trofozoítos HGL-2) cambió la fisiopatología de la formación de abscesos hepáticos en hámster (Blázquez *et al.*, 2007).

Los ameboporos son proteínas que pertenecen a una familia de pequeños péptidos anfipáticos; A, B y C, las tres presentan actividad de formación de poros hacia las vesículas lipídicas, de estas tres la C es la más activa. También son capaces de modificar la integridad de las membranas citoplasmáticas bacterianas y matar así las bacterias Gram positivas. Los ameboporos representan una familia distinta de péptidos activos en la membrana que pueden funcionar intracelularmente como agentes

antimicrobianos, pero también pueden conferir actividad citolítica sobre el parásito (Leippe *et al.*, 1994).

El ameboporo está compuesto de polipéptidos solubles que se insertan en la membrana de la célula blanco por la unión con fosfolípidos aniónicos a pH bajo, oligomerizan, proceso mediado por la interacción péptido-péptido, difunden en la membrana y forman un canal a través del cual se produce la salida de iones y otras moléculas pequeñas (Petri, 2008).

Las proteasas de cisteína son enzimas proteolíticas secretadas por la amiba dentro de su microambiente y se consideran esenciales en la habilidad de este parásito para destruir los tejidos humanos, pues degradan distintos componentes de la matriz extracelular (la fibronectina, la laminina, el colágeno, entre otros) y separan las células, facilitando la invasión (Trejos-Suárez *et al.*, 2009).

2.3 Proteínas fosfatasa

La familia de las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) desempeñan papeles importantes en el control de procesos celulares de desfosforilación. Por otro lado, se han descrito algunas PTPs de agentes infecciosos que juegan un papel importante en los mecanismos de patogenicidad de estos microorganismos (Anwar *et al.*, 2013).

Sin embargo, en las últimas dos décadas se han identificado y caracterizado estas enzimas en los microorganismos infecciosos como: virus, bacterias y parásitos. Se ha observado que algunas proteínas fosfatasas de estos

pueden presentar funciones similares a las de algunas células eucariontes (Gómez *et al.*, 2014).

El genoma de *E. histolytica*, contiene 42 genes que codifican para PTPs, las cuales han sido propuestas como un factor de virulencia en otros microorganismos patogénicos (Aguirre *et al.*, 2000). Entre las fosfatasa ácidas reportadas, se han caracterizado la familia de las PTPs las cuales pueden desempeñar un papel importante en la patogenicidad. También se han estudiado otras PTPs de *E. histolytica* (las PTP no receptoras EhPTPA y EhPTPB). La EhPTPA puede estar implicada en la patogénesis diversos estudios han mostrado que es modulada durante la formación del absceso hepático amibiano (AHA) en el modelo de hámster (Ramírez-Tapia *et al.*, 2015).

Las proteínas tirosina fosfatasa de bajo peso molecular (LMW-PTP) se encuentran en la mayoría de los organismos, incluidos las archaeas, bacterias y los eucariotas. En general, un organismo tiene uno o dos genes de LMW-PTP, *E. histolytica* tiene dos genes, y en especies comensales como *E. dispar* y *E. invadens* tienen solo un gen de cada uno. La LMW-PTP parece mediar la actividad de varias proteínas relacionadas con la virulencia (Linford *et al.*, 2014).

2.4 Sistema inmune

La inmunidad innata y la adaptativa, son dos tipos de inmunidad que presenta el ser humano. Aunque las respuestas de la inmunidad natural y la adquirida muestran diferencias en sus mecanismos de acción, la sinergia

entre ambas es esencial para una respuesta inmune totalmente efectiva (Vega, 2008).

El sistema inmune innato está constituido por barreras de tipo físicas, químicas y biológicas; factores solubles (proteínas de inflamación, citocinas) y las células fagocíticas, los polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), los mononucleares (macrófagos y células dendríticas), y las células natural killer (por sus siglas en inglés NK) (Collado *et al.*, 2008).

Los macrófagos son células fagocíticas derivadas de precursores de la médula ósea y los monocitos progenitores en la sangre periférica. Son esenciales para el mantenimiento y la defensa de los tejidos del hospedero, detectando y absorbiendo material particulado y cuando sea necesario, iniciando una respuesta pro-inflamatoria (Verschoor *et al.*, 2012).

Los macrófagos activados, tienen la capacidad de detonar mecanismos efectores: muerte de los parásitos intracelulares, la lisis de células tumorales, la producción y la secreción de las interleucinas (IL), IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α (factor de necrosis tumoral), las quimiocinas (CC) CCL3, CXL9 y CXCL10, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), generación de óxido nítrico (ON) en el modelo murino, cambios fagolisosomales y aumento en la expresión de complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II), esta secreción de citocinas pro-inflamatorias se ha reportado que puede activarse por la unión de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a receptores tipo toll (Duque *et al.*, 2007).

2.4.1 Receptores tipo toll

Se sabe que una estrategia de reconocimiento que utiliza el sistema inmune innato involucra a receptores que reconocen patrones (PRRs) unos de estos son los receptores membranales evolutivamente conservados denominados receptores tipo toll (TLRs), estos receptores detectan a los PAMPs y desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmune innata. Los TLRs a través de una vía común que conduce a la expresión de diversos genes inflamatorios (Figura 5). Además, cada TLR provoca respuestas celulares específicas a patógenos debido al uso diferencial de proteínas adaptadoras intracelulares. Estudios recientes han revelado la importancia de la localización subcelular de TLRs en el reconocimiento y señalización de los patógenos (Domínguez *et al.*, 2009. Kawai *et al.*, 2005).

Los TLRs presentes en las células epiteliales y en las células del sistema inmune reconocen PAMPs presentes en la superficie de bacterias y otros patógenos. El TLR-2 reconoce el peptidoglicano (PGN) de las bacterias Gram (+), mientras que el TLR-4 reconoce el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram (-). Se sabe que el reconocimiento de PAMPs por TLRs promueve la activación de varias vías de señalización. La vía conocida como ruta clásica induce la activación del factor de transcripción NF- κ B a través de la proteína adaptadora MyD88, y por lo tanto, la transcripción génica de varias proteínas, entre las que se incluyen citocinas pro-inflamatorias y diversas moléculas de superficie celular, incluyendo TLRs (Galván-Moroyoqui *et al.*, 2011, Takeuchi *et al.*, 1999).

En el humano, diez miembros de la familia TLR han sido identificados mientras que en ratón se encontraron 12. TLR-1 al 9, se conservan tanto en humanos como en ratones. TLR-10 se expresa en humanos, mientras que TLR-11 se expresa solo en ratones. TLR-1, 2, 4, 5 y 6 se expresan en la superficie celular y reconocen PAMPs derivados de bacterias, hongos y protozoos, mientras que TLR-3, 7, 8 y 9 se expresan exclusivamente dentro de compartimentos endocíticos y reconocen principalmente los PAMPs de ácidos nucleicos derivados de diversos virus y bacterias (Kumar *et al.*, 2011).

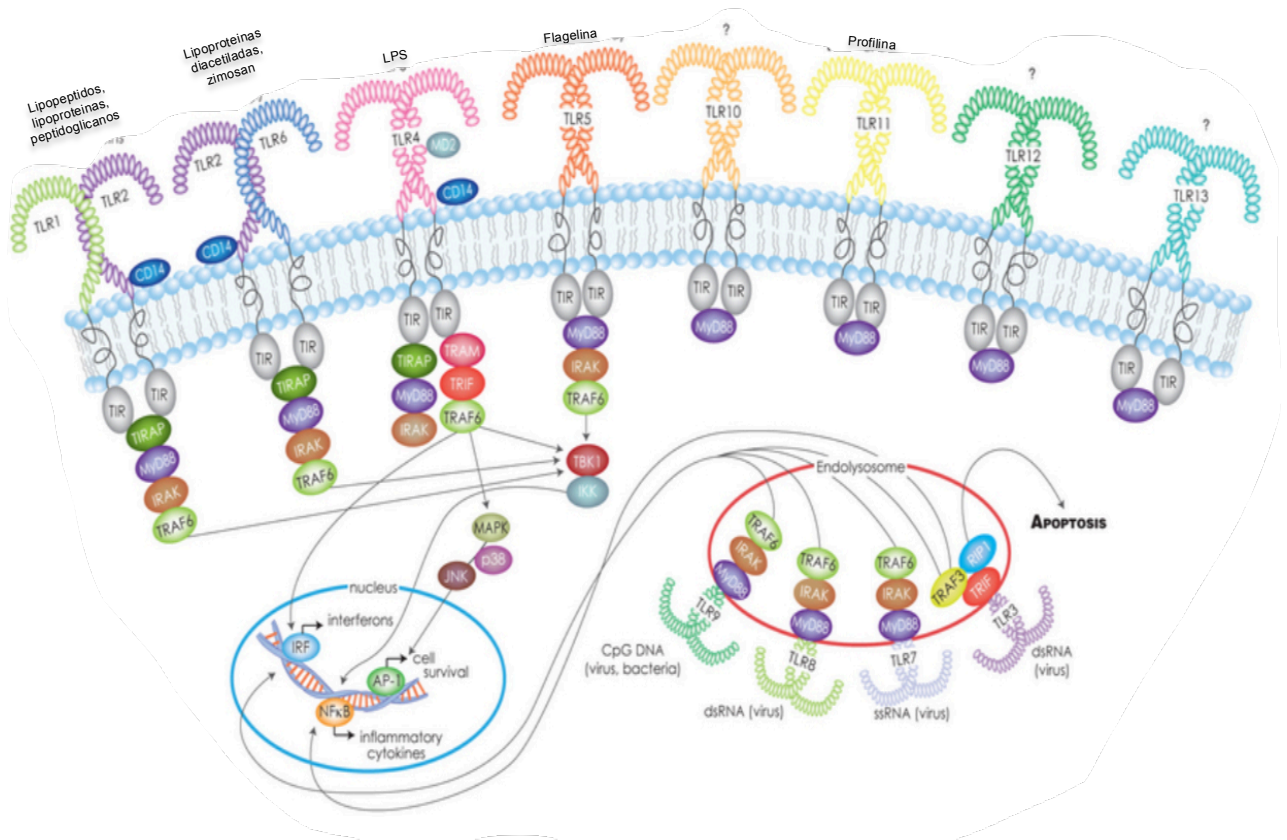


Figura 5. Localización y señalización de los TLRs (May, 2012).

2.4.1.1 TLRs activados por PAMPS de parásitos protozoarios

Las vías de señalización de TLR son cruciales para la resistencia a la infección de los protozoos, como *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi* (Yin, *et al.*, 2018).

Se ha demostrado que la activación de los receptores tipo toll (TLR-3, TLR-4 y TLR-7) desempeñan un papel importante en la leishmaniosis al promover la producción de TNF α - e IL-6 por los macrófagos (Martínez-Orellana *et al.*, 2018). Recientes estudios *in vitro* indujeron la síntesis de TLR-2 y TLR-4, citocinas pro-inflamatorias en las células CaCo, una línea celular de colon humano, a través del reconocimiento de la Gal / GalNac (Galvan-Moroyoqui *et al.*, 2011).

En otros estudios se encontró que la Gal-lectina activa las vías de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAP) y el factor de transcripción NF-k β en los macrófagos que culminan en la inducción de varios genes, incluido el TLR-2 lo cual supone un impacto significativo en la activación de los macrófagos y contribuye a la patogénesis amibiana (Kammanadiminti *et al.*, 2004).

2.4.2 Papel de las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en los procesos infecciosos

La interleucina-1 beta (IL-1 β) es un mediador pleiotrópico de la inflamación y se produce en respuesta a una amplia gama de estímulos. Durante la infección, la producción de IL-1 β se produce en paralelo con el inicio de las defensas antimicrobianas innatas, pero no se define la contribución de la

señalización de IL-1 β a la inmunidad celular-intrínseca. Se reportó que la IL-1 β exógena induce la activación del factor 3 regulador de interferón (IRF3) en las células mieloides, los fibroblastos y las células epiteliales humanas. La activación de IRF3 por IL-1 β depende de los genes de interferón (STING), a través del reconocimiento de mtDNA citosólico por guanosina monofosfato (GMP) AMP sintasa (cGAS) (Kenny *et al.*, 2008).

La IL-10 se identificó hace más de dos décadas y es hasta la fecha la molécula supresora más estudiada del sistema inmunológico. Esta citocina juega un papel crítico en la prevención de las patologías inflamatorias y autoinmunes, limitando la respuesta inmune a los patógenos y la flora microbiana. Ratones deficientes de IL-10 desarrollan la enfermedad inflamatoria intestinal tras la colonización en el intestino con microorganismos particulares, mientras que en los humanos, los estudios genéticos han confirmado el papel esencial de la IL-10 en la prevención de la inflamación deletérea en el intestino (Lobo *et al.*, 2016).

La IL-12 es una citocina pro-inflamatoria producida por las células dendríticas, los macrófagos y las células B en respuesta a los patógenos microbianos. Se establece un lazo de retroalimentación positiva en el que mediante la producción de IFN γ inducida por IL-12 en células T, facilita la diferenciación a una población Th-1. La IL-12 también puede inducir la producción de IFN γ por las células NK (Vignali *et al.*, 2012). Esta familia de citocinas desempeñan un papel crucial en la configuración de la respuesta inmune durante la presentación del antígeno. También tiene un papel

esencial en la regulación de las funciones de una variedad de células efectoras, lo que hace que las citocinas de la familia IL-12 sean blancos terapéuticos o agentes importantes en varias enfermedades inflamatorias (Sun *et al.*, 2015).

Estudios de infección con los trofozoítos de *E. histolytica* en un modelo *in vivo* en el hámster, mostraron una vigorosa respuesta Th-1, en donde se encontraron altos niveles de IL-2, IL-12 e IFN- γ . Estos son probablemente el resultado de los eventos de presentación de antígenos mediados por las células presentadoras de antígeno (APC) activadas, que migran a los ganglios linfáticos desde el sitio de la invasión de los trofozoítos. La inmunidad experimenta un cambio bien documentado hacia un fenotipo de tipo Th-2 a medida que la infección pasa de aguda a crónica, con niveles crecientes de IL-10. Como consecuencia de esta modulación, la fibrosis hepática se reduce significativamente, lo que sugiere un intento por parte del hospedero de atenuar la patología en los tejidos afectados (Carrero *et al.*, 2007).

El TNF- α , es una potente citocina pleiotrópica con múltiples funciones celulares, se ha relacionado de manera crítica con la patogénesis de diversas enfermedades crónicas inflamatorias y enfermedades autoinmunes, entre otras, regula diversos eventos biológicos fundamentales de las células, tales como: la activación de los leucocitos, la liberación de diversas citocinas y quimiocinas, y la producción de ROS (Fragoso *et al.*, 2013). Además, activa simultáneamente los mecanismos de supervivencia celular y de

muerte celular. De los casi 17 miembros de la superfamilia del TNF, el TNF- α es probablemente el inductor más potente de la apoptosis. La activación de los genes dependientes de NF- κ B regula la supervivencia y los efectos proliferativos de esta citocina, mientras que la activación de las caspasas regula los efectos apoptóticos. La apoptosis inducida por TNF- α está mediada principalmente a través de la activación de receptores de tipo I, cuyo dominio de muerte recluta más de una docena de proteínas de señalización diferentes, que juntas se consideran parte de una cascada de apoptosis. Sin embargo, esta cascada no tiene en cuenta el papel de los intermedios reactivos de oxígeno, la ceramida, las fosfolipasas y las serina proteasas que también están implicadas en la apoptosis inducida por TNF- α (Rath *et al.*, 1999).

3. Justificación

Hasta el momento se ha descrito el papel de algunas PTPs en la regulación de diversos procesos celulares como: el ciclo celular, la motilidad celular, la modulación de la respuesta inmune, la respuesta a estrés, etc. En *E. histolytica* se han descrito varias PTPs sin embargo, se desconoce el papel de la PTP de *E. histolytica* (PTPEh) en la producción de TNF- α , IL-12, IL-10 e, IL-1 β y a través de qué receptor se esté uniendo esta proteína. En este trabajo se analizará a los receptores tipo toll como candidatos en el reconocimiento de la PTP amibiana.

4. Hipótesis

La proteína tirosina fosfatasa de *E. histolytica* (PTPEh) activa la secreción de las citocinas: TNF- α , IL-12, IL-10 e, IL-1 β , en los macrófagos a través de los receptores TLR-2 y TLR-4.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Analizar el efecto que ejerce la proteína tirosina fosfatasa de *Entamoeba histolytica* en la producción de las citocinas TNF- α , IL-12, IL-10 e IL-1 β por los macrófagos a través de los receptores TLR-2 y TLR-4.

5.2 Objetivos particulares

- a) Purificar la PTP de *E. histolytica* por cromatografía de afinidad Con-A e intercambio iónico DEAE.
- b) Cuantificar las citocinas: TNF- α , IL-12, IL-10 e IL-1 β en los macrófagos murinos incubados con la PTPEh.
- c) Bloquear los receptores TLR-2 y TLR-4 de macrófagos e incubarlos con PTPEh y cuantificar la producción de TNF- α , IL-12, IL-10 e IL-1 β .

6. Materiales y métodos

Las técnicas para la purificación de la proteína de *E. histolytica* y para la obtención de macrófagos se siguieron según el manual desarrollado en la Unidad de Investigación en Medicina Traslacional. Lab. de Inmunobioquímica Molecular y Cardiopatías. Unidad Periférica de la Facultad de Medicina, UNAM-INC.

6.1. Cosecha de trofozoítos de *E. histolytica* (HM1-IMSS)

Los trofozoítos fueron donados por el Dr. Ruy Pérez Tamayo del Laboratorio de Patología de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental. Facultad de Medicina-UNAM. Los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (HM1-IMSS) presentes en las cajas de cultivo, se colocaron en hielo durante 20 min, la temperatura favoreció el desprendimiento de los trofozoítos, posteriormente estos se centrifugaron en tubos cónicos de 50 mL a 1,200 rpm por cinco min a 4°C, el sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS). El procedimiento se repitió dos veces y en el último lavado se tomó una alícuota para el conteo. La pastilla final se guardó a -70°C hasta su fraccionamiento.

6.2. Lisis de trofozoítos de *E. histolytica* y obtención de la fracción solubilizada

Se obtuvieron 100 millones de trofozoítos fueron descongelados y se resuspendieron en un amortiguador de lisis (imidazol 10 mM, leupeptina 2

$\mu\text{g/mL}$, aprotinina 10 $\mu\text{g/mL}$, EDTA 5 mM y benzamidina 1 mM) del cual se agregó en una relación 1mL/5 millones de trofozoítos. Posteriormente, se sonicaron en el equipo “SONICS Vibra-cell”, utilizando una potencia de 37% de amplitud de onda, durante 10 min a 4°C, se verificó la lisis de los trofozoítos en el microscopio óptico. Una vez verificada la lisis se tomó una alícuota a la cual se le llamó extracto total (ET), el volumen restante, se centrifugó a 12,000 rpm (SORVALL RC 6 PLUS) durante 15 min a 4°C. Finalizado el proceso de centrifugación se tomó una muestra del sobrenadante 1 (SN1), la pastilla 1 (P1) se resuspendió en el amortiguador de lisis antes mencionado adicionado con 2% de tritón X-100, en este paso el homogenado se dejó incubando durante una hora en hielo y se mezcló utilizando vortex cada 10 min, transcurrido el tiempo la muestra se centrifugó en las condiciones antes mencionadas. El sobrenadante 2 (SN2) obtenido, se recuperó y se le adicionó glicerol, la muestra se guardó en alícuotas, mientras que la pastilla 2 (P2), fue resuspendida. Posteriormente se analizó la actividad enzimática con la finalidad de verificar el proceso de la purificación.

6.3. Purificación de la PTP de *E. histolytica* (PTPEh) por cromatografía de afinidad concanavalina A-sefarosa (Con-A) e intercambio iónico Dietilaminoetil (DEAE) celulosa

El sobrenadante 2 del fraccionamiento subcelular, se pasó a través de una columna de afinidad de Con-A, la cual fue previamente equilibrada con el amortiguador de fosfatos que contenía Ca^{+2} y Mg^{+2} (CaCl_2 0.68 mM y de

MgCl₂ 6H₂O 0.49 mM). La enzima se eluyó con el PBS que contenía alfa-9-metilmanopiranosido (α -MM). De las muestras obtenidas, se determinó la actividad enzimática de fosfatasa y el pico con mayor actividad enzimática fueron pasados a través de la cromatografía de intercambio iónico, DEAE-celulosa previamente equilibrada (Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 50 mM y α -MM 10 mM). La enzima se eluyó con un gradiente de NaCl (50- 400 mM) en Tris 10 mM pH 7, con 10 mM de α -MM y las diferentes fracciones fueron analizadas para determinar la actividad fosfatasa. El perfil de proteínas fue analizado en geles SDS-PAGE al 10%, los cuales fueron teñidos con plata utilizando un kit de silver stain plus (Bio Rad).

6.4. Determinación de la actividad enzimática y la cuantificación de la proteína

Se determinó actividad enzimática del fraccionamiento obtenido (ET, SN1, P1, SN2 y P2) y de los eluidos obtenidos del proceso de. Las muestras se colocaron en una placa de 96 pozos donde se colocaron los siguientes volúmenes: 1 μ L del SN1 y SN2, diluidas 1:10 y 10 μ L para P1, P2, lavados, y eluidos. A cada una de las muestras se adicionó 10 μ L de sustrato y se ajustó a 100 μ L con amortiguador de acetato de sodio a pH 5.0, la placa fue incubada a 37 °C durante 1 hr, la reacción se detuvo con 20 μ L de NaOH 2N. La placa se leyó a una longitud de onda de 405 nm (cada muestra por duplicado) en un espectrofotómetro.

Para cuantificar las proteínas se usó un ensayo colorimétrico en muestras con y sin detergente. El ensayo se basó en la reacción de la proteína en muestras con una solución de tartrato de cobre alcalino y el reactivo de Folin. La reacción se llevó a cabo entre la proteína y el cobre en medio alcalino y la subsecuente reducción del reactivo de Folin por el complejo, desarrollando un color azul (reacción de Bradford). Las muestras que se analizaron en esta prueba fueron el extracto total (ET), el sobrenadante 1 (SN1), la pastilla 1 (P1), el sobrenadante 2 (SN2) y la pastilla 2 (P2) siendo las últimas tres muestras las que contenían detergente Tritón X-100 al 2 %.

Las absorbancias de las muestras experimentales fueron comparadas con los valores obtenidos en la curva patrón utilizando albúmina sérica bovina (BSA) (0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 10 y 15 μg). La mezcla se incubó 15 min a temperatura ambiente y se analizó a una absorbancia de 750 nm. Por último, los resultados se extrapolaron en una curva de BSA.

6.5. Electroforesis en gel SDS-PAGE

Los eluidos con mayor actividad enzimática de fosfatasa de ambas columnas, Con-A y DEAE se precipitaron en acetona, en una relación 1:10, durante 24 hrs a -20°C . Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 1,200 rpm a 4°C durante 10 min el sobrenadante se descartó y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente, para favorecer la evaporación de la acetona. Una vez secas las muestras se agregó amortiguador de Laemmli con β -mercaptoetanol el cual es un compuesto que es adicionado para favorecer el rompimiento de la estructura terciaria de la proteína

posteriormente, las muestras se hirvieron durante 5 min a 96° C, y se analizaron en un gel SDS-PAGE al 10%, a un voltaje constante (120V) durante 90 min.

6.6. Tinción con plata

El gel obtenido de la electroforesis se fijó en la solución fijadora (ácido acético 40%, metanol 10% y agua desionizada 50%) durante 30 min a temperatura ambiente en agitación constante, finalizado el tiempo se lavó cuatro veces con agua bidestilada por 40 min, con cambios cada 10 min; la mezcla de revelado consistió en los siguientes reactivos: H₂O 7mL, SCS [Silver Complex Solution] 1 mL, RMS [Reduction Moderator Solution] 1 mL, y IDR [Image Development Reagent] 1 mL, kit de la marca Bio-rad, se mezclaron y se agregaron 5 mL del acelerador, la mezcla se adicionó al gel, el cual estuvo en agitación constante hasta que se observó una tinción café, se observaron bandas en las diferentes muestras analizadas. La reacción se detuvo con ácido acético al 1%.

6.7. Obtención de los macrófagos a partir de médula ósea de ratón

BALB/c

La médula ósea se extrajo del fémur de los ratones hembras de 6 a 8 semanas de edad de la cepa BALB/c. Las células obtenidas se centrifugaron a 1,300 rpm durante 10 min a 4°C.

Las células progenitoras se diferenciaron a macrófagos cultivándolos en las cajas Petri de baja adherencia en 10 mL de medio, el cual contenía: DMEM F12 suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 100 µL de L- Glutamina y

1 μ L de M-CSF murino producido por la línea celular L929 el cual fue donado por la Dra. Laila Gutierrez Kobeh del laboratorio de Inmunofisiología celular de la Unidad Periférica de Investigación UNAM-INC. El cultivo se continuó durante siete días a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente para desprender los macrófagos de las cajas Petri, se le retiró el medio de cultivo y las cajas se lavaron con PBS, posteriormente se agregaron 4 mL del reactivo CELLSTRIPPER® de la marca Corning, en cada caja y se incubaron por 15 min a 37°C. El desprendimiento de las células de las cajas fue visualizado por un movimiento que se realizó a la caja en la cual se pudo observar un precipitado que correspondió a las células desprendidas. Se adicionó 4 mL de DMEM F12. Las células se recuperaron y centrifugaron para luego determinar el número de células realizando un conteo en la cámara de Neubauer, una vez obtenido el número total de células se sembraron 5×10^5 células/ mL por pozo en placas de 24 pozos.

6.8. Producción de las citocinas en los macrófagos preincubados con los anticuerpos bloqueadores anti-TLRs

Los macrófagos fueron pretratados con anticuerpo IgG anti-humano (500 μ g/mL) durante 1 hora a 37°C, para saturar los receptores Fc y evitar una unión inespecífica de los anticuerpos monoclonales anti-TLR. Posteriormente los macrófagos fueron tratados con anticuerpos monoclonales anti-TLR-2 (clona TL2.1) (Imgenex) 5 μ g/mL o anti-TLR-4 (MyBiosSource) 5 μ g/mL durante 1 hora a 37°C,. Una vez transcurrido este tiempo, los macrófagos fueron estimulados con 400 μ L de PTPEh durante 18

horas. Los sobrenadantes de los cultivos fueron cosechados. Como control positivo se utilizó LPS de *E. coli* 0111B4 a 100 ng/mL

6.9. Cuantificación de las citocinas por el método de ELISA

Una vez diferenciados los macrófagos, se colocaron 1×10^5 células para cada condición en medio DMEM solo, con 100 ng/mL de LPS y 400 μ L de la PTPEh, durante 18 hrs. Transcurrido el tiempo se obtuvieron los sobrenadantes de cada una de las condiciones y se cuantificó la cantidad de TNF- α , IL-12p40, IL-10 e IL-1 β presente en estas condiciones. Para cada citocina se utilizaron las siguientes concentraciones de anticuerpo de captura: 4 μ g/mL disuelto en amortiguador de unión fosfato dibásico de sodio 0.1 M a pH 6 para TNF- α ; 2 μ g/mL, para IL-12 p40 y 2.5 μ g/mL para IL-10 disueltos en amortiguador de unión fosfato dibásico de sodio pH 9. Se colocaron 50 μ L por pozo y se incubó durante toda la noche a 4° C. Las placas se lavaron cuatro veces con una solución PBS 1X y 0.01% de Tween 80. La placa se bloqueó con 200 μ L de la solución bloqueadora (caseína 5% en NaOH 0.1N) durante 30 min a temperatura ambiente. Después se lavó la placa tres veces; se colocaron 100 μ l por pozo para la curva estándar así como de las muestras, la curva estándar consiste de una serie de diluciones de la citocina recombinante y sirve como control positivo la cual se incubó durante toda la noche a 4°C. BSA al 1% con 0.05% de tween 20 se colocaron 100 μ L por pozo del anticuerpo de detección y se incubó una hora a temperatura ambiente; (se utilizaron los siguientes volúmenes de anticuerpo de detección 2 μ L/mL para TNF- α ; 0.5 μ L/mL para IL-12; 1

$\mu\text{L}/\text{mL}$ para IL-10). Se lavó la placa seis veces. Se colocaron 100 μL de estreptavidina-fosfatasa alcalina a una dilución 1:2000 en BSA al 1% con 0.05% de Tween 20. Se incubó por 30 min a temperatura ambiente. La placa se lavó ocho veces. Por último, se preparó la solución reveladora (compuesta por un amortiguador de sustrato y el sustrato de fosfatasa *p*-NPP), se colocaron 100 μL por pozo, se incubó a temperatura ambiente y en la oscuridad. La placa se analizó en un espectrofotómetro (312e BIO-TEK Instruments) a una longitud de onda de 405 nm. Se construyó una curva patrón obteniendo las concentraciones para las citocinas en pg/mL .

7. Resultados

7.1. Purificación de la PTPEh

7.1.1. Fraccionamiento subcelular de los trofozoítos de *E. histolytica*

Para el proceso de purificación de la PTPEh se analizó cada fracción subcelular obtenida a la cual se le determinó actividad enzimática específica donde, el extracto total (ET) tenía una actividad específica de 22.87×10^7 , el sobrenadante uno (SN1) 21.64×10^7 , la pastilla uno (P1) 43.78×10^7 , el sobrenadante dos (SN2) 176.7×10^7 y la pastilla dos (P2) presentó una actividad de 85.4×10^7 (Figura 6A). La actividad específica se define: Como unidades sobre miligramo de proteína, siendo una unidad igual al coeficiente de extinción del sustrato sobre las unidades ópticas obtenidas. Por otro lado, se realizó un análisis electroforético de las fracciones antes mencionadas, fueron analizadas en geles SDS-PAGE y posteriormente los geles se tiñeron con azul de Coomassie. El resultado de cada fracción presentó diversas proteínas con un amplio rango de peso molecular y entre las diferentes fracciones subcelulares hubo una variabilidad de las mismas (Figura 6B).

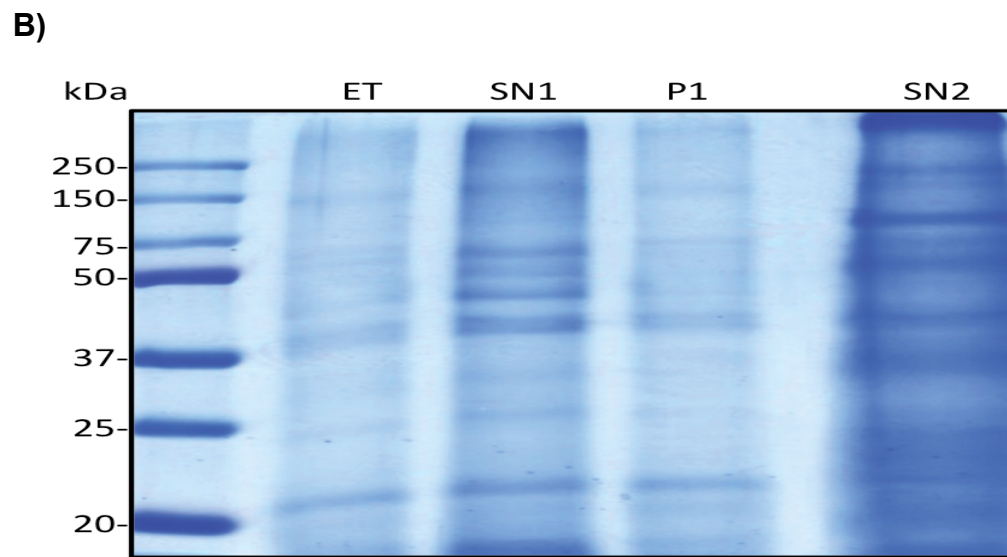
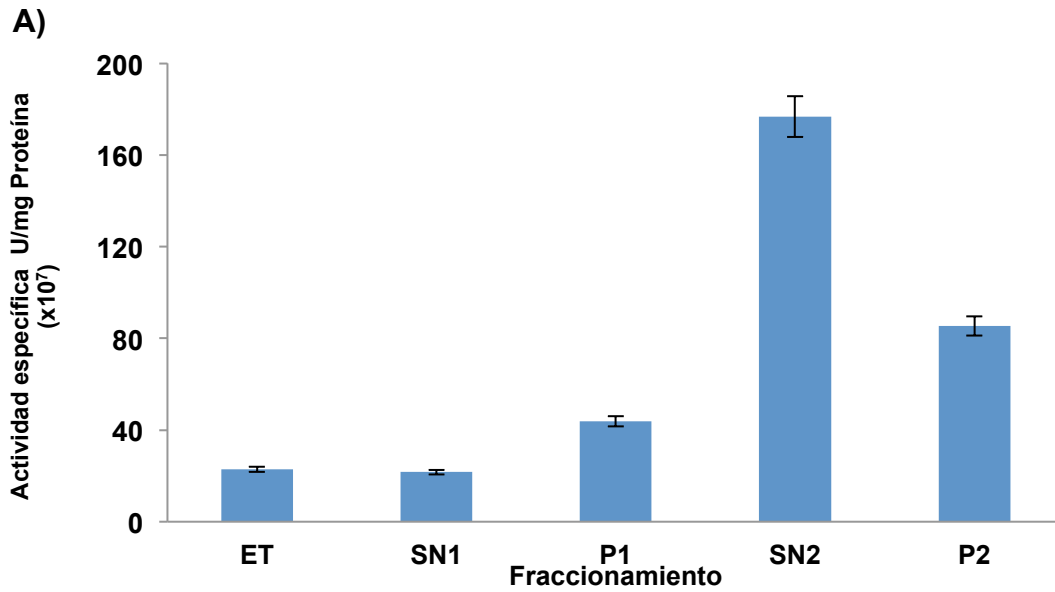


Figura 6. Fraccionamiento subcelular de trofozoítos de *E. histolyticaA)** Actividad enzimática específica. Donde $\leq U \geq$ representa a las unidades de densidad óptica sobre los miligramos de proteína. Extracto total (ET), sobrenadante 1 (SN1), pastilla 1 (P1), sobrenadante 2 (SN2), pastilla 2 (P2). B) Análisis electroforético en gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de perfil de proteínas obtenidas del fraccionamiento subcelular. *imágenes representativas de tres ensayos.

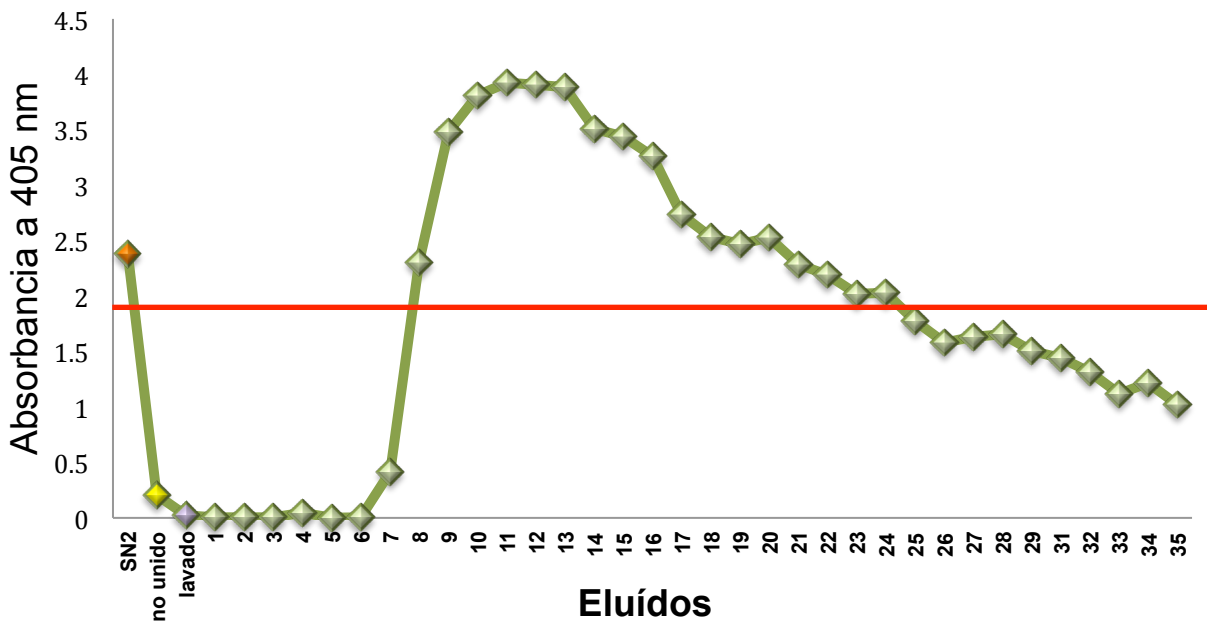
7.1.2. Purificación por cromatografía de afinidad utilizando Con-A sefarosa

La fracción solubilizada con el detergente (SN2) se pasó por la columna de afinidad Con-A sefarosa, posteriormente se eluyó con α -MM 0.1M, donde la proteína de interés se une a la proteína Con-A, esta interacción se ve modificada cuando se adicionó el α -MM, el cual compite por afinidad por el sitio de la con A y se liberó la PTPEh. A los eluidos obtenidos se les determinó su actividad enzimática utilizando como sustrato p-NPP. Los resultados mostraron que la actividad enzimática se empezó a presentar a partir del eluido 8 con una actividad de 2.3 unidades de absorbancia, la cual siguió aumentando en los eluidos subsecuentes hasta llegar a un pico de 3.9 unidades de absorbancia en los eluidos 11 y 12, después de esto la actividad disminuyó de manera progresiva hasta llegar al punto mínimo requerido de dos unidades de absorbancia en el eluido 24 (Fig. 7A).

7.1.3. Purificación por cromatografía de intercambio iónico DEAE celulosa

Los eluidos obtenidos mediante la cromatografía de afinidad, que presentaron mayor actividad enzimática, se seleccionaron y se pasaron a una segunda columna, de intercambio iónico DEAE esta segunda cromatografía por su afinidad iónica con la PTPEh puede captarla. En este proceso cromatográfico se obtuvieron 37 eluidos de los cuales sólo cuatro, presentaron una alta actividad enzimática de fosfatasa más de dos unidades de absorbancia (Fig. 7B).

A)



B)

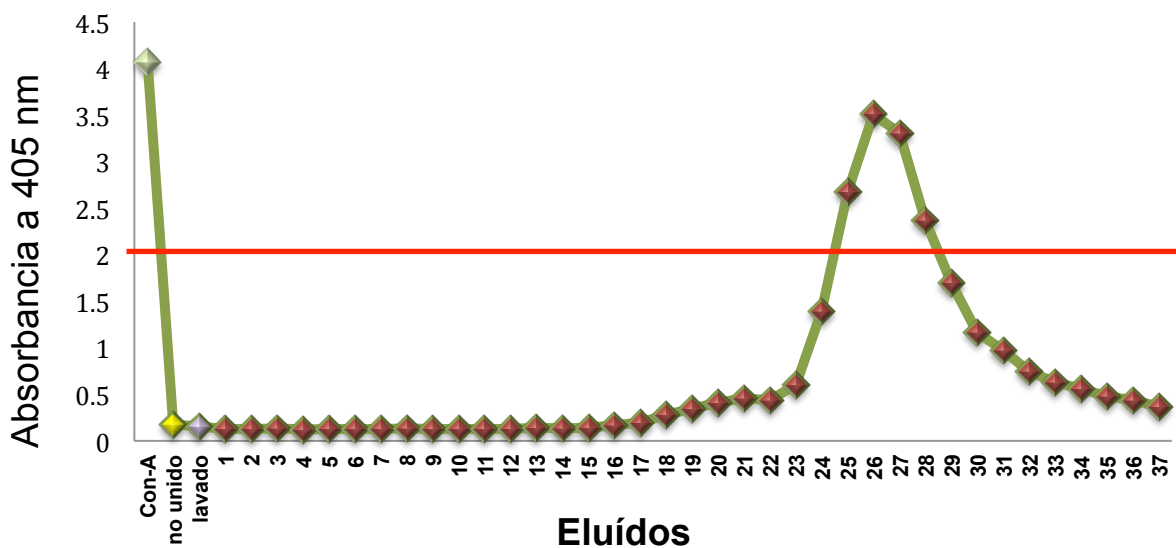


Figura 7. Purificación de la PTPEh. A) Análisis de la actividad enzimática en el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad Con-A. SN2 (sobrenadante 2), No unido (proteínas sin afinidad a Con-A) y lavado de la columna. Con-A, 1-35 eluidos obtenidos. B) Análisis de la actividad enzimática en el proceso de purificación mediante la columna de intercambio iónico DEAE celulosa.

7.1.4. Análisis electroforético del perfil de proteínas eluidas de columnas de Con-A y DEAE

En la segunda fase de la purificación que correspondió a la columna de Con-A, se observaron los perfiles proteicos. En el SN2 se observó un amplio rango de proteínas de diversos pesos moleculares, sin embargo, conforme avanzó el proceso de purificación la cantidad de proteínas presentes disminuyó y la proteína de interés se enriqueció, como se observa en la (Figura 8A). Por último, en la columna de intercambio iónico DEAE se realizó el perfil de proteínas de los eluidos 23 al 28 donde se observó una banda constante en los eluidos con alta actividad enzimática con un peso molecular de 55 kDa. (Figura 8B).

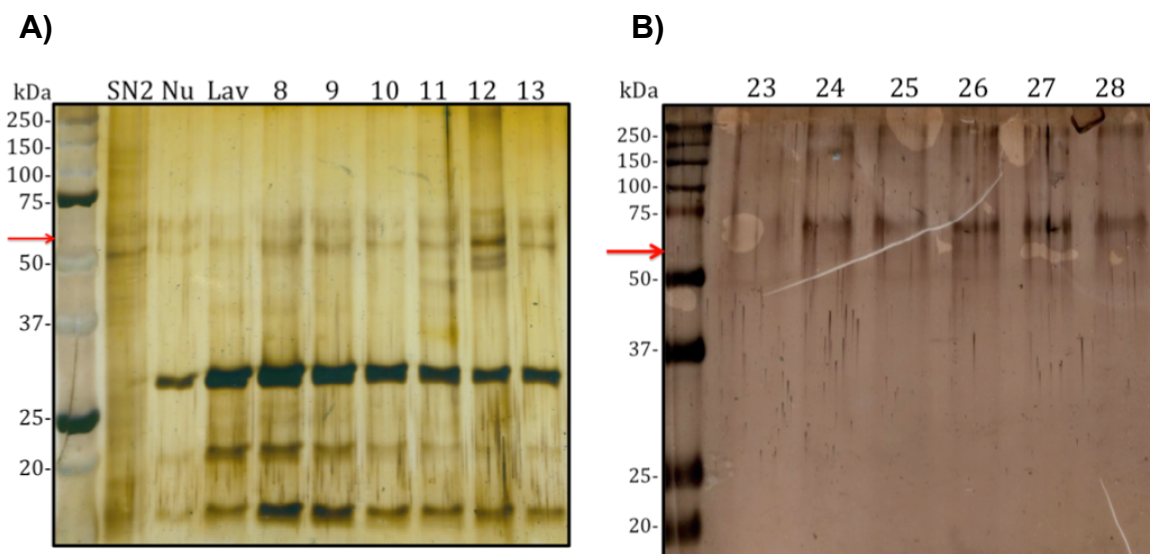


Figura 8. Análisis electroforético en geles SDS-PAGE del perfil de proteínas obtenidas en el proceso de purificación. A) Proceso de purificación por Con-A: SN2, Nu (No Unido), Lav (lavado) y eluidos del 8 al 13. **B)** Proceso de purificación por DEAE, eluidos del 23 al 28 obtenidos de la purificación por DEAE. Teñidos con plata.

7.2. Efecto de la PTPEh en la producción de las citocinas por los macrófagos murinos

Se observó que la PTPEh después de la incubación con los macrófagos, indujo la producción de citocinas como: TNF- α , IL-12, IL-10 e IL-1 β . Para TNF- α se observó una producción de 1900 pg/mL en los macrófagos que fueron incubados con la PTPEh mientras que la condición sin estímulo (basal) no hubo producción y el control positivo (LPS) mostró una producción elevada de 3297.51 pg/mL (Figura 9). Por otro lado, al determinar la producción de IL-12 se ve un comportamiento donde los macrófagos sin estímulo presentaron una baja producción de 35.06 pg/mL de esta citocina mientras que la condición con LPS presentó una cantidad de 1200 pg/mL y los macrófagos incubados con la PTPEh produjeron 1100 pg/mL lo que muestra que, para la producción de esta citocina, la PTPEh está involucrada (Figura 10). En cuanto a la IL-10 la condición basal no mostró una producción considerable mientras que para la condición con los macrófagos y LPS se vió una producción de 1500 pg/mL y en la condición con la PTPEh se dio una producción de 400 pg/mL (Figura 11). Por último, se cuantificó IL-1 β la cual en la condición sin estímulo no mostró producción, mientras que en la condición con LPS fue de 22.26 pg/mL y la condición con PTPEh fue de 15.81pg/mL (Figura 12).

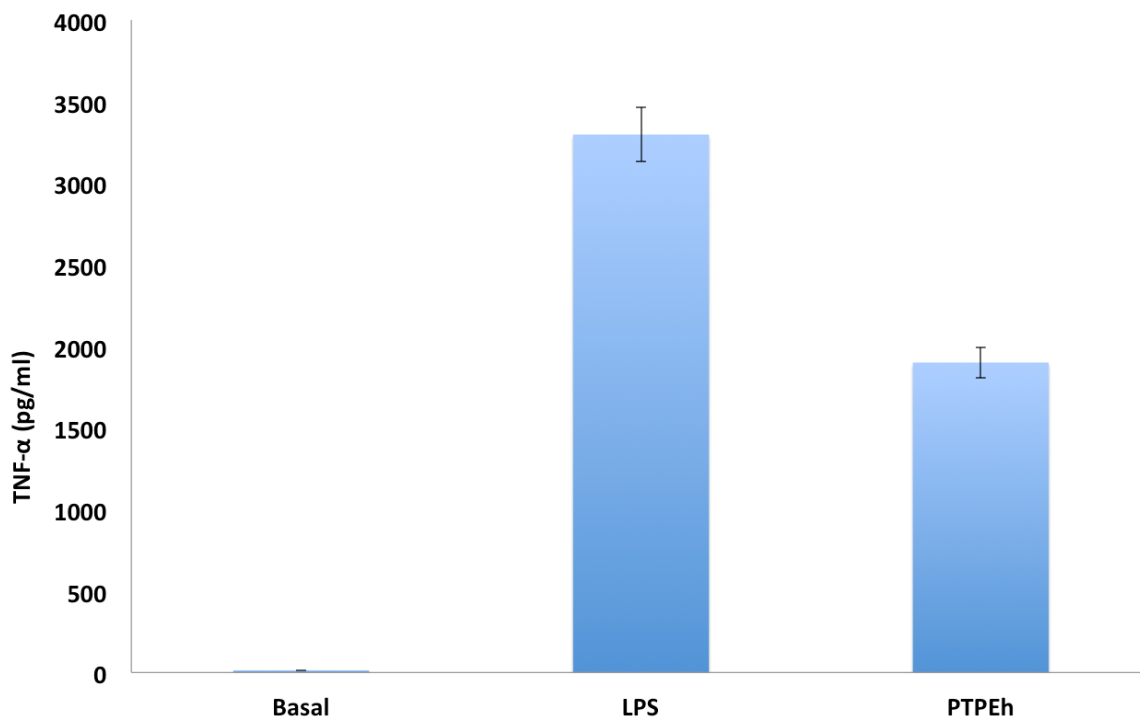


Figura 9. Efecto de la PTPEh en la producción de TNF- α por los macrófagos. Macrófagos sin estímulo (Basal), macrófagos estimulados con lipopolisacárido (LPS) a 100 ng/mL y los macrófagos incubados con la PTPEh.

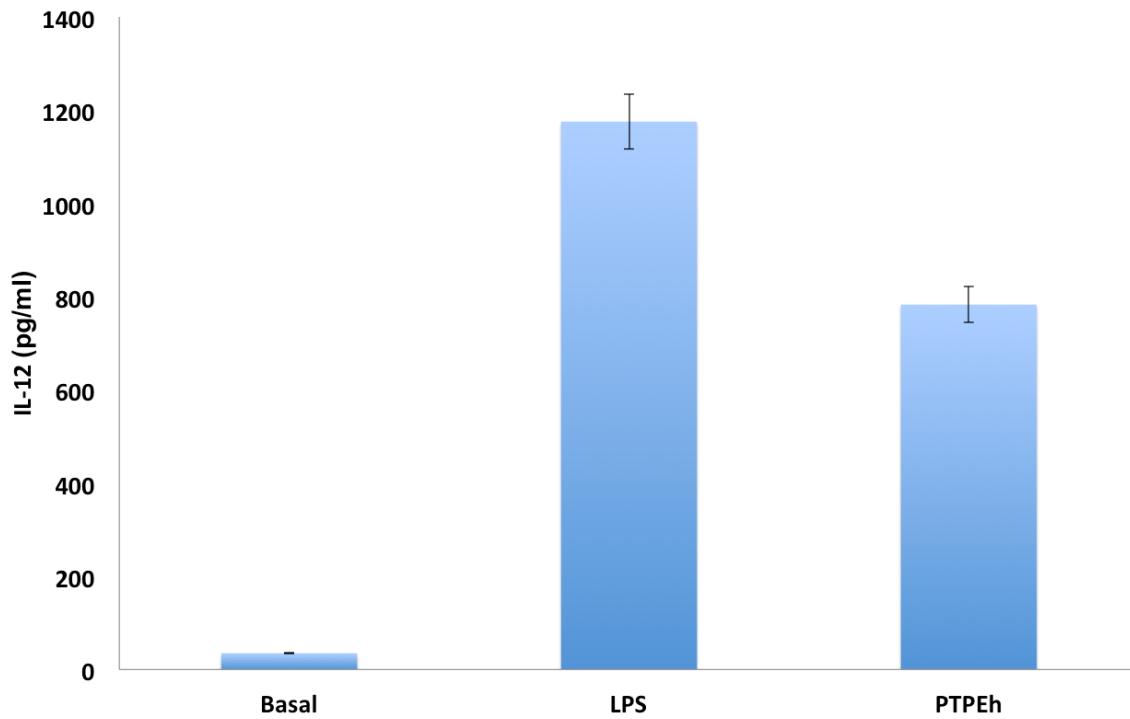


Figura 10. Efecto de la PTPEh en la producción de IL-12 por los macrófagos. Macrófagos sin estímulo (Basal), macrófagos estimulados con lipopolisacárido (LPS) a 100 ng/mL y los macrófagos incubados con la PTPEh.

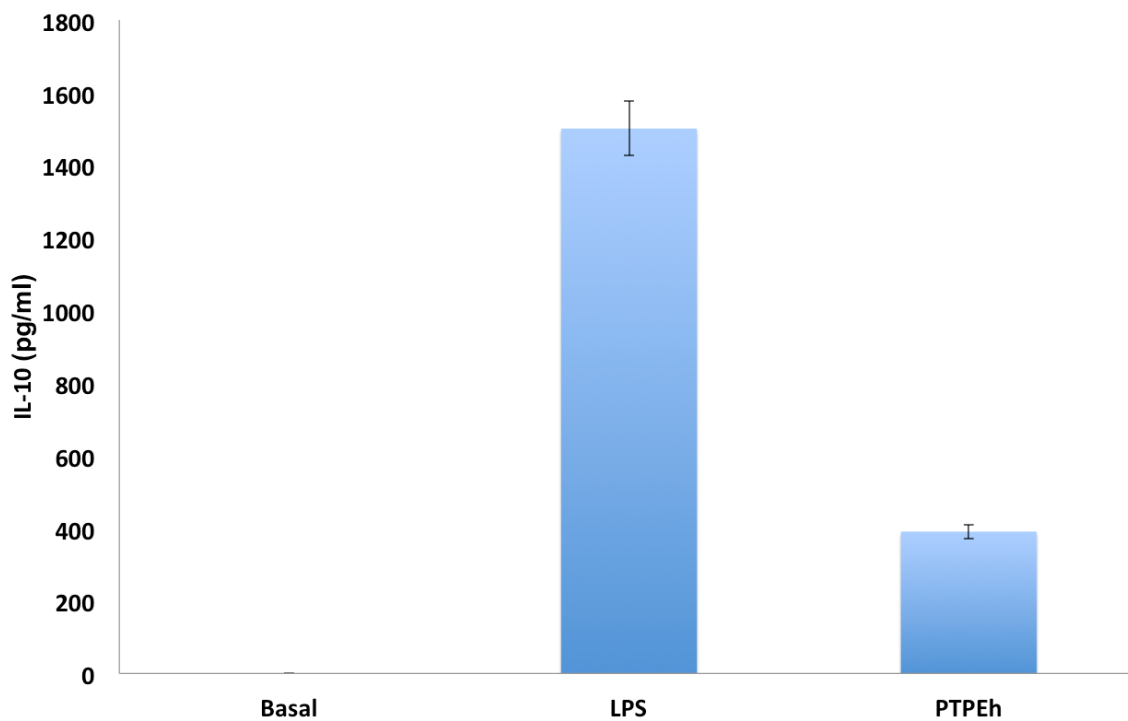


Figura 11. Efecto de la PTPEh en la producción de IL-10 por los macrófagos. Macrófagos sin estímulo (Basal), macrófagos estimulados con lipopolisacárido (LPS) a 100 ng/mL y los macrófagos incubados con la PTPEh.

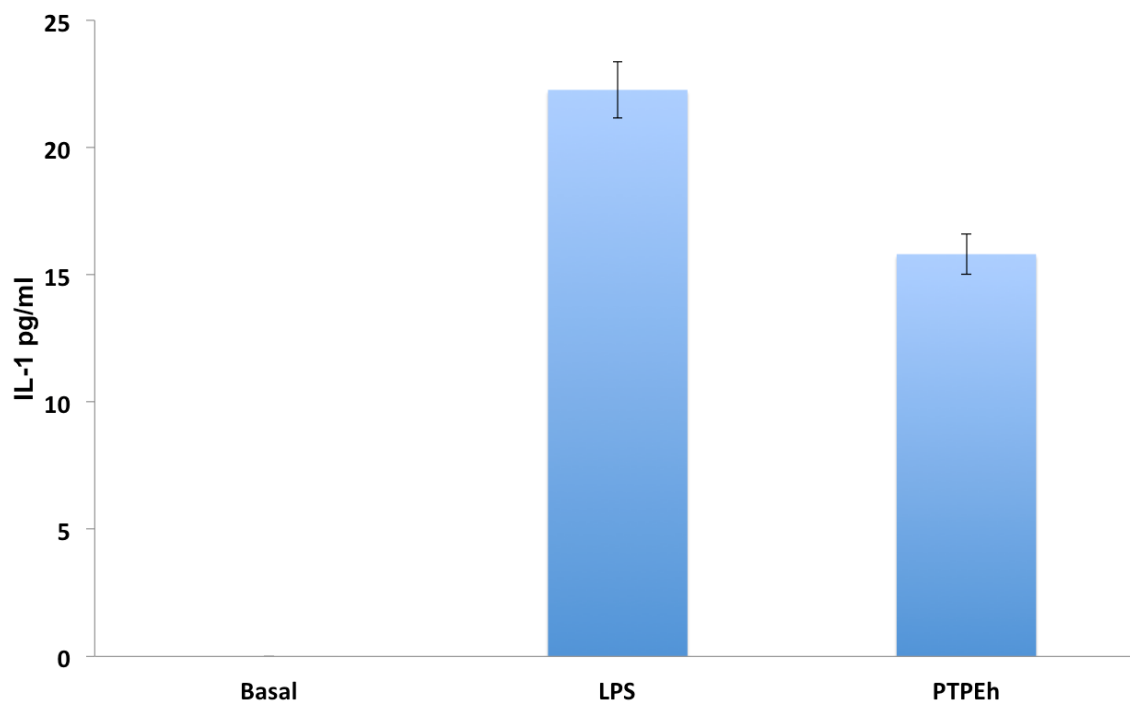


Figura 12. Efecto de la PTPEh en la producción de IL-1 β por los macrófagos. Macrófagos sin estímulo (Basal), macrófagos estimulados con lipopolisacárido (LPS) a 100 ng/mL y los macrófagos incubados con la PTPEh.

7.3. Participación de los TLR-2 y TLR-4 en la producción de las citocinas por los macrófagos incubados con la PTPEh

Producción de TNF- α

La cuantificación de TNF- α mostró una producción de: $2,100 \pm 121.8$ pg/mL al incubar a los macrófagos con la PTPEh de esto se partió como 100 % para determinar el porcentaje de inhibición, dando como resultado que al bloquear con los anticuerpos α -TLR-2 la producción fue de: $1,297 \pm 153.7$ pg/mL disminuyendo en un 38 % mientras que cuando se utilizó el bloqueador α -TLR-4 la producción de TNF- α fue de: $1,134 \pm 158.9$ pg/mL disminuyó en un 46 % y cuando se utilizaron los dos bloqueadores se observó una producción de: $1,030 \pm 115.5$ pg/mL lo que reflejó una disminución del 51 % en la producción de TNF- α por los macrófagos murinos (Figura 13).

Producción de IL-12 (p40)

Los macrófagos produjeron una concentración de IL-12 de: 517 ± 13.6 pg/mL al incubar a los macrófagos con la PTPEh de esto se partió como 100 % para determinar el porcentaje de inhibición, dando como resultado que al bloquear con α -TLR-2 la producción fue de: 208.89 ± 12.2 pg/mL disminuyendo en un 59.6 % mientras que cuando se utilizó el bloqueador α -TLR-4 la producción de IL-12 fue de: 181.37 ± 17.7 pg/mL disminuyendo en un 64.92 % y cuando se utilizaron los dos bloqueadores se observó una

producción de: 89.83 ± 11.6 pg/ml lo que refleja una disminución del 82.6 % en la producción de IL-12 por los macrófagos murinos (Figura 14).

Producción de IL-10

Al cuantificar IL-10 se observó una producción de: 403 ± 83.1 pg/mL en los macrófagos incubados con la PTPEh, de esto se partió como 100 % para determinar el porcentaje de inhibición, dando como resultado que al bloquear con α -TLR-2 la producción fue de: 97 ± 13.2 pg/mL disminuyendo en un 76 % mientras que cuando se utilizó el bloqueador α -TLR-4 la producción de IL-10 fue de: 286 ± 43.2 pg/mL disminuyó en un 29 % y cuando se utilizaron los dos bloqueadores se observó una producción de: 74 ± 9.6 pg/mL lo que reflejó una disminución del 81 % en la producción de IL-10 por los macrófagos murinos (Figura 15).

Producción de IL-1 β

Por último, la cuantificación de IL-1 β mostró una producción de: 16 ± 2.5 pg/mL al incubar a los macrófagos con la PTPEh de esto se partió como 100 % para determinar el porcentaje de inhibición, dando como resultado que al bloquear con α -TLR-2 la producción fue de: 10 ± 1.8 pg/mL disminuyendo en un 33 % mientras que cuando se utilizó el bloqueador α -TLR-4 la producción de IL-1 β fue de: 6.57 ± 1.2 pg/mL disminuyó en un 58 % y cuando se utilizaron los dos bloqueadores se observó una producción de: $4 \pm .9$ pg/mL lo que refleja una disminución del 74 % en la producción de IL-1 β por los macrófagos murinos (Figura 16).

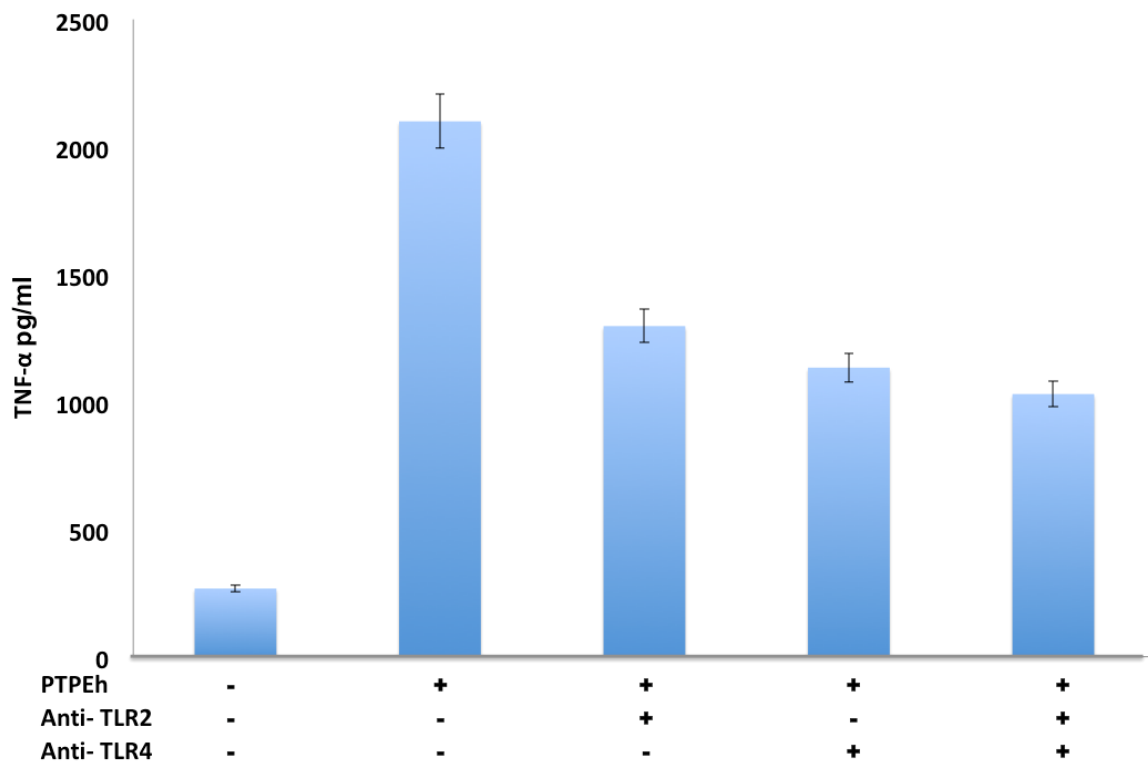


Figura 13. Producción de TNF- α por los macrófagos al incubar con la PTPEh y utilizando anticuerpos bloqueadores de TLR-2 y TLR-4.

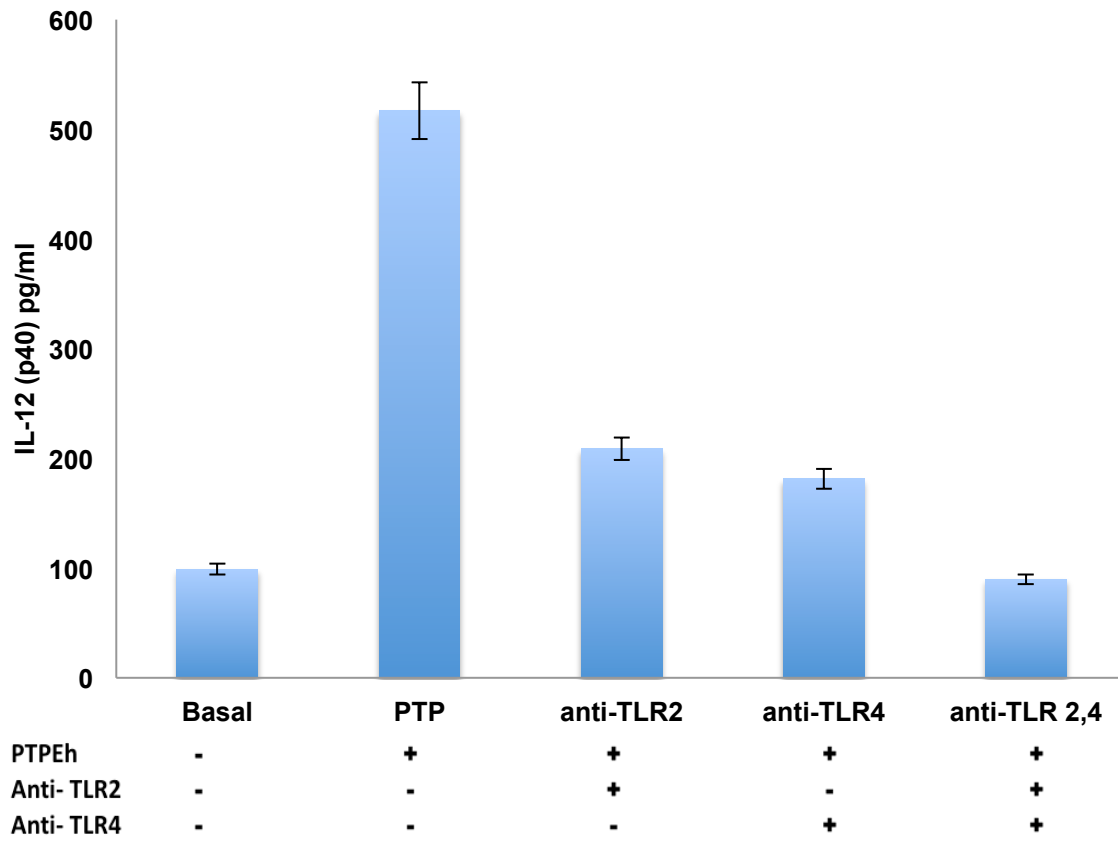


Figura 14. Producción de IL-12 por los macrófagos al incubar con la PTPEh y utilizando anticuerpos bloqueadores de TLR-2 y TLR-4.

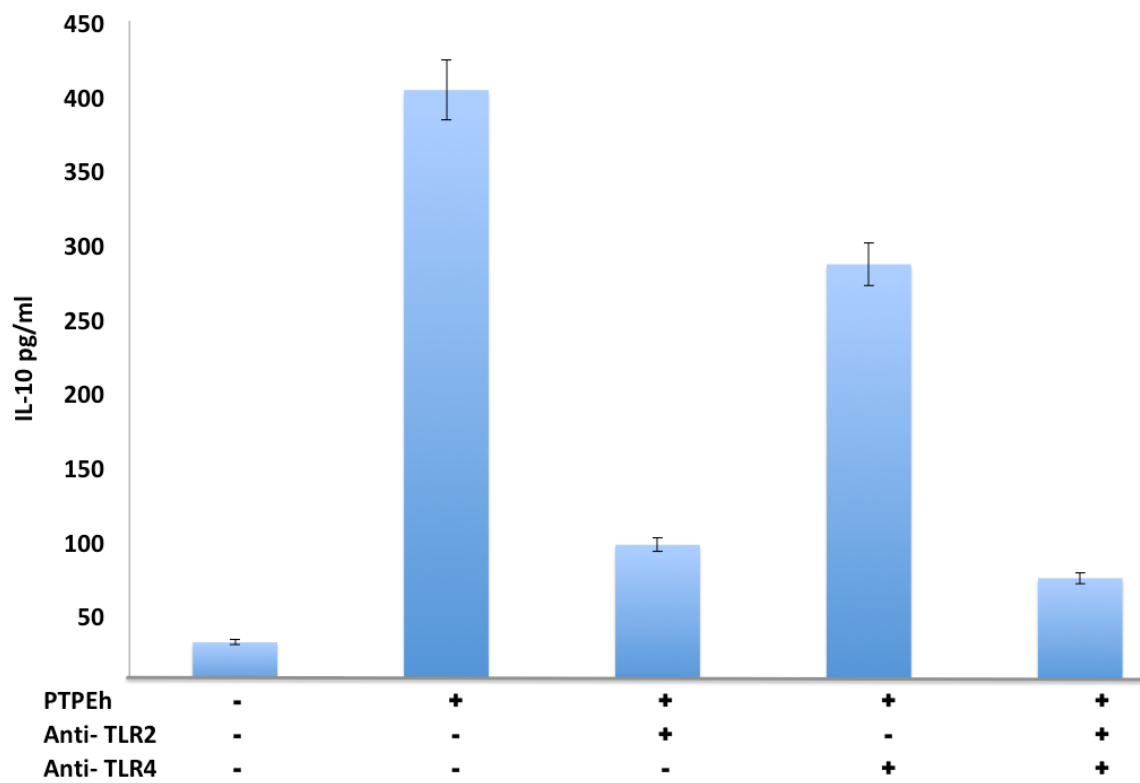


Figura 15. Producción de IL-10 por los macrófagos al incubar con la PTPEh y utilizando anticuerpos bloqueadores de TLR-2 y TLR-4.

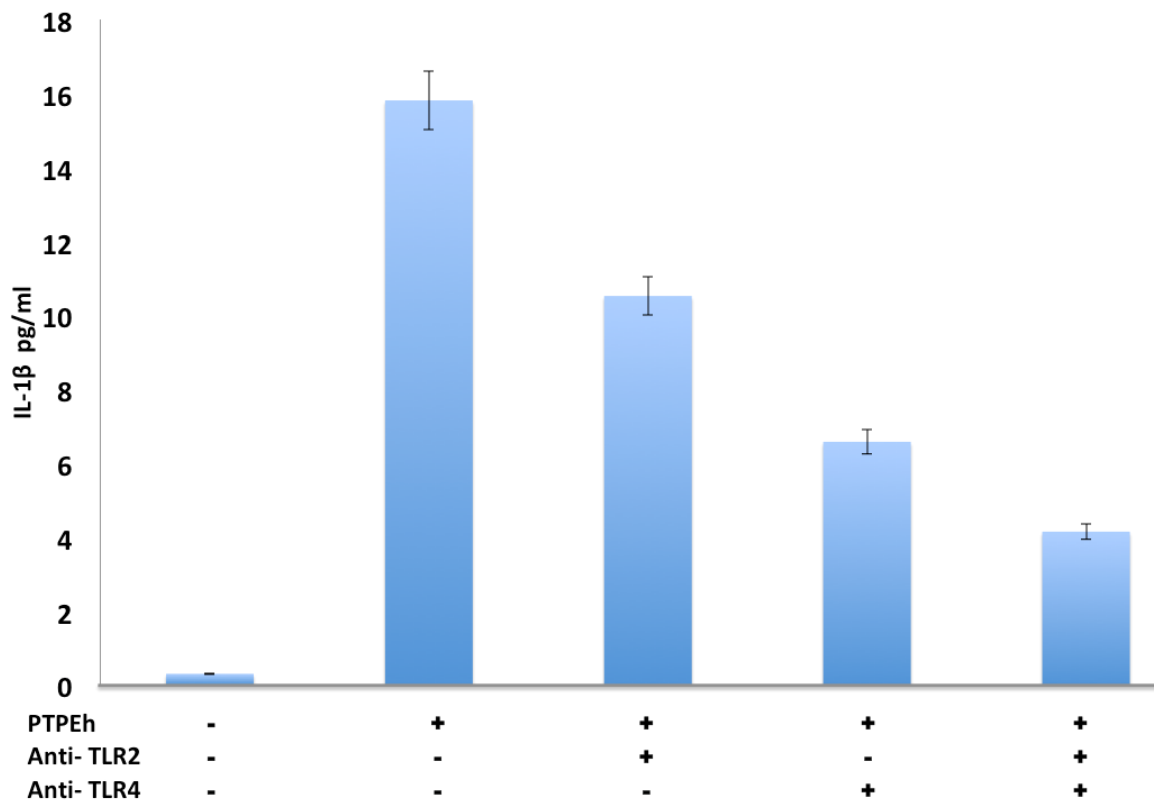


Figura 16. Producción de IL-1 β por los macrófagos al incubar con la PTPEh y utilizando anticuerpos bloqueadores de TLR-2 y TLR-4.

8. Discusión

Las PTPs son reguladores clave en las vías de transducción de señales, el ciclo celular, el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la transformación celular (Anwar *et al.*, 2013).

Diversos estudios han descrito que la secreción o exposición del dominio catalítico de las enzimas al exterior de la célula pueden modular diversas vías de señalización relacionadas con el proceso de invasión por *E. histolytica*. En el caso de *Leishmania major*, se describió una PTP asociada a la membrana en los promastigotes metacíclicos, cuya función pudiera tener un papel en la invasión a la célula hospedera (Escalona *et al.*, 2010).

En los estudios realizados para identificar los antígenos de *E. histolytica* se encontraron ocho genes diferentes entre los cuales se observó una fosfatasa ácida la cual podría estar asociada a la virulencia del microorganismo (Flores, 2012). También se han reportado la expresión de genes para las proteínas fosfatasas al contacto con la mucosa del colon humano (Thibeaux *et al.*, 2013).

En este trabajo se realizó la purificación de una fosfatasa de membrana en los trofozoítos de *E. histolytica* a partir de cromatografía de afinidad e intercambio iónico. Este proceso de purificación fue descrito por Aguirre y col., 2000. Los resultados mostraron la presencia de la actividad enzimática en el fraccionamiento subcelular previo a la purificación en el cual se

observó que la fracción solubilizada por el detergente presentó mayor actividad enzimática específica.

La glicosilación es un proceso postraducciona que tienen las proteínas, en el caso particular de las fosfatasa se ha observado que la mayoría de ellas se encuentran glicosiladas, lo que favorece a este primer paso de purificación, en la columna de afinidad ya que esta columna retiene proteínas que presentan carbohidratos en su estructura. Como observamos en los resultados la mayor actividad enzimática se presentó a lo largo de 12 eluidos a partir del número ocho, sin embargo, la cantidad de proteína disminuyó conforme avanzó el proceso de purificación.

Lo anterior se hace evidente en los perfiles de proteínas, en los que el SN2 presentó una mayor cantidad de proteínas, después de la purificación por cromatografía en Con-A pueden distinguir principalmente tres bandas con pesos moleculares aproximados de 20, 30 y 54 kDa. Para la última cromatografía por intercambio iónico DEAE, las proteínas con menor peso molecular no logran unirse a esta resina y se eliminan en el proceso de purificación, quedando solo la proteína de 54 kDa la cual posiblemente corresponde a la PTPEh.

Resultados similares son obtenidos en el proceso de purificación de la proteína gp63 obtenida de *Leishmania mexicana*, la cual se encuentra en la membrana y fue obtenida a partir de un proceso que consistió en un fraccionamiento celular y purificación por cromatografía de afinidad Con-A e intercambio iónico (DEAE). En este estudio también se analizó la actividad enzimática en los diferentes eluidos y se realizaron geles SDS-PAGE para el

perfil de las proteínas. Los resultados mostraron que la cantidad de proteínas disminuyó a lo largo del proceso de purificación hasta obtener la gp63 pura (Estrada-Figueroa *et al.*, 2018).

Se determinó que la PTPEh tiene efecto en la producción de las citocinas pro-inflamatorias, por los macrófagos murinos ya que estas aumentaron considerablemente. Lo que sugiere que la PTPEh puede estar relacionada con la modulación de la producción de citocinas pro-inflamatorias.

Los efectos citotóxicos del TNF- α pueden estar mediados en parte por ROS y la apoptosis dependiente de las mitocondrias (Cao *et al.* 2015). Se cree que el TNF- α inicia tres vías de señalización implicadas en la lesión celular y la apoptosis: la vía de señalización apoptótica, la vía de señalización c-Jun N-terminal cinasa (JNK) y la vía de señalización de NF- $\kappa\beta$ (Yang *et al.*, 2007).

Los efectos de una producción elevada de TNF- α en el organismo es muy diversa. En este estudio se encontró una elevada producción de TNF- α lo que puede estar relacionado con el daño que amiba produce al tejido hepático. Se ha encontrado una asociación entre la mayor producción de TNF- α y la diarrea por *E. histolytica*. Una respuesta inmune sobre-agresiva de TNF- α puede llevar a un aumento de la inflamación y por lo tanto a la enfermedad ocasionada por este parásito (Peterson *et al.*, 2010).

Por otro lado, la aparición espontánea de inflamación intestinal severa ocurre en los ratones deficientes en IL-10 (mutante IL10T) o su receptor (CRF2-4), y este efecto se revirtió cuando existe una señalización adecuada de IL-10. Pues esta citocina tiene un papel fundamental en el mantenimiento del

homeostasis intestinal (Ray *et al.*, 2015). Lo que sugiere que los niveles elevados de IL-10 obtenidos en este estudio podrían ser en respuesta a la señal de inflamación dada por TNF- α .

La IL-12 que promueve inflamación y el desarrollo de las enfermedades inflamatorias crónicas (Sun *et al.*, 2015). Esta citocina activa las células NK y NKT que, a su vez, producen el IFN- γ . Los macrófagos aumentan la expresión de la NADPH oxidasa y óxido nítrico sintetasa en presencia de IL-12 y en consecuencia activó los linfocitos T y se promovió la secreción de citocinas tipo Th1 (Vivanco *et al.*, 2007). Dado que en este estudio la producción de esta citocina fue mayor al incubar los macrófagos con la PTPEh respecto a los macrófagos basales se determina que la respuesta que promueve es pro-inflamatoria.

La liberación de la citocina IL-1 β y muchos otros eventos moleculares indefinidos ocurren en la interacción de *E. histolytica* y los macrófagos formando un área de proteínas altamente interactivas que implican al citoesqueleto de los macrófagos como un sensor para el contacto con *E. histolytica* que conduce a las respuestas inmunes inflamatorias (St-Pierre *et al.*, 2017, Keyel, 2014).

Los efectos que tiene la PTPEh sobre los macrófagos indican que esta podría estar participando como un factor de virulencia pues el patrón de citocinas que desencadena puede ser benéfico para el desarrollo de la amibiosis.

La función de los TLRs, durante las infecciones protistas han sido ampliamente descritas. TLR-2 y TLR-4 son los principales receptores implicados en el reconocimiento de protistas parásitos, tales como: *Leishmania* spp, *Trypanosoma cruzi*, *T. gondii*, *Plasmodium falciparum* y *E. histolytica*. Los estudios han demostrado que los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp, pueden activar el TLR-4 expresado en las células epiteliales corneales, induciendo las citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas en la superficie ocular (Cano *et al.*, 2017).

Los TLR-2 y TLR-4 son moléculas que reconocen antígenos de microorganismos patógenos como: la lectina Gal/GalNac y lipopéptidos fosfoglicano de *E. histolytica* (Ashour, 2015; Maldonado-Bernal *et al.*, 2005).

La sobreexpresión de ARNm de TLR-2 y TLR-4 en los neutrófilos polimorfonucleares de felinos estimulados sugiere que estos receptores están implicados en la respuesta inmune del hospedero a través del reconocimiento de PAMPs de *Microsporium canis* (Cambier *et al.*, 2016).

Los TLRs cumplen con muchos de los criterios requeridos para ser considerados como posibles blancos terapéuticos y ahora hay evidencia de la participación de estos receptores en múltiples condiciones. Los TLRs en la enfermedad en gran parte provienen de una mayor expresión durante esta, los ratones knockout en diferentes TLRs mostraron ser resistentes a diversas enfermedades, sus ligandos agravan la inflamación en modelos infecciosos y diferencias genéticas en TLR o las proteínas de señalización están vinculadas a la susceptibilidad. Sin embargo, aunque estos receptores podrían ser considerados como blanco terapéutico por su implicación en el

desarrollo de la enfermedad, aún no está demostrado que esto ocurra (Tartey *et al.*, 2017).

En otros estudios se encontró que, la neutralización de TLR-2 y / o la inhibición de la señalización de TLR-4 fue eficaz para reducir la expresión de citocinas en las células beta en la diabetes tipo 2 (Nackiewicz *et al.* 2014), lo cual es similar a lo encontrado en este estudio al bloquear TLR-2 y TLR-4. En otro estudio se reportó que, los macrófagos deficientes en TLR-9 redujeron la expresión de IL-12 y TNF- α , en los macrófagos incubados con *L. major* (Pandey *et al.*, 2015). Se analizó la participación de TLRs en la producción de citocinas por los macrófagos incubados con lipofosfoglicano de *L. mexicana*. Los resultados sugieren que se une a los receptores TLR-2 y TLR-4 en los macrófagos humanos, pues al bloquear estos receptores la producción de citocinas pro-inflamatorias disminuyó (Rojas-Bernabé *et al.*, 2014). Lo anterior, indica un posible reconocimiento de la PTPEh por los TLR-2 y TLR-4 ya que activa la producción de las diferentes citocinas y este porcentaje de secreción se modificó al bloquear estos receptores. Los resultados indican que la PTPEh está interaccionando con receptores de la respuesta inmune innata, los cuales desencadenan una vía de señalización que está involucrada en la producción de citocinas (Figura 17).

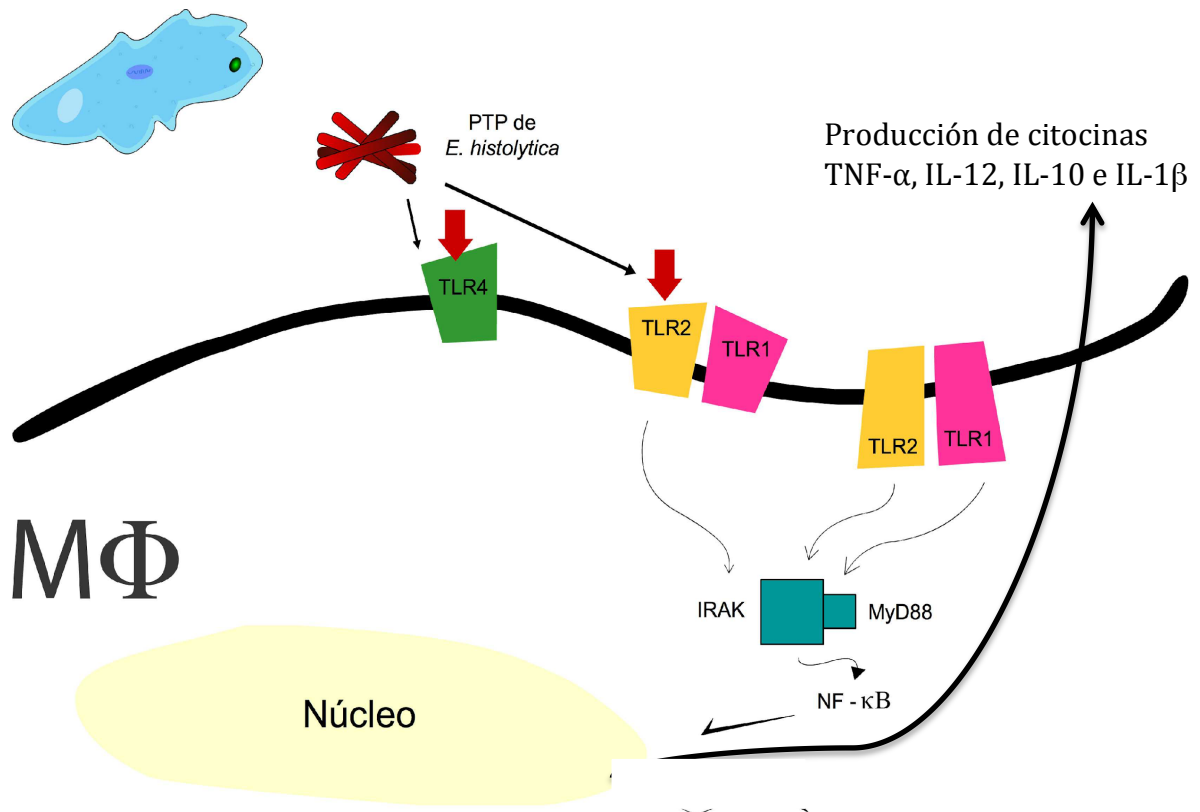


Figura 17. Modelo hipotético de la interacción de PTPeH con los receptores TLR-2 y TLR-4 y producción de citocinas pro-inflamatorias.

9. Conclusiones

Se logró purificar la PTPEh la cual mostró una alta actividad enzimática y el perfil de proteínas mostró la presencia de la proteína en el peso de 54 kDa coincidiendo con las características de esta enzima.

Los macrófagos diferenciados a partir de células de la médula ósea, aumentaron su producción de las citocinas (TNF- α , IL-12, IL-10 e IL-1 β) al ser incubados con la PTPEh.

Al bloquear TLR-2 y TLR-4 e incubarlos con la PTPEh se observó una disminución en la producción de las citocinas TNF- α , IL-12, IL-10 e IL-1 β en diferentes proporciones. Los resultados indican que los receptores TLR-2 y 4 están involucrados en el reconocimiento de esta enzima.

10. Perspectivas

1. Analizar la cascada de señalización de TLR-2 activada por la PTPEh en macrófagos
2. Analizar la posible activación del inflamosoma por la PTPEh en macrófagos

11. Bibliografía

1. Acuña, A.M., Rosa, D., Colombo, H., Saúl, S., Alfonso, A., Combol, A., Castelló, A., y Zanetta.(1999). Parasitosis intestinales en guarderías comunitarias de Montevideo. *Revista Medica Uruguay*; 15: 24-33
2. Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G. , Fensome, R. A., Fredericq, S. , James, T. Y., Karpov, S. , Kugrens, P. , Krug, J. , Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J. , Lynn, D. H., Mann, D. G., Mccourt, R. M., Mendoza, L. , Moestrup, Ø. , Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. y Taylor, M. F. (2005), The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52: 399-451.
3. Aguirre-García, M., Cerbón, J., y Talamás-Rohana, P., (2000). Purification and properties of an acid phosphatase from *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS. *International Journal for Parasitology*, 30(5): 585–591.
4. Anwar, T., y Gourinath, S., (2013). Analysis of the Protein Phosphotome of *Entamoeba histolytica* Reveals an Intricate Phosphorylation Network. *PLoS ONE*,8(11): e78714.
5. Ashour, D. S., (2015). Toll-like receptor signaling in parasitic infections. *Expert Review of Clinical Immunology*, 11(6): 771–780.
6. Blazquez, S., Rigotherier, M.-C., Huerre, M., y Guillén, N., (2007). Initiation of inflammation and cell death during liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* depends on activity of the galactose/N-acetyl-d-galactosamine lectin. *International Journal for Parasitology*, 37(3-4): 425–433.
7. Biblioteca virtual en salud BVS, (2019) Amebozoos, tomado de: http://www.bvs.hn/php/decsws.php?tree_id=SP4.011.107.238.416.720&lang=es
8. Cambier, L., C., Heinen, M., P., Bagut, E., T., Antoine, N., A., y Mignon, B., R., (2016). Overexpression of TLR-2 and TLR-4 mRNA in feline polymorphonuclear neutrophils exposed to *Microsporium canis*. *Veterinary Dermatology*, 27(2): 78–e22.

9. Cano, A., Mattana, A., Woods, S., Henriquez, F., L., Alexander, J, y Roberts, C., W.(2017). *Acanthamoeba* activates macrophages predominantly through Toll-like receptor 4- and MyD88-dependent mechanisms to induce interleukin-12 (IL-12) and IL-6. *Infection and Immunity* 85: e01054-16.
10. Cao, Y., Y., Chen, Z., W., Gao, Y., H., Wang, X., X., Ma, J., Y., Chang, S., F., Qian, J., Y., y Ge J., B., (2015). Exenatide Reduces Tumor Necrosis Factor- α -induced Apoptosis in Cardiomyocytes by Alleviating Mitochondrial Dysfunction. *Chinese Medical Journal J*;128:3211 - 8
11. Carrero, J., C., Cervantes-Rebolledo, C., Aguilar-Díaz, H., Díaz-Gallardo, M., Y., Laclette, J., P., y Morales-Montor, J., (2007). The role of the secretory immune response in the infection by *Entamoeba histolytica*, *Parasite Immunology*, 29: 331–338
12. CDC (2017) Amebiasis [*Entamoeba histolytica*], tomado de: <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>
13. Collado, V., M., Porras, R., Cutuli, M., T., y Gómez-Lucía, E., (2008). The innate immune system i: its mechanisms, *Complutense de Ciencias Veterinarias* 2(1): 1-16
14. Domínguez, A., Zentella, A., y Velázquez, J., R., (2009). Control molecular de la inflamación: regulación de los receptores tipo toll, *REB* 28(4): 125-131
15. Duque, M., A., y Rojas, M., (2007), Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente, *Inmunología*, Vol. 26 (2): 73-86.
16. Escalona-Montaño, A., R., Pardavé-Alejandre, D., Cervantes-Sarabia, R., García-López, P., Gutiérrez-Quiroz, M., Gutiérrez-Kobeh, L., Becker-Fausser, I., y Aguirre-García, M., M., (2010) *Leishmania mexicana* promastigotes secrete a protein tyrosine phosphatase. *Parasitology Research* 107(2):309-315.
17. Estrada-Figueroa, L., A., Díaz-Gandarilla, J., A., Hernández-Ramírez, V., I., Arrieta-González, M., M., Osorio-Trujillo, C., Rosales-Encina, J., L., y Talamás-Rohana, P., (2018). *Leishmania mexicana* gp63 is the enzyme

- responsible for cyclooxygenase (COX) activity in this parasitic protozoa. *Biochimie*, 151: 73–84.
18. Flores, C., O., (2012) IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE *Entamoeba histolytica* VIRULENTA, Tesis (Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia) UANL, 2012.
 19. Fragoso, J., M., Sierra, M., Vargas, G., y Barrios, A, (2013). factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades cardiovasculares: biología molecular y genética, *Gaceta médica de México*, 149: 521-30.
 20. Fonte, G., L., (2003), Amebiasis intestinal. Un problema de salud sobredimensionado. Tesis (Doctorado en Ciencias Médicas) CNICM, 106
 21. Galván-Moroyoqui, J., M., Domínguez-Robles, M., C., y Meza, I., (2011) Pathogenic bacteria prime the induction of Toll-like receptor signalling in human colonic cells by the Gal/GalNAc lectin Carbohydrate Recognition Domain of *Entamoeba histolytica*, *Parasitology*, 41: 1101–1112
 22. Gómez, J., C., Cortés, J., A., Cuervo, S., I., y López, M., C., (2007) Amebiasis intestinal, *Asociación colombiana de infectología*, 11(1): 36-45
 23. Gómez S., J., Talamás, R., P., y Aguirre, G., M., (2014), Proteínas fosfatasa de parásitos: más allá de una función. *REB*, 33(1): 4-12.
 24. Grosse A. (2016), Diagnosis of colonic amebiasis and coexisting signet- ring cell carcinoma in intestinal biopsy, *World J Gastroenterol*, 22(36): 8234-8241
 25. Kammanadiminti, S., J., Mann, B., J., Dutil, L., y Chadee, K., (2004). Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica*. *The FASEB Journal*, 18(1): 155–157.
 26. Kawai, T., y Akira, S. (2005). Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*, 17(4): 338–344.
 27. Kenny, E. F., y O'Neill, L. A. J. (2008). Signalling adaptors used by Toll-like receptors: An update. *Cytokine*, 43(3), 342-349.
 28. Keyel, P. A. (2014). How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. *Cytokine*, 69(1): 136–145.
 29. Kumar, H., Kawai, T., y Akira S, (2011) Pathogen Recognition by the Innate Immune System, *Immunology*, 30:16–34

30. Leippe, M., Andrä, J., Nickel, R., Tannich, E., y Muller-Eberhard, H. J. (1994). Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore bacterial cytoplasmic membranes. *Molecular Microbiology*, 14(5): 895–904.
31. Linford, A., S., Jiang, N., M., Edwards, T., E., Sherman, N., E., Van, W., C., Stewart, L., J., Myler, P., J., Staker, B., L., y Petri, W., A., (2014), Crystal structure and putative substrate identification for the *Entamoeba histolytica* low molecular weight tyrosine phosphatase, *Molecular & Biochemical Parasitology*, 193(1): 33–44.
32. Lobo-Silva, D., Carriche, G., M., Castro, A., G., Roque, S., y Saraiva, M., (2016). Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1): 297.
33. Loftus, B., Anderson, L., Davies, R., Alsmark, C., Samuelson, J., y Amedeo, P., (2005) The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*, 43:865-868
34. Maldonado-Bernal, C., Kirschning, C., J., Rosenstein, Y., Rocha, L., M., Rios-Sarabia, N., Espinosa-Cantellano, M., y Isibasi, A., (2005). The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. *Parasite Immunology*, 27(4): 127–137.
35. Martinez-Orellana, P., Montserrat-Sangrá, S., Quirola-Amores, P., Noem-González, y Solano-Gallego, L., (2018) Cytokine Effect of TLR3, TLR4, and TLR7 Agonists Alone or Associated with *Leishmania infantum* Antigen on Blood from Dogs, *BioMed Research International*.
36. May, O., (2012), Toll-like Receptors: Immune Signaling Sentinels tomado de <https://www.caymanchem.com/news/toll-like-receptors>
37. Moonah, S. N., Jiang, N. M., y Petri, W. A. (2013). Host Immune Response to Intestinal Amebiasis. *PLoS Pathogens*, 9(8).
38. Nackiewicz, D., Dan, M., He, W., Kim, R., Salmi, A., Rützi, S., y Ehses, J. A. (2014). TLR2/6 and TLR4-activated macrophages contribute to islet

- inflammation and impair beta cell insulin gene expression via IL-1 and IL-6. *Diabetologia*, 57(8): 1645–1654.
39. Olivos-García, A., Saavedra, E., Avendaño, M., N., y Pérez-Tamayo, R., (2011) Amibiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*. *Fac Med UNAM*. 54(2). Marzo-Abril.
 40. Pandey, S., P., Doyen, N., Mishra, G., C., Saha, B., y Chandel, H., S., (2015). TLR9-deficiency reduces TLR1, TLR2 and TLR3 expressions in *Leishmania major*-infected macrophages. *Experimental Parasitology*, 154: 82–86.
 41. Peterson, K., M., Shu, J., Duggal, P., Haque, R., Mondal, D., y Petri, W., A., (2010). Association between TNF-alpha and *Entamoeba histolytica* Diarrhea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(4), 620-625.
 42. Petri Jr. W. A. (2008) Intestinal invasion by *Entamoeba histolytica* shahram solaymani- mohammadi. *subcell biochem*, 47: 221-232.
 43. Quach, J., Moreau, F., Sandall, C., y Chadee, K. (2018). *Entamoeba histolytica*-induced IL-1 β secretion is dependent on caspase-4 and gasdermin D. *Mucosal Immunology*. _####_
 44. Ramírez-Tapia, A., L., Baylón-Pacheco, L., Espíritu-Gordillo, P., y Rosales-Encia, J., L. (2015) Characterization of the protein tyrosine phosphatase PRL from *Entamoeba histolytica*, *Experimental Parasitology*. 159: 168-182
 45. Rath, P., C., y Aggarwal, B., B., (1999). TNF-induced signaling in apoptosis. *Journal of Clinical Immunology*, 19(6): 350-364.
 46. Ray, A., Basu, S., Gharaibeh, R., Z., Cook, L., C., Kumar, R., Lefkowitz, E., J., Walker, C., R., Morrow, C., D., Franklin, C., L., Geiger, T., L., Salzman, N., H., Fodor, A., y Dittel, B., N., (2015). Gut Microbial Dysbiosis Due to *Helicobacter* Drives an Increase in Marginal Zone B Cells in the Absence of IL-10 Signaling in Macrophages. *The Journal of Immunology*. 195(7): 3071–3085.
 47. Rojas-Bernabé A., Garcia-Hernández O., Maldonado-Bernal C., Delgado-Dominguez J., Ortega E., Gutiérrez-Kobeh L., Becker I. y Aguirre-García M., (2014) *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan activates ERK and p38

- MAP Kinase and induces production of proinflammatory cytokines in human macrophages through TLR2 and TLR4. *Parasitology*. 141, 788-800.
48. Ruby, J., Martin, M., Passineau, M., J., Godovikova, V., Fenno, J., C., Wu, H., y Whiteley, M. (2017). Activation of the Innate Immune System by *Treponema denticola* Periplasmic Flagella through Toll-Like Receptor 2. *Infection and Immunity*, 86(1).
49. Singh, M., Mukherjee, P., Narayanasamy, K., Arora, R., Sen, S., D., Gupta, S., Natarajan, K., y Malhotra, P. (2009). Proteome analysis of *Plasmodium falciparum* extracellular secretory antigens at asexual blood stages reveals a cohort of proteins with possible roles in immune modulation and signaling. *Molecular & Cellular Proteomics*. 8(9): 2102-2118.
50. Solaymani-Mohammadi, S., y Petri, W., A., (2008). Intestinal Invasion by *Entamoeba histolytica*. *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion*, 221–232.
51. St-Pierre, J., Moreau, F., Cornick, S., Quach, J., Begum, S., Aracely Fernandez, L., y 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): e1006592.
52. Sun, L., He, C., Nair, L., Yeung, J., y Egwuagu, C. E. (2015). Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. *Cytokine*, 75(2): 249–255.
53. Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., y Akira, S. (1999). Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. *Immunity*, 11(4), 443–451.
54. Tartey, S., y Takeuchi, O. (2017). Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. *International Reviews of Immunology*, 36(2): 57–73.
55. Thibeaux, R., Weber, C., Hon, C., C., Dillies, M., A., y Ave´ P. (2013) Identification of the Virulence Landscape Essential for *Entamoeba histolytica* Invasion of the Human Colon. *PLOS Pathogens*9(12): e1003824.

56. Trejos- Suárez, J, y Castaño-Osorio, J., C., (2009) Virulence factors of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*, *INFECTION*13 (2): 100-110
57. Vega, G., B., (2008). Inmunidad natural o innata, *Fac Med UNAM* Vol. 51 (I 4).
58. Verschoor, C., P., Puchta, A., Bowdish, M., E., (2012), The macrophage. *Leucocytes. Humana press*, 884: 139-156.
59. Vignali, D., A., A., y Kuchroo, V., K., (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology*, 13(8): 722–728.
60. Vivanco-CID, H., Alpuche-Aranda, C., Wong-Baeza, I., Rocha-Ramírez, L. M., Rios-Sarabia, N., estrada-garcia, I., e Isibasi,A., (2007). Lipopeptidephosphoglycan from *Entamoeba histolytica* activates human macrophages and dendritic cells and reaches their late endosomes. *Parasite Immunology*, 29(9): 467–474.
61. Ximénez, C., Morán, P., Ramos, F., y Ramiro, M. (2007). Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento, *Medicina Interna de México* 23 (5): 398-407
62. Yang, Z., Mosser, D., M., y Zhang, X. (2007). Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* Infection of Macrophages, *The Journal of Immunology*. 15; 178(2): 1077–1085.
63. Yin, F., Liu, J., Gao, S., Liu, A., Zhao, S., Li, S., Wang, J., Li, Y., Luo, J., Guan, G., y Yin, H., (2018), Exploring the TLR and NLR signaling pathway relevant molecules induced by the *Theileria annulata* infection in calves, *Parasitology Research*