



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**MECANISMOS MOLECULARES DE DAÑO EN LAS ETAPAS TARDÍAS DEL
ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO EXPERIMENTAL EN HÁMSTER**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

QFB. CORTES HERRERA MARÍA AZUCENA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALFONSO OLIVOS GARCÍA †
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. SERGIO ENRÍQUEZ FLORES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., FEBRERO, 2022



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.



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/047/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **8 de noviembre de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **CORTES HERRERA MARÍA AZUCENA** con número de cuenta **520009899** con la tesis titulada "**MECANISMOS MOLECULARES DE DAÑO EN LAS ETAPAS TARDÍAS DEL ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO EXPERIMENTAL EN HÁMSTER**", realizada bajo la dirección del **DR. SERGIO ENRÍQUEZ FLORES**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Vocal: DRA. GLORIA HERNÁNDEZ ALCÁNTARA
Vocal: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA
Vocal: DRA. ITZHEL GARCÍA TORRES
Secretario: DRA. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 14 de enero de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Primeramente, al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas.

Este proyecto se realizó gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada a María Azucena Cortes Herrera con CVU 843417, como parte del programa de becas nacionales de posgrado (maestría).

Esta investigación se realizó gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN214617, al apoyo CONACyT 247430 y al proyecto 2019/072 registrado en el Instituto Nacional de Pediatría.

Agradezco a mi tutor principal el Dr. Alfonso Olivos García por darme la oportunidad de estar bajo su dirección y abrirme las puertas del Laboratorio de Patología Experimental, y al Dr. Sergio Enríquez Flores por su asesoría académica. Finalmente, agradezco a los miembros del Comité Tutor la Dra. Emma Saavedra y el Dr. Julio César Carrero por cada observación y comentario.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, Maxi y Greg por ser el pilar y fortaleza en mi vida. Gracias por sus consejos y enseñanzas, por siempre apoyarme y confiar en mí. Los amo.

A mis hermanas Sol y Gaby que siempre me han motivado a seguir y a no rendirme nunca a pesar de las adversidades.

A mi querido Doc. Alfonso Olivos (DEP) fue un gran honor trabajar a su lado, gracias por confiar en mí, por ser mi guía, por todos sus consejos, enseñanzas y regaños, atesoro con mucho amor todos los momentos que pasamos juntos, las reuniones, los congresos, las comidas, las fiestas ... Por heredarme la emoción y la alegría de trabajar en el laboratorio. No cabe duda de que quien pasó por nuestra vida y dejó luz, ha de resplandecer en nuestra alma para toda la eternidad. Al doctor Sergio Enríquez por brindarme todo su apoyo, por acogerme sin pensarlo ni un segundo. Por brindarme todo su apoyo en las revisiones del trabajo. Gracias por la dedicación y paciencia.

A mis sinodales a la doctora Emma Saavedra y al doctor Julio Carrero por sus valiosas sugerencias y comentarios constructivos a este trabajo, sin duda sus comentarios mejoraron esta tesis.

Al grupo de trabajo, a Mayito por siempre estar en la disposición de ayudarme y enseñarme todos los trucos en las cirugías. Al joven Pedro por su ayuda en el procesamiento histológico. A Edith por sus consejos técnicos. Sin duda fueron la mejor familia en el laboratorio.

A Marco Gudiño por ser mi amigo, recuerdo con mucho cariño las largas charlas que me animaban a seguir, gracias por brindarme su amistad incondicional.

A Francisco por ser mi compañero y amigo, por apoyarme cuando más lo he necesitado. Por escuchar mis alegrías, enojos y tristezas.

Finalmente agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por abrirme sus puertas.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	6
Amibiasis.....	6
Epidemiología	6
Agente etiológico y ciclo biológico	7
<i>E. histolytica</i> HM1: IMSS.....	10
Absceso hepático amibiano.....	11
Modelo experimental en hámster.....	12
Mecanismos de patogenicidad y virulencia de <i>E. histolytica</i>	16
Adhesión	16
Fagocitosis.....	16
Trogocitosis	17
Ameboporos	17
Proteasas.....	18
Tipos celulares en el hígado.....	18
Hepatocitos.....	19
Colangiocitos.....	19
Células endoteliales	20
Células de Kupffer	20
Células estrelladas	20
Metaloproteinasas de matriz.....	25
Relación de las células estrelladas y las metaloproteinasas de matriz	27
Tratamiento del AHA.....	28
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
METODOLOGÍA.....	31

Mantenimiento de la virulencia de <i>E. histolytica</i> y cultivo axénico.....	31
Conteo de trofozoítos.....	31
Crecimiento amibiano <i>in vitro</i> en presencia de inhibidores de CEH y de MMPs	32
Absceso hepático amibiano experimental en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina	32
Declaración de ética.....	34
Análisis histológico	34
Inmunofluorescencia para determinar alfa-actina de músculo liso (α -SMA)	35
Inmunofluorescencia para identificar a metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9)	36
Análisis estadístico.....	36
RESULTADOS.....	37
Crecimiento amibiano <i>in vitro</i> en presencia de inhibidores de las CEH e inhibidores de MMPs	37
Evaluación macroscópica del absceso hepático amibiano en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina	39
Evaluación microscópica del absceso hepático amibiano en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina	45
Distribución de las células estelares durante el desarrollo del absceso hepático amibiano en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina	53
Localización celular y distribución de la metaloproteasa de matriz 9 durante el desarrollo del absceso hepático amibiano en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina	59
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	65
CONCLUSIONES.....	73
PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS	89

ABREVIATURAS

AHA	Absceso hepático amibiano
AHAEH	Absceso hepático amibiano experimental en hámster
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
IL-1	Interleucina 1
FILM	Factor inhibidor de la locomoción de monocitos
NO	Óxido nítrico
CEH	Células hepáticas estrelladas
CEHa	Células hepáticas estrelladas activadas
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
MEC	Matriz extracelular
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
PAS	Ácido periódico de Schiff
Gal/GalNAc	Lectina galactosa/N-acetilgalactosamina
CaBp	Proteínas de unión a calcio
SGLT	Cotransportador sodio-glucosa tipo 1
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
MCP-1	Proteína quimiotáctica monocítica 1
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
TM	Tricrómica de Masson
RS	Rajo Sirio
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
α -SMA	Alfa actina de músculo liso
ONOO $^-$	Peroxinitrito
HIF-1	Factor inducible por hipoxia

RESUMEN

Entamoeba histolytica es el parásito responsable de la amibiasis en humanos, una enfermedad infecciosa que afecta al tracto digestivo y otros órganos como el hígado. En el mundo causa alrededor de cien mil muertes cada año. Previamente el análisis histológico del absceso hepático amibiano experimental en hámster (AHAEH) reveló la presencia de dos zonas: fibrogénesis y fibrólisis. A pesar de su relevancia, las células o moléculas involucradas en estos procesos aún se desconocen. En este trabajo se estudiaron a las células estelares y a las metaloproteinasas de matriz (MMPs) como posibles responsables del daño tisular. Para abordar lo anterior se realizaron los siguientes estudios: 1) inhibición de MMPs con los fármacos oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina; 2) análisis histológico en cursos temporales del desarrollo del AHAEH con los diferentes tratamientos farmacológicos y 3) estudios de inmunofluorescencia para identificar alfa-actina de músculo liso y metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9). Los resultados demuestran la presencia de células estelares en la periferia de las lesiones, y se observó a MMP-9 en la zona de necrosis. La conclusión principal de este trabajo es que la inhibición de la fibrogénesis y fibrólisis es fundamental para la recuperación de la destrucción tisular que caracteriza dicha parasitosis.

ABSTRACT

Entamoeba histolytica is the parasite responsible for amebiasis in humans, an infectious disease that affects the digestive tract and other organs such as the liver. It causes around one hundred thousand deaths each year worldwide. Previously, the histological analysis of experimental amoebic liver abscess in hamster (EALA) revealed the presence of two areas: fibrogenesis and fibrolysis. Despite their relevance, the cells or molecules involved in these processes are still unknown. Therefore, in this work, stellate cells, and matrix metalloproteinases (MMPs) were studied as possible responsible for tissue damage. To address the above, the following studies were carried out: 1) inhibition of MMPs with the drugs oxythiamine, methylprednisolone, pioglitazone, and doxycycline; 2) time courses of the histological analysis of the development of EALA with the different pharmacological treatments; 3) immunofluorescence studies to identify alpha-actin of smooth muscle and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). The results demonstrated the presence of stellate cells in the periphery of the lesions, and MMP-9 was observed in necrosis area. The main conclusion of this work is that the inhibition of fibrogenesis and fibrolysis are essential for the recovery of the tissue destruction that characterizes such parasitosis.

INTRODUCCIÓN

La amibiasis es una enfermedad parasitaria del ser humano causado por el protista microaerófilo *Entamoeba histolytica*. A nivel mundial, cada año se reportan aproximadamente 50 millones de casos de amibiasis, resultando en hasta 100 mil muertes (Ximénez, 2010). Desafortunadamente esta enfermedad es más frecuente en países subdesarrollados como el nuestro, donde se han reportado los índices de morbilidad más altos con ~200,000 casos anuales de amibiasis intestinal, por lo que es considerada la infección parasitaria más común. Además de la infección intestinal, también se pueden establecer infecciones extraintestinales por *E. histolytica*, donde la más frecuente es la infección en el hígado, generando el absceso hepático amibiano (AHA), con reportes de aproximadamente 808 casos anuales (SINAVE, 2020; Hanna, 2000). Por otra parte, a pesar de que el metronidazol y sus derivados nitroimidazoles presentan buena eficacia terapéutica, se ha demostrado que, debido a su uso indiscriminado sin adecuada prescripción ni seguimiento médico, este parásito puede adquirir resistencia a dichos tratamientos (Debnath, 2019). Además, en ocasiones algunos pacientes con amibiasis invasiva no responden al tratamiento con los fármacos, aunado a los efectos adversos y citotóxicos que ejercen sobre la microbiota intestinal lo que ocasiona disbiosis intestinal. También se ha demostrado que el metronidazol y sus derivados generan mutaciones, pudiendo llevar al desarrollo de cáncer (Muhammad, 2018). Con base en lo anterior es necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas que presenten alta eficacia, gran selectividad e inocuidad. En ese sentido, el estudio de los mecanismos moleculares relacionados con la patogenicidad de *E. histolytica* puede proporcionarnos evidencia útil que oriente la búsqueda racional e identificación de nuevos blancos terapéuticos para el desarrollo de compuestos con potencial efecto anti-amibiano.

Durante mucho tiempo se propuso que la patogenicidad de *E. histolytica* se debía a su capacidad eficiente de destrucción y daño al tejido que invade; desde su descubrimiento, este efecto se denominó actividad histolítica (rompimiento de tejido) (Schulte, 1989; Reed, 1993). La suposición anterior se sustentó con experimentos *in vitro* en los cuales aparentemente se evidenció que el parásito era

capaz de causar citólisis y proteólisis de algunos componentes de la matriz extracelular en tejidos hepáticos (Ankri, 1999; Bracha, 1999). Contrario a estas afirmaciones, nuestro grupo de trabajo demostró que el principal responsable del daño tisular en el absceso hepático amibiano experimental en hámsteres (AHAEH) se debe principalmente a la respuesta inflamatoria eficiente del hospedero (Olivos-García, 2004); aunque los mecanismos moleculares de dicha destrucción tisular aún se desconocen.

En etapas tardías, el AHAEH se caracteriza por presentar hepatomegalia (agrandamiento del hígado) y lesiones distribuidas en todos los lóbulos del hígado. A nivel microscópico se genera una extensa zona central de necrosis con parásitos de *E. histolytica* en óptimas condiciones en la periferia y rodeados por abundante infiltrado inflamatorio. En dicho infiltrado se observan zonas de fibrólisis adyacentes a los parásitos, seguidas de fibrogénesis en la que no están presentes los hepatocitos (Guerrero, 1982). En concordancia con los resultados anteriores, se ha demostrado que, si se administran inmunosupresores se permite la proliferación del parásito, generando conglomerados e inhibiendo la hepatomegalia, la afluencia leucocitaria y la destrucción tisular (Olivos-García, 2007).

Por otra parte, se ha propuesto que las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) derivadas de la respuesta inflamatoria, podrían estar implicadas en la destrucción tisular del AHAEH (Lin, 1992; Pacheco-Yépez, 2011). Sin embargo, dicha propuesta no considera que los macrófagos presentes en el AHAEH están inactivados y no producen ROS ni IL-1 (Denis, 1988; Wang, 1994). Además, en las etapas tardías, la cantidad de polimorfonucleares es escasa y existen reportes que indican que los neutrófilos no están involucrados en el daño tisular (Chadee, 1984; Helk, 2013). Así mismo, el factor inhibidor de la locomoción de monocitos de *E. histolytica* (FILM) inhibe la producción de NO \cdot en leucocitos, lo cual puede contribuir a la escasez de componentes inflamatorios tardíos (Rico, 2003; Rojas-Dotor, 2009). En estas etapas tardías, los leucocitos mononucleares y los fibroblastos reemplazan a la mayoría de las células inflamatorias,

desarrollándose granulomas bien organizados (Tsutsumi, 1984; Jiménez-Cardoso, 1985).

Por otro lado, en el AHAEH las células estrelladas hepáticas (CEH) pudieran contribuir en la deposición de las fibras de colágeno que rodean el granuloma y que al ser activadas pueden diferenciarse en células de tipo miofibroblastos (Rockey, 2013), las cuales tienen un aumento notable en la producción y síntesis de proteínas de la matriz extracelular (MEC) como laminina, proteoglicanos y colágena (tipo I, III y IV) (Friedman, 2008; Tsuchida, 2017). En concordancia con la suposición anterior, las CEH y/o macrófagos podrían desempeñar un papel importante en el proceso de fibrólisis tisular. Por lo que, ambos tipos celulares son capaces de sintetizar metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Friedman, 2000; Pellicoro, 2012), enzimas que degradan algunos componentes de la MEC como la colágena, la laminina y la fibronectina (Nagase, 2006). Se ha demostrado que una condición importante para desencadenar la actividad colagenolítica de las MMPs, es su activación previa por proteasas. En el microambiente del absceso hepático, las proteasas de cisteína de *E. histolytica* podrían participar activamente en dicha activación, tal como ya ha sido sugerido en explantes de intestino humano (Thibeaux, 2014).

Por otro lado, se ha observado que la progresión de las lesiones en el foco infeccioso es paralela al desplazamiento del parásito en la periferia de éstas (Tsutsumi, 1984). Debido a que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una proteína que ejerce una fuerte actividad quimiotáctica en *E. histolytica*, es probable que dicha quimiocina, que es liberada por las células inflamatorias, sea importante para la rápida diseminación del parásito y progresión de las lesiones. Además, el mismo TNF- α también podría estimular a las CEH y macrófagos para la secreción de MMPs (Duarte, 2015).

Con base en lo mencionado anteriormente, el estudio comparativo del AHAEH de hámsteres no expuestos y expuestos a inmunosupresores ayudará a conocer los mecanismos involucrados en la destrucción del tejido hepático del hospedero, y a describir los posibles mecanismos de diseminación del parásito, esto

potencialmente podría derivar en la propuesta de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la amibiasis en humanos.

ANTECEDENTES

Amibiasis

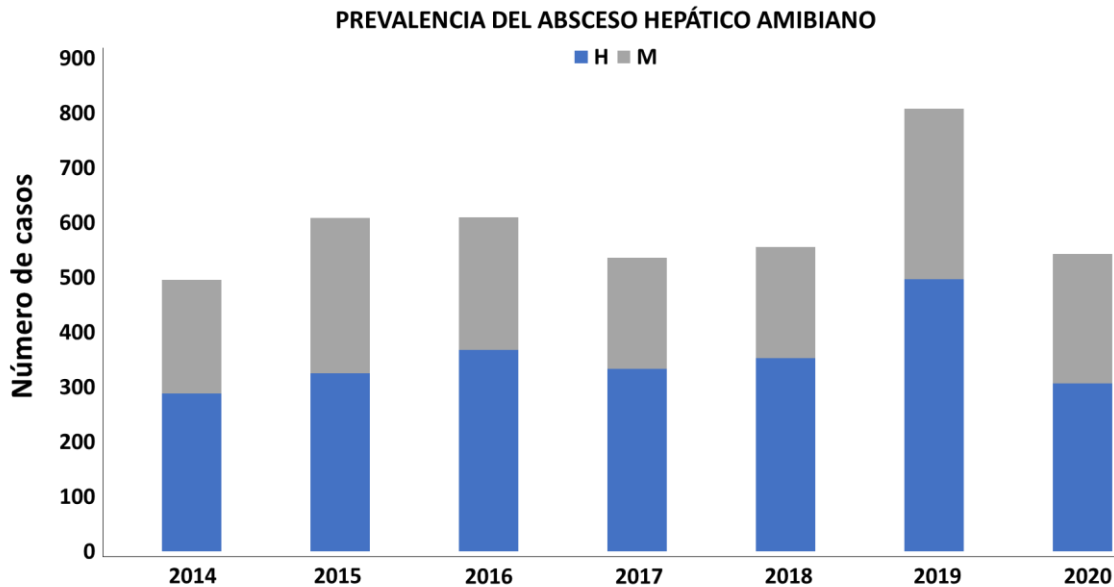
La amibiasis es un proceso infeccioso causado por *E. histolytica*, parásito protozooario que pertenece al filo *Amoebozoa*. Las personas infectadas pueden ser asintomáticas o sintomáticas las cuales pueden presentar una amplia gama de signos clínicos como diarrea, disentería, fiebre y/o dolores abdominales. Además de la amibiasis intestinal, que es la forma más común de la infección, con menor frecuencia este parásito también puede invadir tejidos como el hígado, los pulmones, el cerebro y la piel (Brandt, 1970).

Epidemiología

La infección por *E. histolytica* llamada amibiasis tiene una amplia distribución y prevalencia mundial con 500 millones de casos anuales (Stanley, 2003), de los cuales cerca de 50 millones de personas desarrollan síntomas y hasta 100 mil personas mueren como consecuencia de ésta (Lozano, 2012). Del total de reportes anuales de infectados por *E. histolytica*, aproximadamente el 9% manifiesta la enfermedad intestinal disentérica mientras que el 1% presenta enfermedad extraintestinal (Debbie-Ann, 2018). De todas las enfermedades extraintestinales, el AHA es la complicación extraintestinal más frecuente. Además, se ha observado que entre el 2 y 10 % de los pacientes con AHA tiene un desenlace fatal (Winn, 2008). En relación con esto último, cabe mencionar que existen reportes en donde se menciona a la amibiasis como la tercera causa parasitaria de muerte en humanos después de la malaria y la esquistosomiasis (Van Hal, 2007).

Para nuestro país y de acuerdo con la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, en 2019 (así como años anteriores) la amibiasis intestinal estuvo dentro de las veinte primeras causas de enfermedad, ocupando el lugar 16° con 191 437 casos. Para el año 2020 se reportaron 111 831 casos.

Con respecto a los casos del AHA, se tienen reportes en los boletines epidemiológicos a partir del año 2014. En la gráfica 1 se observa que el número de casos es variable, con un mínimo de 496 casos en 2014 y un máximo de 808 casos en 2019.



Gráfica 1. Prevalencia del absceso hepático amibiano en los últimos 7 años en la República Mexicana. H=hombres y M=mujeres. FUEENTE: SINAVE/DGE/Salud.

Agente etiológico y ciclo biológico

Durante muchos años la amiba recibió varios nombres como *Amoeba coli*, *Amoeba dysenteria*, *Entamoeba dysenteriea* entre otros (Pinilla, 2008). Finalmente, en 1903 Fritz Schaudinn decide nombrar *Entamoeba histolytica* a la amiba debido a que se sospechaba que ésta era la responsable de la destrucción tisular que caracteriza a la enfermedad.

E. histolytica es un protozoo unicelular de la clase *Rhizopoda* o *Sarcodina*. Se ha considerado que, durante su evolución, este organismo probablemente precedió a otros eucariotas de divergencia temprana, debido a la falta de orgánulos como mitocondrias y aparato de Golgi y se ha descrito que carece de un sistema de lisosomas primarios y secundarios (Ludvík, 1970).

Durante su ciclo biológico, el parásito puede adoptar dos formas diferenciadas morfológicamente: el quiste (que es la forma resistente e infectiva) y el trofozoíto (que es la forma vegetativa e infecciosa).

Los quistes son estructuras esféricas u ovoides (Fig. 1), miden de 10 a 16 μm de diámetro y están rodeados por una capa gruesa de quitina que les confiere resistencia a las condiciones del medio ambiente externo. También, presentan una pared lisa y refringente. El quiste, en su etapa de inmadurez posee un núcleo, posteriormente y en el proceso de maduración éste se divide en dos y luego en cuatro formando el quiste maduro (Lohia, 2003; Becerril, 2011).

Los trofozoítos o forma vegetativa (Fig. 2) son estructuras móviles debido a la presencia de pseudópodos. Son amorfos y pueden ser irregulares y/o alargados. Presentan de uno a seis núcleos (policarion) sin posición fija en el citoplasma, aunque en su mayoría se observa un solo núcleo. Su tamaño varía de 20 a 60 μm de diámetro. El citoplasma presenta dos zonas bien diferenciadas: el ectoplasma y endoplasma. El ectoplasma es hialino, ancho y transparente sin inclusiones, y el endoplasma que rodea al núcleo con numerosas vacuolas. También se encuentran ribosomas y polirribosomas (Ludvík, 1970; Flisser, 2006; Choudhuri, 2012).

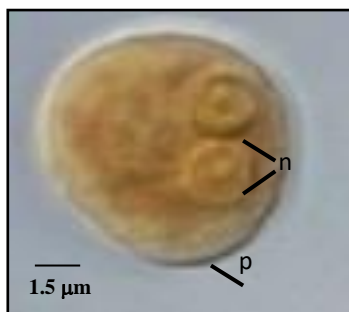


Figura 1. Quiste inmaduro de *Entamoeba histolytica* teñido con lugol. Se pueden apreciar dos núcleos y la pared gruesa de quitina (p). Fotografías tomadas por contraste diferencial de interferencia (DIC).



Figura 2. Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* sin teñir (n: núcleo; c: ectoplasma; d: endoplasma). Fotografías tomadas por contraste diferencial de interferencia (DIC).

El ciclo biológico del parásito es oral-fecal, comienza cuando se ingieren agua o alimentos contaminados con los quistes del parásito, éstos avanzan por el tracto digestivo hasta llegar al estómago. Se sabe que, al llegar a este sitio, el pH de los ácidos gástricos junto con las enzimas hidrolíticas reblandece su pared de quitina sin afectar su citoplasma (Becerril, 2011). Después del desenquistamiento (eliminación de la capa de quitina), que ocurre en el íleon terminal, se lleva a cabo la transformación de quistes hacia trofozoítos mediante fragmentación del citoplasma tantas veces como número de núcleos haya presentes; estas pequeñas amibas se les denomina *metaquistes*, las cuales rápidamente aumentan de tamaño y se convierten en trofozoítos, multiplicándose a través de fisión binaria. Generalmente los trofozoítos permanecen en la luz intestinal como comensales; sin embargo, pueden invadir la mucosa y la submucosa intestinal, ingresar por circulación portal e invadir órganos blandos como el hígado, pulmones y cerebro (Mortimer, 2010).

En el lumen intestinal, los trofozoítos pueden enquistarse, para lo cual se redondean, disminuyen su motilidad y tamaño tomando la forma de *prequiste*.

Enseguida sintetizan la capa de quitina y luego de dos a tres divisiones del núcleo, el quiste queda formado. Finalmente, los quistes se excretan en las heces manteniéndose quiescentes y listos para reiniciar su ciclo biológico (Fig. 3).

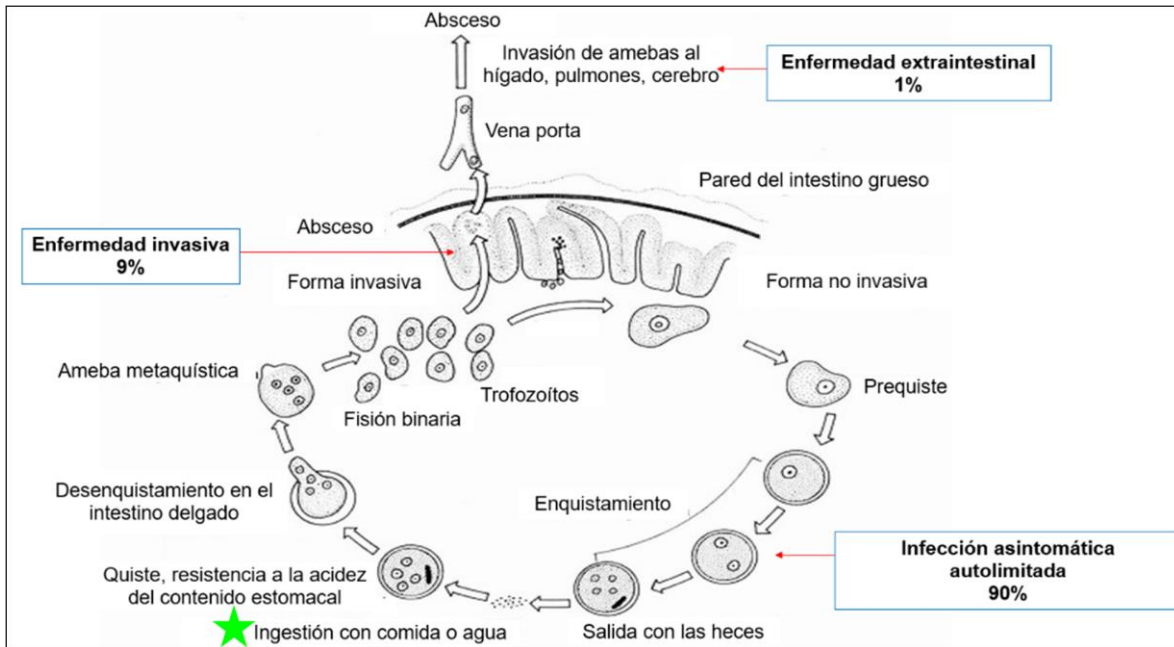


Figura 3. Ciclo biológico de *E. histolytica*. Su ciclo de vida es directo, no existen intermediarios. (Inicio del ciclo★). Tomado y modificado de Bogitsh, 2018.

Los mecanismos moleculares que inducen a los trofozoítos a comenzar el proceso de enquistamiento actualmente son desconocidos. Lo único que se ha demostrado es que múltiples factores de transcripción y moléculas de señalización, como la proteína Myb, la proteína de unión a motivos reguladores de enquistamiento (ERM-BP) y fosfolipasa D están involucradas en dicha conversión (Ehrenkauf, 2007; Ehrenkauf, 2009; Dipak, 2018).

***E. histolytica* HM1: IMSS**

Actualmente la cepa de *E. histolytica* HM1: IMSS es la más utilizada en los laboratorios de investigación de todo el mundo y así se nombró por ser la primera ameba aislada en forma axénica del intestino de un paciente, el cual estaba hospitalizado en el Centro Médico Nacional IMSS en 1967. Un año después, se fundó el Centro de Estudios sobre amibiasis que fue clave para el estudio de este parásito en nuestro país. El doctor Bernardo Sepúlveda y uno de sus colaboradores, Margarita de la Torre, lograron cultivar en el laboratorio amebas aisladas de varios pacientes (Sepúlveda, 1982). Las cepas mostraron diferentes grados de virulencia y características específicas, por lo que fueron clasificadas

como *E. histolytica* HM1: IMSS, HM2: IMSS, HM3: IMSS, etcétera, para denotar su origen en México y en el IMSS.

Varios grupos de investigadores han determinado la virulencia *in vivo* de dicho parásito evaluando su capacidad para formar abscesos hepáticos en hámsteres. En sus estudios demostraron que la cepa HM1: IMSS es extremadamente virulenta, ya que todos los animales desarrollaron AHA. Mientras que las cepas H-458: CDC, 200: NIH, HB-301: NIH, HU-21: AMC, Rahman, HU-22: AMC y HK-9 son consideradas de virulencia intermedia (Mattern, 1977; Orozco, 1978; Burchard, 1988). Las determinaciones de citopatogenicidad se realizaron en condiciones *in vitro*, en donde la cepa HM1: IMSS fue capaz de destruir más del 75% de monocapas de tejido, mientras que las cepas Rahman, SAW 408, WI: 0385: 191, ocasionaron daño a la monocapa en menos del 40% (Burchard, 1988).

Absceso hepático amibiano

El AHA es la infección extraintestinal más común y se ha detectado con mayor frecuencia en adultos que en niños (Tanyuksel, 2003). Aproximadamente el 80% de los pacientes con esta enfermedad desarrollaran síntomas dentro de 2 a 4 semanas posteriores a la infección. La fase aguda inicia con dolor abdominal derecho o sensibilidad en la parte superior, mientras que en la fase subaguda los pacientes presentan pérdida de peso, fiebre y dolor abdominal más difuso.

Los trofozoítos de *E. histolytica* acceden al hígado por diseminación hematógena a través de la vena porta y forman microabscesos que posteriormente se fusionan para formar un absceso único (Espinosa-Cantellano, 2000). Se ha determinado que se afecta principalmente el lóbulo derecho del hígado, aunque también puede distribuirse en los demás lóbulos de este órgano; el tamaño del absceso oscila entre 1 y 40 cm. Se presenta como un área bien delimitada en el que el parénquima hepático es remplazado por una masa de material necrótico de color amarillento y de consistencia cremosa. La diseminación de la infección amibiana a otros órganos (Fig. 4), como cerebro, pulmones y piel, son muy raras y casi nunca ocurren en ausencia de absceso hepático amibiano; sin embargo, pueden causar mucho daño al tejido (Brandt, 1970; Flisser, 2006).

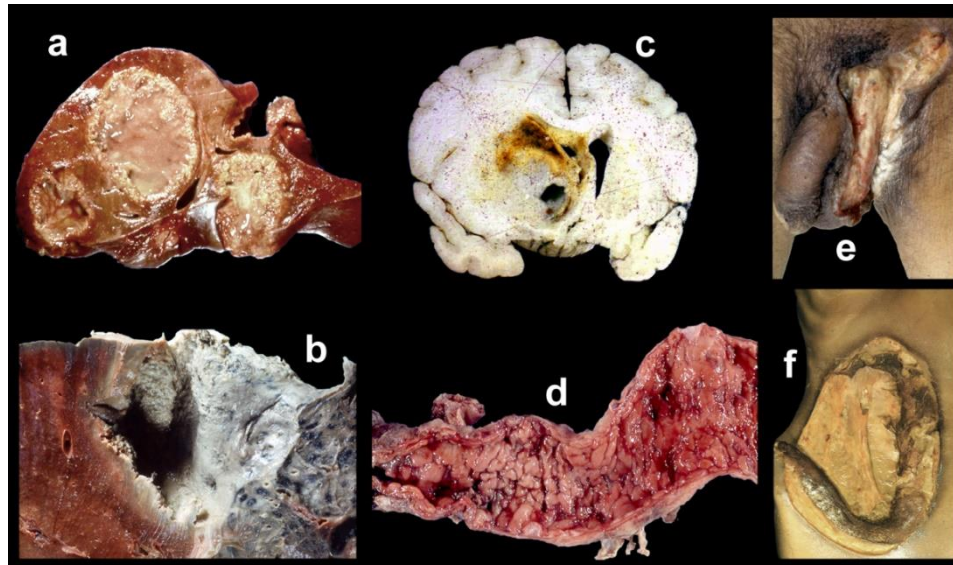


Figura 4. Amibiasis invasiva en diferentes tejidos del ser humano. a) absceso hepático amibiano (AHA) con múltiples lesiones, b) ruptura de AHA e invasión a pulmón, c) lesión amibiana en cerebro, d) megacolon tóxico, e) amibiasis inguinal, f) invasión de la pared anterior del abdomen derecho por un AHA. Las lesiones en piel son causadas por contigüidad del AHA (Tomado de Olivos-García, 2011).

Los primeros estudios microscópicos de necropsias y biopsias de pacientes con AHA demostraron que tiene una ubicación cercana a la cápsula de Glisson, la cual es una cápsula fibrosa compuesta de colágeno que recubre la superficie externa del hígado (Keeley, 1962). También se observó que se pueden presentar en una zona central de necrosis en donde las amibas se localizan en la periferia (límite entre la necrosis y la pared interna del absceso) y no se observan en el interior de esta zona o en el tejido hepático circundante. Estos estudios también demostraron que hay infiltrado portal denso, con una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares rodeando la zona de necrosis. Finalmente, los cambios degenerativos a nivel macroscópico en los hepatocitos fueron evidentes (Keeley, 1962; Tandon, 1975).

Modelo experimental en hámster

El modelo más utilizado para estudiar los mecanismos moleculares de patogenicidad y virulencia del parásito es el absceso hepático amibiano experimental en hámster (AHAEH). En 1951 Reinertson y colaboradores

realizaron la primera inyección de cultivos polixénicos de *E. histolytica* directamente en los lóbulos hepáticos o en la vena portal. Posteriormente, se utilizaron cultivos axénicos de trofozoítos en estos animales y debido a la uniformidad en las lesiones del hígado se confirmó su elevada susceptibilidad y reproducibilidad (Tanimoto, 1971). Actualmente, este modelo consiste en la inyección intraportal de 1×10^6 trofozoítos axénicos virulentos de la cepa HM1: IMSS. Gracias a este modelo se han dilucidado algunos mecanismos de la interacción hospedero-parásito y el papel de la respuesta inmune implicada en las etapas tempranas y tardías del proceso infeccioso (Sánchez-Ramírez, 2004; Tsutsumi, 2006; Villalba-Magdaleno, 2011). Además, se han revelado algunos potenciales blancos terapéuticos (Debnath, 2012; Santos, 2020).

En este modelo experimental, la tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS) es la más utilizada para la visualización de los cambios morfológicos en los tejidos del hígado y además permite diferenciar a las amibas de las células circundantes, tiñéndose de un color rosa intenso. En etapas tempranas de la infección se observan trofozoítos de una coloración rosada rodeados principalmente por polimorfonucleares y macrófagos, las lesiones son de forma irregular y miden entre 0.5 a 5.0 mm de diámetro; la necrosis comienza a hacerse evidente a las 24 h (Fig. 5) (Tsutsumi, 1984; Jiménez-Cardoso, 1985).

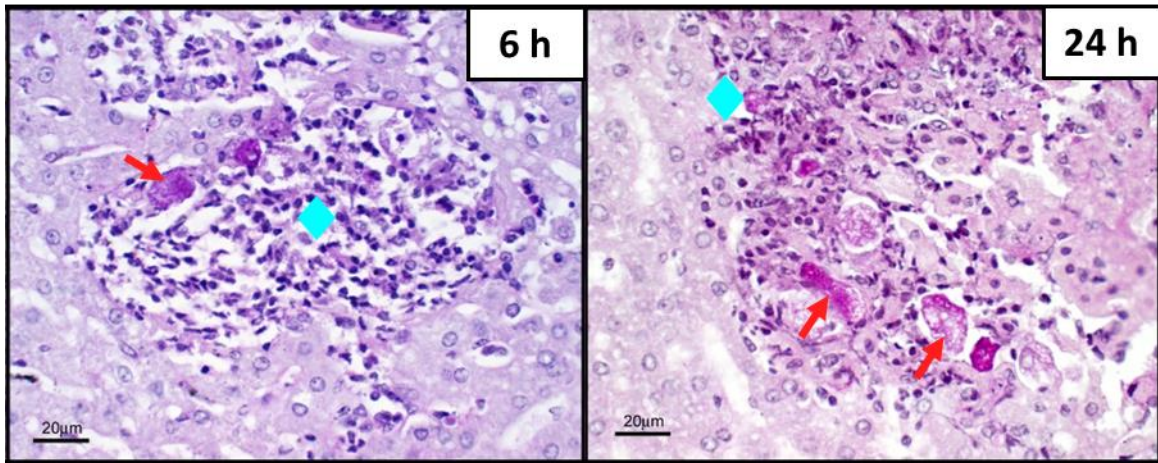


Figura 5. Aspecto microscópico del absceso hepático amibiano en hámster a las 6 y 24 h. Se observan trofozoítos bien conservados (→) rodeados de PMN (◆) (Tomado y modificado de Cortes A, 2019). Tinción de PAS.

Las etapas tardías se caracterizan por presentar amibas bien conservadas rodeadas de infiltrado inflamatorio de tipo linfocitario y mononuclear con proliferación progresiva de parásitos y necrosis (Fig. 6).

Guerrero y colaboradores determinaron mediante micrografías electrónicas de transmisión la zona de fibrosis en donde las fibras son sintetizadas *de novo* (fibrogénesis) en los alrededores inmediatos de los hepatocitos destruidos (Guerrero, 1982). En la zona necrótica se observa la lisis de estas fibras (actividad fibrinolítica) (Fig. 7).

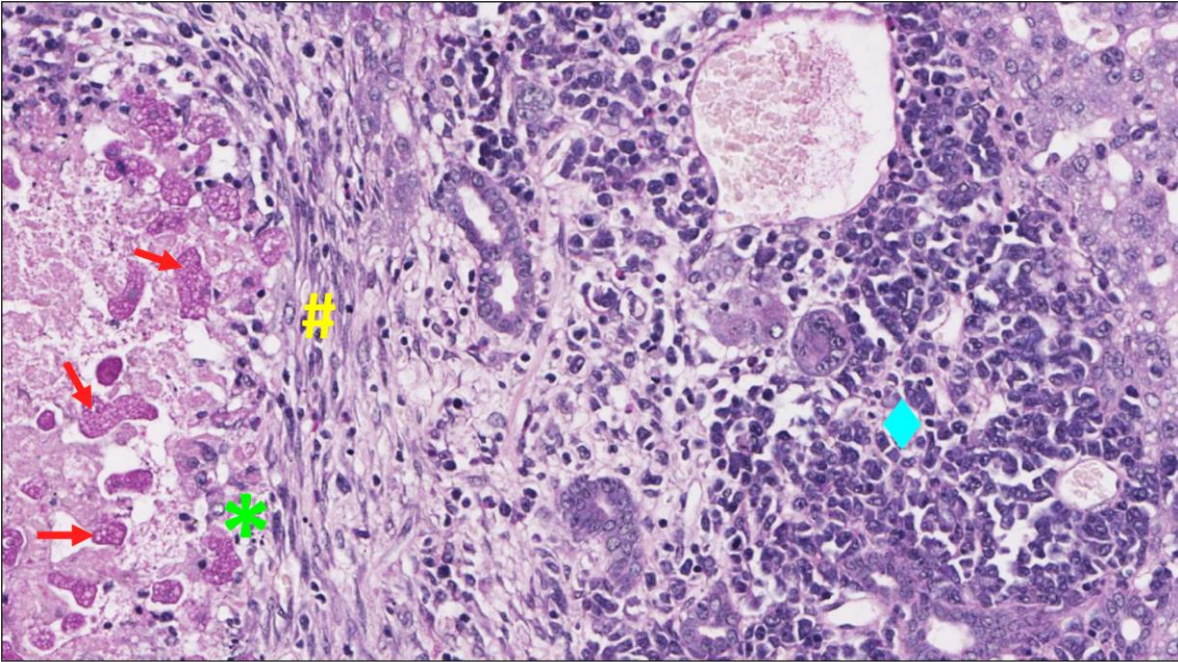


Figura 6. Aspecto microscópico del absceso hepático amibiano en hámster (7 días). Las flechas señalan algunos trofozoítos bien conservados. Se pueden apreciar 3 zonas; fibrólisis (*), fibrogénesis (#) y (♦) células inflamatorias. Tinción de PAS, 20X.

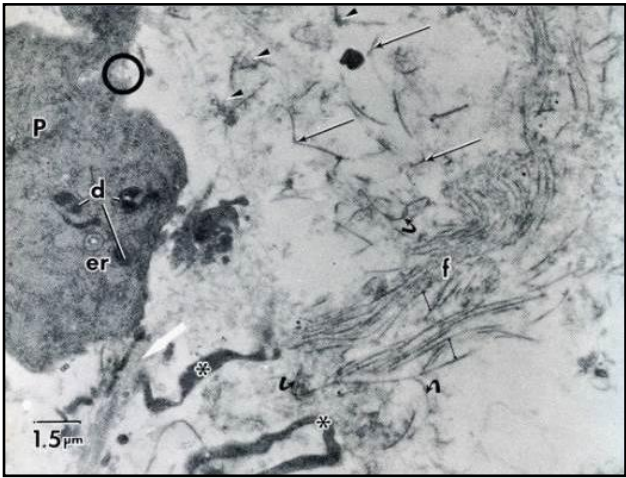


Figura 7. Micrografías electrónicas en donde se muestra parte del citoplasma electrodenso (P) la zona de fibrólisis (◄), de fibrogénesis (f), cuerpos densos (d), restos celulares (*), fibras de colágeno (←) y fibras transformándose (↷) Tomado de Guerrero, 1982.

Mecanismos de patogenicidad y virulencia de *E. histolytica*

Los mecanismos de patogenicidad y virulencia del parásito que están involucrados en las manifestaciones clínicas y patológicas de la infección han sido sujetos de una larga investigación.

En este punto es importante definir patogenicidad y virulencia, los cuales son términos que frecuentemente se confunden o se usan de manera indistinta. Se define a la patogenicidad como la capacidad del parásito de producir la enfermedad en un hospedero, mientras que la virulencia es el grado de expresión de la patogenicidad. Los factores que se han asociado con la patogenicidad que más se han estudiado son los siguientes.

Adhesión

El proceso de invasión del trofozoíto comienza con la adherencia a las células dianas. Se han identificado diversas moléculas que participan en este proceso, la más destacada es la lectina específica de galactosa y N-acetil-D-galactosamina (lectina Gal/GalNAc) una proteína heterodimérica de 260 kDa (Petri, 2002; Mann, 2002). Además de la lectina, se han identificado otras moléculas que participan en este proceso como la proteína rica en lisina y ácido glutámico (KERP1) que se une a los enterocitos humanos (Seigneur, 2005) y la adhesina de proteasa de cisteína (CPADH112) que participa en la adhesión de los eritrocitos (García-Rivera, 1999).

Fagocitosis

Después de la muerte de las células hospederas, *E. histolytica* puede ingerir las células muertas o fragmentos de éstas, ayudando a minimizar las respuestas proinflamatorias. Durante este proceso, intracelularmente la polimerización de actina es esencial para la formación del fagolisosoma, dirigido por GTPasas y proteínas Rab (Godbold, 1998). Actualmente se sabe que EhRabB está involucrado en la regulación del acoplamiento y fusión de vesículas (Javier-Reyna, 2019).

También, la familia de proteínas de unión a calcio (CaBP) participan en el comienzo de la deformación de la membrana, un evento necesario para iniciar la ingestión (Ralston, 2011).

Trogocitosis

Ralston y colaboradores denominaron trogocitosis amibiana a la ingestión de fragmentos o material intracelular (citoplasma y organelos) de células vivas intactas que conduce a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática donde finalmente, las células blanco mueren (Ralston, 2014). Este proceso requiere de la participación de la lectina Gal/GalNAc, reordenamientos de actina mediados por la elevación de Ca^{2+} en el citosol, y señalización de fosfatidilinositol 3-fosfato cinasa (Ralston, 2015; Babuta, 2020). Recientemente se identificó que la cinasa 1 de la familia AGC (EhAGCK1) participa en la trogocitosis pero no en la fagocitosis, con localización en los túneles largos y delgados formados en este proceso (Somlata, 2017).

Ameboporos

Los ameboporos son una familia de al menos tres péptidos pequeños que forman poros en las bicapas lipídicas de las células blanco (Leippe, 1992). Se han encontrado tres isoformas A, B y C, en una proporción aproximadamente de 35:10:1 (Leippe, 1994). Los ameboporos son más activos a pH bajo (5.2), forman canales iónicos entre los fosfolípidos aniónicos de las membranas celulares, a través de los cuales se produce la salida de iones y otras moléculas pequeñas; en consecuencia, el medio interno celular cambia lo que resulta en muerte por lisis (Leippe, 1997). En estudios *in vitro* se determinó que los ameboporos pueden matar a las células mieloides humanas mediante necrosis y se designaron como las principales moléculas candidatas para conferir potencial citolítico a *E. histolytica* (Berninghausen, 1997). Sin embargo, Zhang y colaboradores demostraron que son necesarios para causar abscesos en hígados de hámster, pero pueden no ser requeridos en la patogénesis de la colitis amibiana (Zhang, 2004).

Proteasas

De acuerdo con el genoma de *E. histolytica* (<https://amoebadb.org/amoeba/app>), éste contiene aproximadamente 50 proteasas de cisteína (CP del inglés cystein proteases) (Clark, 2007). Sin embargo, las proteínas EhCP-A1, EhCP-A2, EhCP-A5 y EhCP-A7, se sobreexpresan de manera importante en condiciones de cultivo axénico, lo que representa más del 90% de la actividad proteolítica total (Bruchhaus, 2003; Irmer, 2009). Se ha demostrado, en estudios *in vitro*, que las CP desempeñan un papel importante en la patogenicidad del parásito, alterando la integridad de las monocapas y actuando sobre una gran variedad de proteínas del hospedero; por consiguiente, las amibas invaden el tejido colónico al degradar mucoproteínas y algunos componentes de la matriz extracelular como colágena, elastina, fibrinógeno y laminina (Keene, 1990; Hellberg, 2001; Tillack, 2007).

El estudio de los mecanismos de patogenicidad y virulencia de *E. histolytica* han permitido una mejor comprensión de la relación parásito-hospedero. Además, se ha demostrado que la expresión de adhesinas, amiboporos y proteasas de cisteína, no son responsables del daño observado, pero si son esenciales para la supervivencia del parásito (Tsutsumi, 2006). Ahora se sabe que el principal responsable del daño tisular en el absceso hepático amibiano experimental en hámsteres (AHAEH) se debe principalmente a la respuesta celular del hospedero (Olivos-García, 2004).

Tipos celulares en el hígado

El hígado es el órgano más grande y en adultos representa aproximadamente del 2% al 3% del peso corporal (Si-Tayeb, 2010). Se localiza en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal, envuelto por una membrana fibrosa conocida como cápsula de Glisson y finalmente protegido por la caja torácica. Formado de unidades repetidas de forma hexagonal denominadas lóbulos, constituidos de placas de hepatocitos revestidos por capilares sinusoidales que se irradian hacia la vena eferente central (Rappaport, 1958; Ben-Moshe, 2019).

En este órgano ocurren numerosos procesos fisiológicos como el metabolismo de macronutrientes, la regulación del volumen sanguíneo, control endócrino, descomposición de compuestos xenobióticos entre otras funciones (Molino, 1991; Gebhardt, 2014). El hígado está compuesto por varios tipos celulares de diferente origen embriológico, éstos poseen funciones únicas que regulan cooperativamente la función hepática en múltiples niveles (Fig. 8).

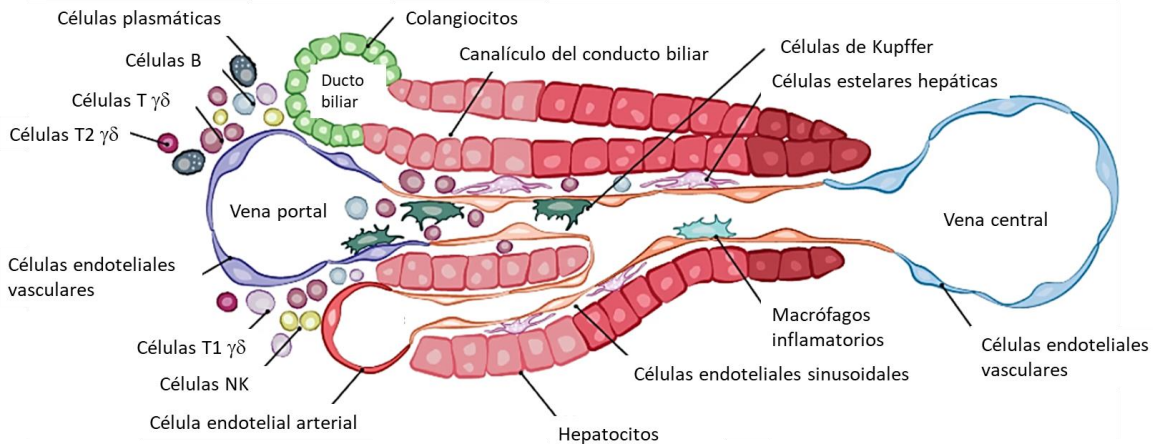


Figura 8. Representación esquemática del lobulillo hepático. Existen varios tipos celulares dentro del sinusoides, incluidos los hepatocitos, los colangiocitos, las células endoteliales, las células de Kupffer, las células estrelladas y los linfocitos infiltrantes del hígado. (Tomado y modificado de MacParland, 2018).

Hepatocitos

Son el principal tipo de células parenquimatosas del hígado y representan más del 60% de la población celular (Malarkey, 2005). Son células altamente polarizadas, es decir, existen diferencias celulares entre las partes en contacto con los canales sinusoidales y las que forman parte de los canalículos biliares (Gissen, 2015). Además, son responsables de la mayoría de las funciones del hígado como las metabólicas, reguladoras y toxicológicas (Alberts, 2008).

Colangiocitos

Comprenden solo el 3-5% de las células hepáticas totales, recubren los conductos biliares (Alpini, 2002). Participan en la formación y modificación del volumen y

composición de la bilis, mediado por transportadores como acuaporinas, SGLT1 y AE2. Además, se caracterizan por ser la primera línea de defensa contra los microorganismos luminales (Strazzabosco, 2005; Pinto, 2018).

Células endoteliales

Son una población endotelial especializada y las primeras en entrar en contacto con los componentes sanguíneos. Forman placas fenestradas en el lumen sinusoidal; esta organización es fundamental para el intercambio de proteínas y partículas entre el suero y hepatocitos (Elvevold, 2008; Trefts; 2017). Cumplen funciones muy complejas como la eliminación de endotoxinas, regulan la inflamación, reclutan leucocitos. Además, presentan alta capacidad endocítica en comparación con otras células endoteliales (Braet, 2002; Lalor, 2006).

Células de Kupffer

Son los macrófagos hepáticos residentes con funciones inmunológicas y fagocíticas (Naito, 1997); representan aproximadamente del 15 al 20% de la población total de las células hepáticas y el 50% de los macrófagos residentes en el cuerpo (Naito, 2004). Tienen forma irregular y se localizan en la luz de los sinusoides, y son las responsables de reconocer numerosos estímulos de patógenos provenientes de la circulación portal; por lo tanto tienen un papel crítico en la respuesta inmune innata. Estas células muestran gran plasticidad, y presentan dos estados de activación, designados como M1 y M2. Los macrófagos M1 expresan mayormente citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-12), mientras que los M2 se caracterizan por expresar mediadores antiinflamatorios (IL-10, IL-1) (Gordon, 2003; Mosser, 2008; Dixon, 2013).

Células estrelladas

En 1951, Ito identificó y reportó células que contenían gotitas de lípidos en el espacio perisinusoidal y las llamo “células almacenadoras de grasa” (Ito T, 1951). Comúnmente también se conocían como lipocitos y células perisinusoidales. Sin embargo, en 1996 se llegó al consenso de que estas células se denominaran células estrelladas hepáticas (CEH). Constituyen aproximadamente el 5-10% del

número de células hepáticas residentes (Khomich, 2019). Como se muestra en la figura 9, estas células se encuentran en el espacio de Disse adyacente a los hepatocitos, debajo de la capa endotelial sinusoidal fenestrada (Häussinger, 2019). Esta ubicación le facilita el contacto directo con hepatocitos, células endoteliales, células de Kupffer y otras células estrelladas.

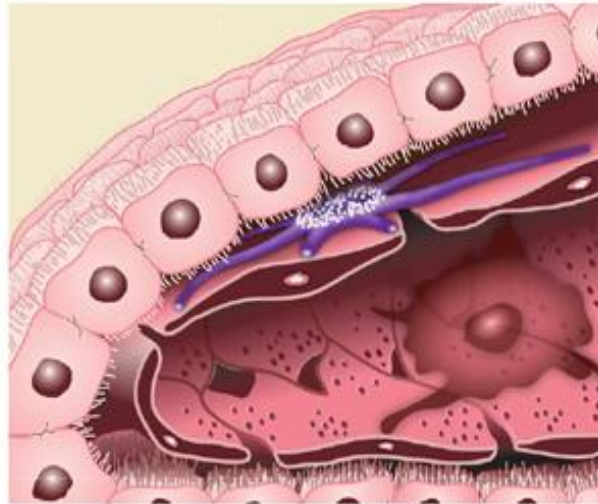


Figura 9. Localización de las células estrelladas hepáticas (en morado) y apariencia del microambiente sinusoidal en el hígado sano. (Tomada de Osna NA, 2017).

Las CEH inactivas o quiescentes son el principal lugar de almacenamiento de vitamina A (~80-90% en un individuo sano) en numerosas gotas de grasa perinuclear (Higashi, 2003). Las gotas de lípidos consisten en ésteres de retinilo (42%), colesterol (13%), fosfolípidos (4%) y triglicéridos (28%) (Yamada, 1987; Moriwaki, 1988).

En respuesta a la lesión hepática, los mediadores inflamatorios promueven la activación de las CEH, que representa una transdiferenciación a un fenotipo similar a los miofibroblastos, que son altamente proliferativos y migratorios. La activación comprende 3 fases (Fig. 10):

1. **INICIO:** Se refiere a la activación transitoria y rápida de las células inactivas, en donde ocurren cambios tempranos en la expresión génica y el fenotipo, lo que ocasiona que estas células respondan a citocinas y estímulos principalmente parácrinos por poblaciones de células vecinas (Friedman,

2000). Las células endoteliales inducen la activación secretando fibronectina y activando el factor de crecimiento transformante beta latente (TGF- β) (Jarnagin, 1994; Kojima, 2000). Las plaquetas y células de Kupffer secretan el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el cual es el mitógeno más potente de las células estrelladas (Borkham-Kamphorst, 2007). También, las células de Kupffer estimulan tanto la activación y proliferación de las CEH a través de las acciones de las citocinas como IL-1, TNF- α , ROS y peróxidos lipídicos (Puche, 2013).

2. PERPETUACIÓN: Incluye eventos celulares que amplifican el fenotipo activado de las CEH a uno más miofibroblástico, proliferativo y contráctil, el cual está mediado por una mayor expresión y capacidad de respuesta de las citocinas principalmente autocrinas (Friedman, 1999). En la figura 10 se observan los siete cambios en el comportamiento celular implicados en esta fase: 1) Pérdida de los retinoides intracelulares con la finalidad de poder modificar su citoesqueleto (Friedman, 1993). 2) Quimiotaxis, estas células migran a las áreas de lesión, mediado por moléculas quimioatrayentes como la proteína quimiotáctica monocítica 1 (MCP-1) y PDGF (Marra, 1999; Kinnman, 2000). 3) Liberación de citocinas que son quimioatrayentes de glóbulos blancos como el factor estimulante de colonias de macrófagos y MCP-1, y que además pueden activar a otras CEH por mecanismos autocrinos y/o parácrinos (Pinzani, 1992). 4) Proliferación estimulada por factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y PDGF (Yoshiji, 2003; Steiling, 2004). 5) Contractilidad mediado por endotelina-1, que además es un estímulo autocrino para las CEH (Rockey, 1998). 6) Fibrogénesis, no sólo se genera al aumentar el número de CEH, sino también al incrementar la producción de MEC (Shek, 2004). Estas células sintetizan diversas proteínas de la MEC como laminina, proteoglicanos, fibronectina, pero principalmente colágeno tipo I (Xu, 2016). Este proceso es muy complejo en donde múltiples citocinas están involucradas pero el estímulo más potente y

dominante es TGF- β 1 (Kanzler, 1999; Friedman, 1999). 7) Degradación de la matriz o fibrinólisis, en este proceso están involucradas las metaloproteinasas de matriz, en donde las CEH son la fuente principal de MMP-2, MMP-9 y MMP-13 (Arthur, 1992; Schaefer, 2003; Yuan-Ping, 2007).

3. RESOLUCIÓN: Una vez que la lesión cede o es eliminado el agente causal, se han propuesto dos vías potenciales para la reducción de las CEH activadas: la reversión a un fenotipo inactivo (estado de reposo) y/o su eliminación por apoptosis (Iredale, 2001; Minicis, 2012). Esta última etapa aún no es del todo clara porque no existe evidencia concisa en modelos *in vivo*.

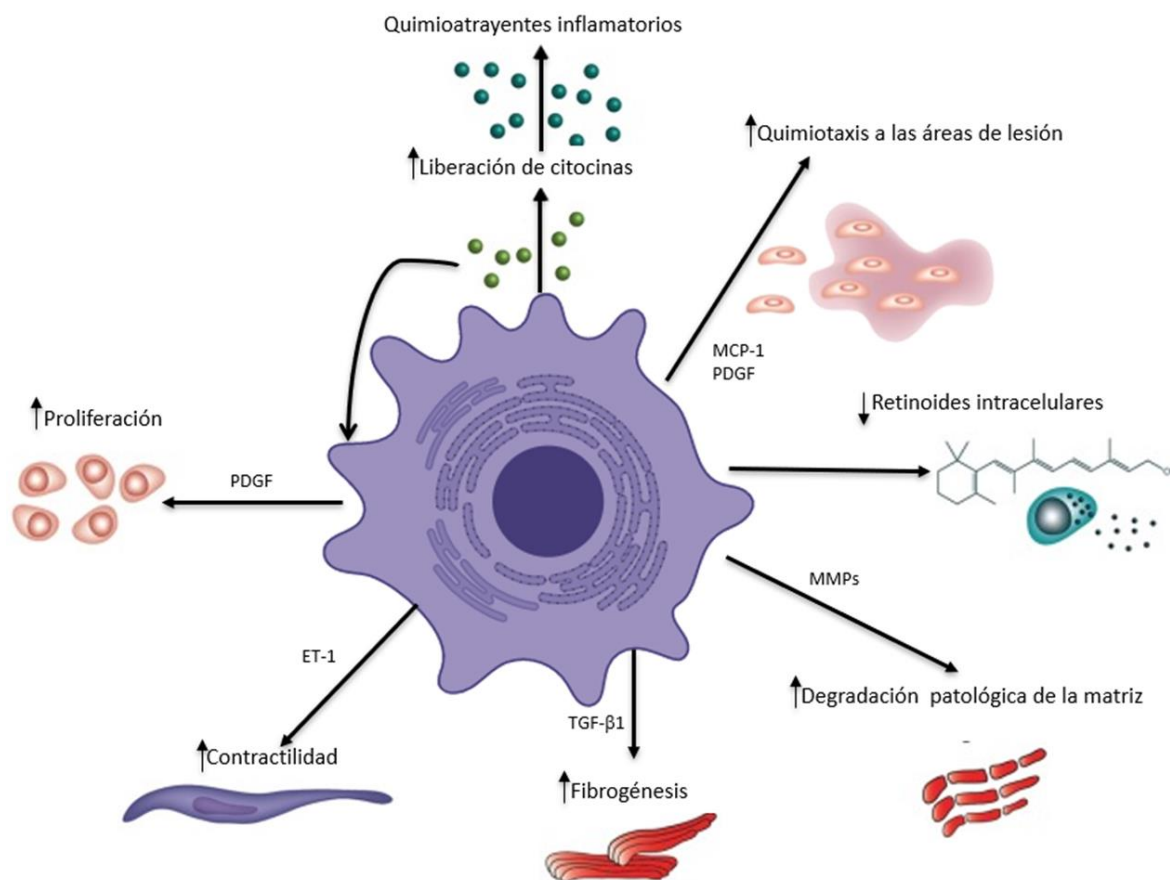


Figura 10. Características fenotípicas de la activación de las células estrelladas hepáticas.

Los principales cambios después de la activación incluyen pérdida de retinoides, quimiotaxis, proliferación, contractilidad, fibrogénesis y degradación de la matriz. Tomado y modificado de Friedman, 2008; Tsuchida, 2017.

Es importante mencionar que la matriz extracelular es una red estructural altamente dinámica que se encuentra presente en todos los tejidos (Theocharis, 2016). Esta constituida por colágenos, proteoglicanos, elastina, fibronectina, lamininas, glicosaminoglicanos y glicoproteínas. Además de proporcionar soporte físico, también regula muchos procesos celulares, como el crecimiento, migración, diferenciación, supervivencia y homeostasis (Bonnans, 2014). Continuamente la MEC es remodelada, mediado por enzimas específicas como las metaloproteinasas que degradan la matriz durante condiciones normales y patológicas.

En resumen, las células estrelladas son las encargadas de mantener la homeostasis tisular en el hígado, por su función de síntesis de proteínas de la MEC y de la degradación de ésta. Sin embargo, las CEH están cada vez más implicadas en procesos patológicos (fibrosis, cirrosis, hepatocarcinoma), inflamatorios y fibrogénicos. Esto se debe a un desequilibrio entre la producción y degradación de la MEC en donde están involucradas las metaloproteinasas de matriz.

Metaloproteinasas de matriz

Las MMPs son una familia de endopeptidasas sintetizadas por las células estelares y macrófagos (Arthur, 1992; Wynn, 2011). Dependen del metal zinc para su actividad enzimática, también requieren de calcio para llevar a cabo su acción biológica y mantener su estabilidad estructural. Cumplen una función muy importante en la remodelación de la MEC (Cui, 2017), pero cuando se altera la expresión de estas proteínas se genera degradación anormal de dicho MEC.

Las características básicas de las MMPs son: 1) contiene un péptido señal que dirige la secreción de las células y además determina si la proteína será anclada a la membrana; 2) cuenta con un pro-dominio amino terminal que contiene una cisteína conservada que interactúa con el zinc, de esta forma se mantiene constante su actividad enzimática; 3) El dominio catalítico contiene una región altamente conservada de unión de dos iones de zinc, uno de ellos con función estructural y otro con actividad catalítica (Fig. 11) (Morgunova, 1999; Coussens, 2002; Egeblad, 2002). Algunas MMPs incluyen una región bisagra, un dominio tipo hemopexina, un dominio transmembranal y dominios de fibronectina tipo II (Fasciglione, 2012). La activación de las MMPs requiere de la eliminación proteolítica del pro-dominio, generalmente por serín proteasas, plasmina u otras MMPs (Murphy, 1999; Nagase, 2006).

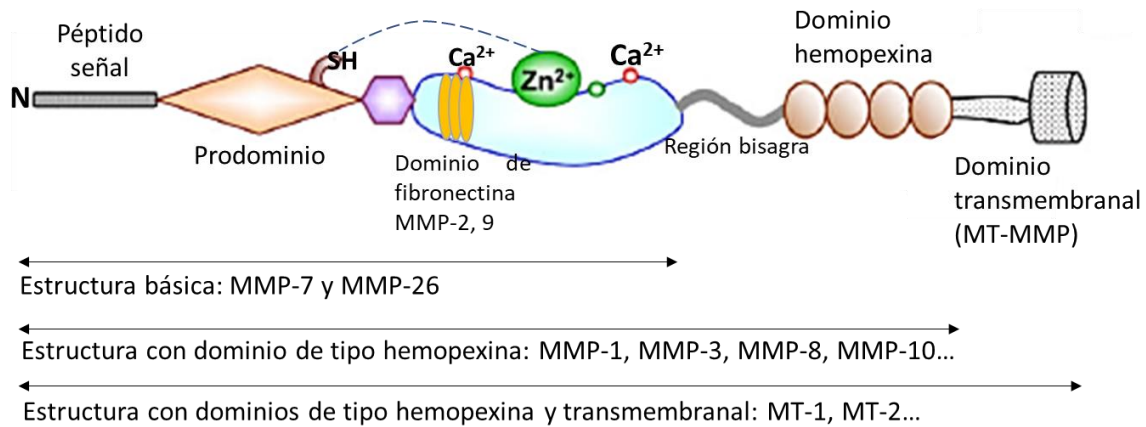


Figura 11. Estructura representativa de las metaloproteinasas de matriz. Tomado y modificado de Cui, 2017.

En los humanos, la familia de MMPs está compuesta por 24 proteínas codificadas por distintos genes. Como se muestra en la Tabla 1, se agrupan en siete categorías según su estructura y funciones proteolíticas: colagenasas, gelatinasas, estromelisin, matrilisin, metaloelastasa, MMPs de tipo membranal y otras MMPs (Jackson, 2010; Jabłońska-Trypuć, 2016).

Tabla 1. Clasificación de las MMPs basado en la estructura y a su especificidad por los componentes de la matriz extracelular. (D: desconocido). Tomado y modificado de Kapoor, 2016; Napoli, 2020; Geervliet, 2020.

CLASE	GENE	SUSTRATOS
Colagenasas	MMP-1	Colágeno I, II, III, VII y X
	MMP-8	Colágeno I, II y III
	MMP-13	Colágeno fibrilar I, III, IV, X, XIV, fibronectina, agregcano, tenascina C
Gelatinasas	MMP-2	Gelatina, colágeno I, II, III, IV, VII, X
	MMP-9	Gelatina, fibronectina, elastina, plasminógeno, colágeno I, IV, V, VII
Estromelisinias	MMP-3	Fibronectina, laminina, gelatina I, III, IV, V, colágeno III, IV, X y IX
	MMP-10	Fibronectina, elastina, , gelatina I, III, IV, V
	MMP-11	Colágeno IV, fibronectina, laminina y agregcano
Matrilisinias	MMP-7	Caseína, fibronectina, gelatina I, III, IV y V
	MMP-26	Fibronectina, fibrinógeno, caseína, colágeno IV, gelatina I
Metaloelastasas	MMP-12	Elastina, fibronectina y colágeno IV
MMP de membrana	MMP-14	Gelatina, fibronectina, laminina y colágeno I, II, III
	MMP-15	Gelatina, fibronectina, laminina y colágeno
	MMP-16	Fibronectina, colágeno
	MMP-17	Fibrinógeno, fibrina
	MMP-24	Fibronectina, N-cadherina, proteoglicanos
	MMP-25	D
Otras	MMP-19	Colágeno IV, laminina, fibronectina, agregcano, gelatina I
	MMP-20	Amelogenina, agregcano
	MMP-21	Antitripsina
	MMP-23	D
	MMP-27	Fibronectina, laminina, gelatina y colágeno
	MMP-28	Caseína

Relación de las células estrelladas y las metaloproteinasas de matriz

En un estado fisiológico normal, las CEH son las responsables de la remodelación de la MEC y de la actividad proteolítica, ambos procesos están coordinados dando como resultado un recambio tisular controlado. Sin embargo, en situaciones

patológicas o cuando existe alguna lesión y/o daño hepático se altera el equilibrio de síntesis y degradación de la MEC. Primero estas células se transdiferencian morfológica y funcionalmente, convirtiéndose en miofibroblastos contráctiles. Enseguida, existe una deposición excesiva de componentes de la MEC sobretodo de colágeno, a este proceso se le conoce como fibrogénesis. En estas condiciones, las MMPs son rápidamente sobreexpresadas por las CEH y degradan la mayoría de las fibras presentes (fibrólisis). Se ha asociado a las CEH y a las MMPs como responsables de diversas patologías, por lo tanto, es de suma importancia su estudio y comprensión.

Tratamiento del AHA

Los fármacos indicados para la amibiasis extraintestinal incluyen a nitazoxanida, cloraquina, emetina y a los nitroimidazoles (metronidazol, tinidazol, satronidazol) (Choudhuri, 2012). De estos el metronidazol es el más utilizado en la práctica medica. A pesar de presentar buena eficacia terapéutica, el uso indiscriminado de estos fármacos ha provocado que el parásito adquiera resistencia, lo que sugiere la aparición de cepas resistentes a dichos tratamientos (Bansal, 2004; Debnath, 2019). Aunado a los efectos adversos y citotóxicos que ejercen sobre la microbiota intestinal, también se ha demostrado que el metronidazol y sus derivados generan mutaciones, pudiendo llevar al desarrollo de cáncer (Muhammad, 2018). Con base en lo anterior es necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas. En ese sentido, podrían funcionar fármacos que no afecten directamente al parásito, pero si el microambiente necesario para su proliferación y sobrevivida. Como el caso de algunos fármacos que tienen actividad antifibrogénica y antifibrolítica como oxitiamina (Chih-Min, 2010), pioglitazona (Ibrahim SA, 2021), y doxiciclina (Pozzi A, 2002). Además, estos compuestos podrían ayudar a comprender los mecanismos involucrados en la destrucción del tejido hepático del hospedero, y/o describir los posibles mecanismos de diseminación del parásito, que podría derivar en la propuesta de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la amibiasis en humanos.

JUSTIFICACIÓN

En México, la amibiasis constituye un grave problema de salud pública, además es una de las parasitosis que presenta los más altos índices de morbilidad a nivel mundial. Por otra parte, a pesar de que los nitroimidazoles presentan gran eficacia terapéutica, su uso indiscriminado causa efectos adversos ejemplos, y no se dispone de alternativas terapéuticas. Actualmente se conoce que el principal responsable del daño tisular en el AHAEH es la respuesta inflamatoria del hospedero; sin embargo, algunas moléculas como ROS, RNS, IL-1 se encuentran disminuidas. Por otra parte, se ha propuesto que durante el desarrollo del absceso hepático amibiano existen 2 zonas caracterizadas por procesos de fibrogénesis y fibrólisis. Al respecto, las células hepáticas estrelladas pudieran ser las responsables de dichos procesos y contribuir a la histopatología que caracteriza dicha infección al sintetizar fibras de colágeno y MMPs. Sin embargo, los estudios que exploran la contribución de las CEH al desarrollo del AHA son nulos. El estudio de estas células y los mecanismos implicados pueden contribuir a la comprensión de la patología.

HIPÓTESIS

La fibrogénesis y la destrucción tisular en las etapas tardías del absceso hepático amibiano experimental en hámster se debe a la actividad de las células estelares al sintetizar fibras de colágeno y metaloproteinasas de matriz extracelular.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si las células estelares están involucradas en los mecanismos moleculares de daño en las etapas tardías del absceso hepático amibiano experimental en hámster.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la presencia de células estelares en cortes histológicos durante el desarrollo del AHAEH
- Determinar en condiciones *in vitro* el efecto de posibles inhibidores de las funciones de las células estelares y de MMPs de matriz extracelular
- Determinar el efecto de los fármacos oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina durante el desarrollo del AHAEH
- Analizar los cambios histológicos durante el desarrollo del AHAEH en hámsteres normales (control) y hámsteres tratados con los fármacos inhibidores
- Identificar y determinar la distribución de alfa-actina de músculo liso durante el desarrollo del AHAEH en hámsteres normales (control) y hámsteres tratados con los fármacos inhibidores
- Identificar a MMP-9 en el AHAEH en hámsteres normales y hámsteres tratados con los fármacos inhibidores

METODOLOGÍA

Para identificar alguno de los mecanismos moleculares de daño en etapas tardías del absceso hepático amibiano, fue necesario contar con una cepa amibiana de alta virulencia, para lo cual se desarrolló el siguiente protocolo.

Mantenimiento de la virulencia de *E. histolytica* y cultivo axénico

La virulencia de los parásitos se mantiene mediante la recuperación mensual de los trofozoítos del absceso hepático amibiano de hámsteres.

Dos hámsteres machos Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*) se anestesiaron por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (6.3mg/100 gr de peso corporal) diluido en solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Se les realizó una laparotomía descubriendo la vena porta y se inyectó 1×10^6 trofozoítos de amibas virulentas HM1: IMSS resuspendidas en 0.2 ml de PBS. Los hámsteres se mantuvieron por 7 días con agua y alimento *ad libitum*. Posteriormente, los animales se sacrificaron con sobredosis de anestesia (18.9 mg/100 gr), los hígados se extrajeron y se colocaron en una caja Petri estéril. Se cortaron en pequeños fragmentos y se depositaron en tubos estériles de 8 ml que contienen 6 ml de medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino adulto al 10% y vitaminas al 3% y 30 μ L de una mezcla de antibióticos (estreptomicina 1 gr, bencilpenicilina 800000 UI y cefalexina 30mg/5mL). Los tubos se incubaron a 36.5 °C y se realizaron 4 cambios de medio cada 12 h (los trofozoítos se encuentran adheridos en la pared de los tubos). Finalmente, los trofozoítos se cultivaron en cajas de plástico estériles a 36.5 °C en condiciones axénicas durante 72 h. Posteriormente y para determinar la efectividad del protocolo de obtención de amibas, se determinó la viabilidad de los cultivos de trofozoítos amibanos conforme a lo siguiente.

Conteo de trofozoítos

Los trofozoítos se cultivaron en medio TYI-S-33 a 36.5 °C en condiciones axénicas durante 72 h. Enseguida las amibas se colocaron en tubos estériles de 50 ml, los trofozoítos se recolectaron por centrifugación a 2000 x g durante 5 min, el medio se descartó y los trofozoítos se lavaron dos veces con solución amortiguadora de

fosfatos (PBS). Después, se resuspendieron y se realizó una dilución 1:10 en PBS, se colocaron en 50µl de azul tripán. El conteo se realizó en cámara de Neubauer y se determinó el número de trofozoítos viables.

Crecimiento amibiano *in vitro* en presencia de inhibidores de CEH y de MMPs

Debido a que dentro de los objetivos estuvo determinar la participación de las células estrelladas en el desarrollo del absceso hepático amibiano, se realizaron experimentos preliminares para determinar el posible efecto de diferentes fármacos en la viabilidad de trofozoítos de la amiba y con eso establecer las dosis hacia los hamstéres.

Se incubaron 2×10^5 trofozoítos en 4 ml de medio TYI-S-33 en presencia de los siguientes inhibidores: 1) oxitiamina 250 µM; 2) doxiciclina 20 y 250 µM; y 3) pioglitazona 50, 150 y 250 µM. Se utilizaron como controles cultivo en ausencia de inhibidores y otro cultivo con medio más 10 µL de DMSO (vehículo). Después de 72 h de incubación a 36.5 °C, se determinó la viabilidad amibiana con azul tripán. Se realizaron tres experimentos independientes y el conteo se realizó por duplicado.

Absceso hepático amibiano experimental en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina

Se utilizaron 54 hámsteres Sirio Dorado con un peso promedio de 100-110 gr provenientes del Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina. Se mantuvieron en condiciones controladas, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h y temperatura de 18-25°C, con alimento y agua *ad libitum*.

Los animales se dividieron aleatoriamente en 6 grupos y se les administró el fármaco correspondiente un día previo a la infección amibiana. La administración se realizó intraperitonealmente cada 12 h (en total dos dosis para cada compuesto). Las dosis administradas se eligieron de acuerdo a lo previamente reportado, considerando que estuvieran dentro del intervalo de concentración que

no tuviera efectos sobre la sobrevivencia de los parásitos determinada en cultivos *in vitro*.

A continuación, se enlistan cómo se manejaron los grupos de hámsteres con los diferentes fármacos, así como la potencial acción de estos.

- 1.- Grupo control (PBS)
- 2.- Grupo control con DMSO: (100µl)
- 3.- Grupo Oxitiamina: 125mg/kg/24 h (Chih-Min, 2010). Inhibe la expresión de MMPs, también es un inhibidor de transcetolasa.
- 4.- Grupo Metilprednisolona: 70mg/kg/24h (Olivos, 2005). Tiene acción antiinflamatoria, inmunosupresora y antifibrogénica (Czaja, 2004).
- 5.- Grupo Pioglitazona: 10mg/kg/24h (Ibrahim, 2021). Regula a la baja la activación de las células estelares.
- 6.- Grupo Doxiciclina: 80mg/kg/24h (Pozzi, 2002). Inhibe la actividad de las MMPs.

En total se usaron 54 hámsteres Sirio Dorado, los cuales se anestesiaron con pentobarbital sódico (6.3mg/100 gr de peso corporal) y enseguida se realizó una incisión de 1.5 cm en la cavidad abdominal de los animales, en la cual se inyectaron trofozoítos resuspendidos en PBS ($1 \times 10^6/200\mu\text{l}$). Posteriormente se colocó gelfoam en el sitio de la inyección para evitar la hemorragia. Enseguida se suturó en dos planos con hilo seda calibre 4-0.

Después de 1, 3 y 7 días de infección, 3 animales de cada grupo se eutanasiaron con sobredosis de anestesia. Enseguida, los hígados se extrajeron, fotografiaron, cortaron y se colocaron en tubos con 30 ml de formol al 10% en PBS.

Para determinar el área de lesión en las fotografías de los hígados de hámster, se utilizó el *software Image J*. Primero se hizo una selección manual del área de interés la cual se cuantificó con base al área total de la fotomicrografía. Enseguida se realizó la conversión de pixeles a centímetros (cm).

Declaración de ética

Todos los experimentos con animales se realizaron en estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”. También, todos los procedimientos animales se realizaron bajo el protocolo número 026-CIC-2019, aprobado por las Comisiones de Investigación y de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales.

Análisis histológico

Una vez fijados los hígados, se deshidrataron e incluyeron los tejidos en parafina (Anexo 1). Enseguida los bloques se cortaron en un microtomo Leica RM2245, y se obtuvieron cortes de ~ 5 μm de grosor, se montaron en portaobjetos cubiertos de poli-L-lisina.

Las laminillas de todos los grupos experimentales se desparafinaron y rehidrataron mediante procedimientos estandarizados (Anexo 2). Posteriormente, se realizaron las siguientes tinciones:

- a) Tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS): permite detectar el almacenamiento de glucógeno en las células (García-Mendoza, 2018). Los tejidos se trataron con solución de ácido peryódico (0.5%) durante 10 min, se lavaron 3 veces con agua destilada. Después, los tejidos se cubrieron con el reactivo de Schiff durante 10 min, seguido de un lavado con agua corriente. Se colocaron las laminillas en disulfito de sodio (0.5%) por 6 min. La contratinción se realizó con hematoxilina de Harris durante 5 min y se diferenciaron con alcohol ácido al 1%. Enseguida, las laminillas se pasaron en solución de carbonato de Litio (1%). Finalmente, los tejidos se deshidrataron y se montaron en resina hidrofóbica.

- b) Tinción Tricrómica de Masson (TM): permite visualizar fibras de colágeno y fibras reticulares. Se tiñeron las laminillas con hematoxilina férrica durante 10 min, se lavaron con agua corriente. Enseguida, se tiñeron con la solución de

escarlata-fucsina ácida por 5 min, las laminillas se lavaron con agua destilada. Después, los tejidos se trataron con solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico por 10 min. Se tiñeron con solución de azul de anilina durante 15 min. Se lavaron en agua destilada y finalmente se diferenciaron en la solución de ácido acético al 1% durante 3 min.

- c) Tinción Rojo Sirio (RS): permite determinar los depósitos de fibras de colágeno tipo I (rojo) y III (verde). Primero las laminillas se tiñeron con hematoxilina de Weigert por 10 min. Posteriormente se incubaron con rojo sirio picro durante una hora y se lavaron 2 veces con agua destilada. Finalmente se deshidrataron y montaron con resina hidrofóbica.

Finalmente, se analizaron y fotografiaron las zonas representativas de cada grupo a 20X, utilizando campo claro para la tinción de PAS y TM. Para la tinción RS se utilizó la técnica microscópica de luz polarizada.

Inmunofluorescencia para determinar alfa-actina de músculo liso (α -SMA)

Con la determinación de α -SMA se pretende identificar a las células hepáticas estelares activadas, al ser uno de los marcadores más utilizados. Después de la rehidratación de los tejidos, se realizaron 2 lavados con solución salina tamponada con tris y Tween 20 (TBST, 10mM-pH 7.4), se permeabilizaron con tritón al 0.1% durante 30 min. Posteriormente, se realizó el bloqueo de la membrana de transferencia con suero de cabra (1:2) por 2 h. Se realizaron 5 lavados y se incubó el anticuerpo primario anti- α -SMA (1:100) (Abcam ab-5694) durante toda la noche. Enseguida, se incubó durante 5 h el anticuerpo secundario de cabra anti IgG de conejo conjugado con Alexa-488 (1:500) en oscuridad. Los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (2 μ g/ml). El montaje se realizó con 10 μ l de Vectashield. Las fotografías se tomaron en microscopio Nikon microphot FXA a 10X y 20X, las condiciones de exposición fueron las mismas para todos los grupos experimentales.

Inmunofluorescencia para identificar a metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9)

Enseguida, se identificó la presencia de MMP-9 al ser una de las mayormente involucradas en el daño hepático. Después de desparafinar las laminillas, se realizó la recuperación antigénica con solución de citratos (pH 6) a punto de ebullición durante 5 min. Enseguida, se bloqueó con albumina (1%) y suero de cabra (10%) por 2 h. El anticuerpo primario conjugado anti-MMP-9-Alexa 488 (1:50) (sc-6-6B) se incubó toda la noche en oscuridad. Se realizaron 5 lavados y los núcleos se tiñeron con ioduro de propidio. Se utilizaron 10 μ l de Vectashield para el montaje. Finalmente se fotografiaron las zonas representativas a 20X.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM) y se evaluaron e interpretaron por análisis estadístico de ANOVA. Se utilizó GraphPad Prism versión 5.00 para Windows.

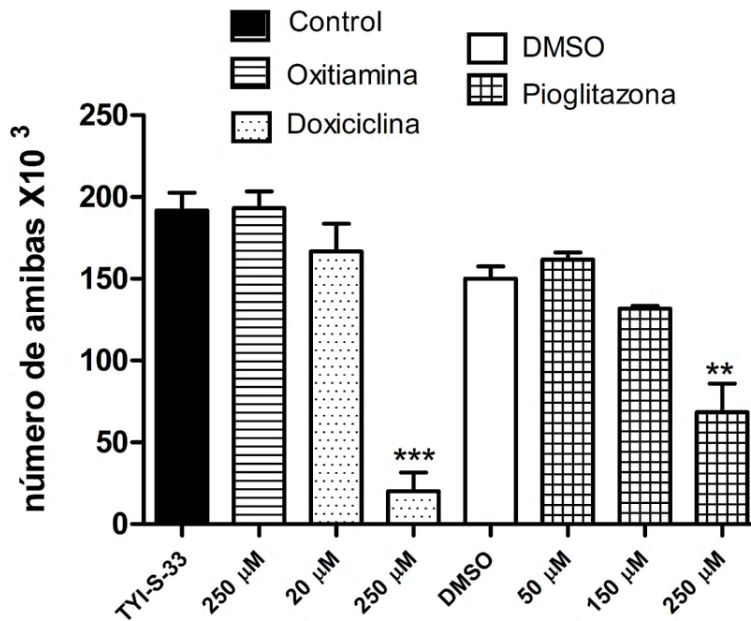
RESULTADOS

Crecimiento amibiano *in vitro* en presencia de inhibidores de las CEH e inhibidores de MMPs

Los fármacos que se utilizaron en este trabajo (oxitiamina, doxiciclina y pioglitazona), han demostrado tener buen potencial para revertir la fibrogénesis y fibrólisis en diversas enfermedades hepáticas. Debido a dichos efectos, se utilizaron para evaluar su efecto en el modelo *in vivo* del absceso hepático amibiano.

Primero se determinó las dosis de los fármacos que afectan la sobrevivencia y proliferación del parásito para ajustar las dosis de fármaco fuera de las concentraciones letales para el parásito. Además, se conocen las concentraciones que se utilizan *in vivo* en donde se inhibe la función de síntesis de fibras de las células estelares y de las MMPs.

Para evaluar el efecto citotóxico de oxitiamina (inhibidor de la transcetolasa y las MMPs), doxiciclina (inhibidor de las MMPs) y pioglitazona (inhibidor de la activación de las CEH) sobre trofozoítos de *E. histolytica*, se determinó el crecimiento amibiano *in vitro* en presencia de estos fármacos y se comparó con el crecimiento de los trofozoítos en presencia del medio de cultivo (TYI-S-33) (control).



Gráfica 1. Efecto de oxitiamina, doxiciclina y pioglitazona sobre *E. histolytica*. Las barras representan la media (n=3) ± EEM del crecimiento *in vitro* en presencia de oxitiamina (250 μM), doxiciclina (20 y 250μM) y pioglitazona (50, 150 y 250 μM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con post-prueba estadística Dunnett. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (amibas en medio TYI-S-33 ó amibas en presencia de DMSO) como se indica, **P≤0.01, ***P≤0.001.

En la gráfica 1 se observa que la oxitiamina a 250 μM no tuvo actividad amebicida debido a que el crecimiento amibiano fue similar al del grupo control. De manera similar, cuando se usó la doxiciclina a 20 μM no tuvo actividad amebicida, sin embargo, a 250 μM el número de amibas viables disminuyó significativamente. Por último, la pioglitazona presentó actividad amebicida a 250 μM, aunque a 50 y 150 μM no interfirió con el crecimiento amibiano en comparación con el grupo control. Los resultados de este grupo de experimentos indican el intervalo de concentraciones en el que los fármacos no interfieren en la sobrevivencia y proliferación de *E. histolytica*. Para el caso de oxitiamina fue de 0-250 μM, para doxiciclina de 0-20μM y para el fármaco pioglitazona fue de 0-150μM. Por tanto, tomando en cuenta este intervalo en donde se espera los fármacos no afecten la viabilidad de los parásitos, lo que se observe en el modelo animal bajo estas

condiciones de los inhibidores, se podrá atribuir a un efecto directo en la respuesta de las células del hospedero.

Evaluación macroscópica del absceso hepático amibiano en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina

Para evaluar el efecto de oxitiamina (inhibidor de MMPs y transcetolasa), metilprednisolona (inmunosupresor), pioglitazona (inhibidor de la activación de las células estelares) y doxiciclina (inhibidor de la actividad de las MMPs) en el desarrollo del AHAEH, se realizó la inyección intraportal de los trofozoítos en los diferentes grupos de hámsteres en ausencia o presencia de los compuestos. Después de 1, 3 y 7 días de infección los animales se sacrificaron y sus hígados se procesaron para el análisis histológico.

Análisis macroscópico por inspección visual:

Después de uno y tres días de infección hepática amibiana los hígados de los hámsteres tratados mostraron lesiones puntiformes, pequeñas y finas distribuidas en la mayoría de los lóbulos, muy similar a lo que se observa en los grupos control (Fig. 12 y 13). La gráfica 3 demuestra que no existen diferencias significativas en los pesos de los hígados de los animales tratados con respecto al control, el peso promedio de los hígados osciló entre los 4.27 y 5.96 gramos.

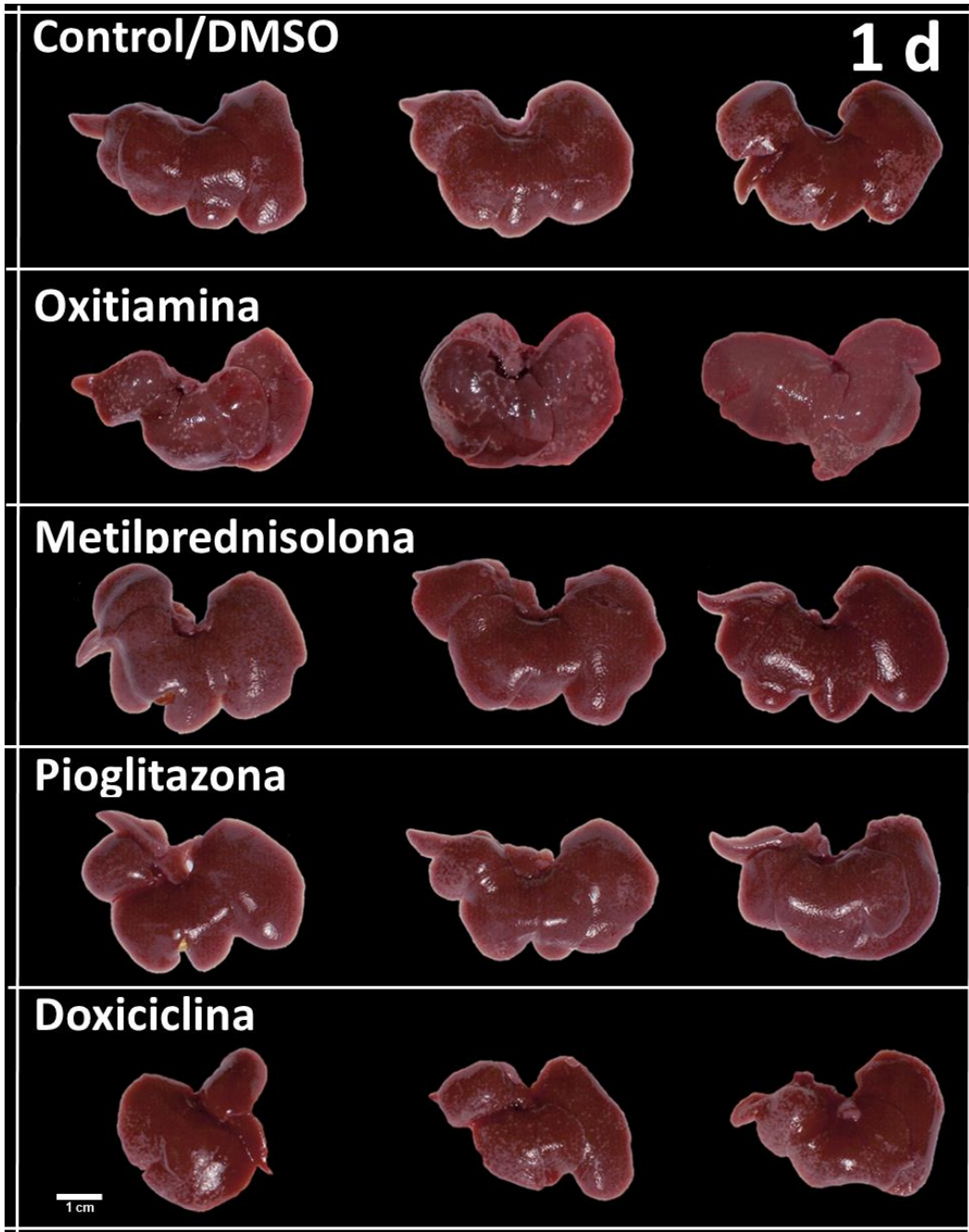


Figura 12. Evaluación macroscópica del absceso hepático amibiano en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina después de 1 día de infección. Aspecto macroscópico de hígados de hámster a 1 día de infección con 1×10^6 trofozoítos. La imagen muestra los hígados de los animales controles (administración de vehículo) y los tratados con los fármacos.

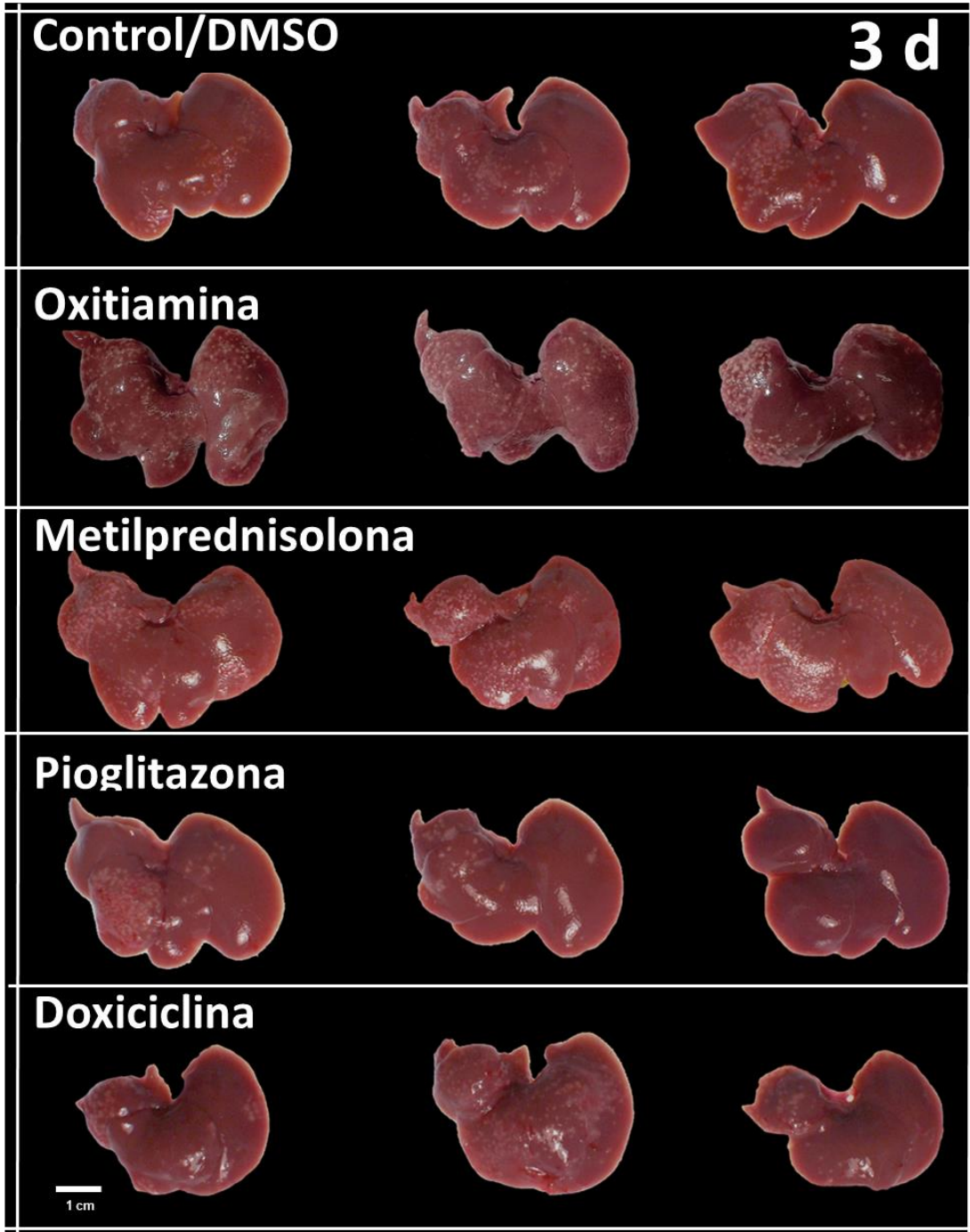


Figura 13. Evaluación macroscópica del absceso hepático amibiano en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina después de 3 días de infección. Aspecto macroscópico de hígados de hámster a los 3 días de infección con 1×10^6 trofozoítos. La imagen muestra hígados de animales controles y tratados con los fármacos.

Después de 7 días de infección (Fig. 14), el grupo control presentó hepatomegalia y múltiples lesiones extensas distribuidas en todos los lóbulos, algunas de ellas se fusionaron haciendo más aparente el daño. En el caso de los animales tratados con oxitiamina, metilprednisolona y doxiciclina, las lesiones fueron más pequeñas y finas; además de que en la mayoría de los lóbulos no se observó daño macroscópico. En el caso de pioglitazona uno de los hígados mostró lesiones muy similares al grupo control, y en los dos tejidos restantes las lesiones fueron finas y casi nulas.

En la gráfica 3, se observa que el peso promedio del grupo control a los 7 días de infección fue de 12.1 gramos, dato que se correlaciona con lo observado macroscópicamente. Contrario a esto, el promedio del peso de los hígados tratados con oxitiamina fue de 4.5 gramos, mientras que para el grupo metilprednisolona fue de 6.5 gramos, para los animales tratados con pioglitazona 6.4 gramos y para los hígados del grupo doxiciclina fue de 4.7 gramos; todo lo anterior fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control. Lo que representa ~1.8-2.6 veces menos peso que los hígados de los controles.

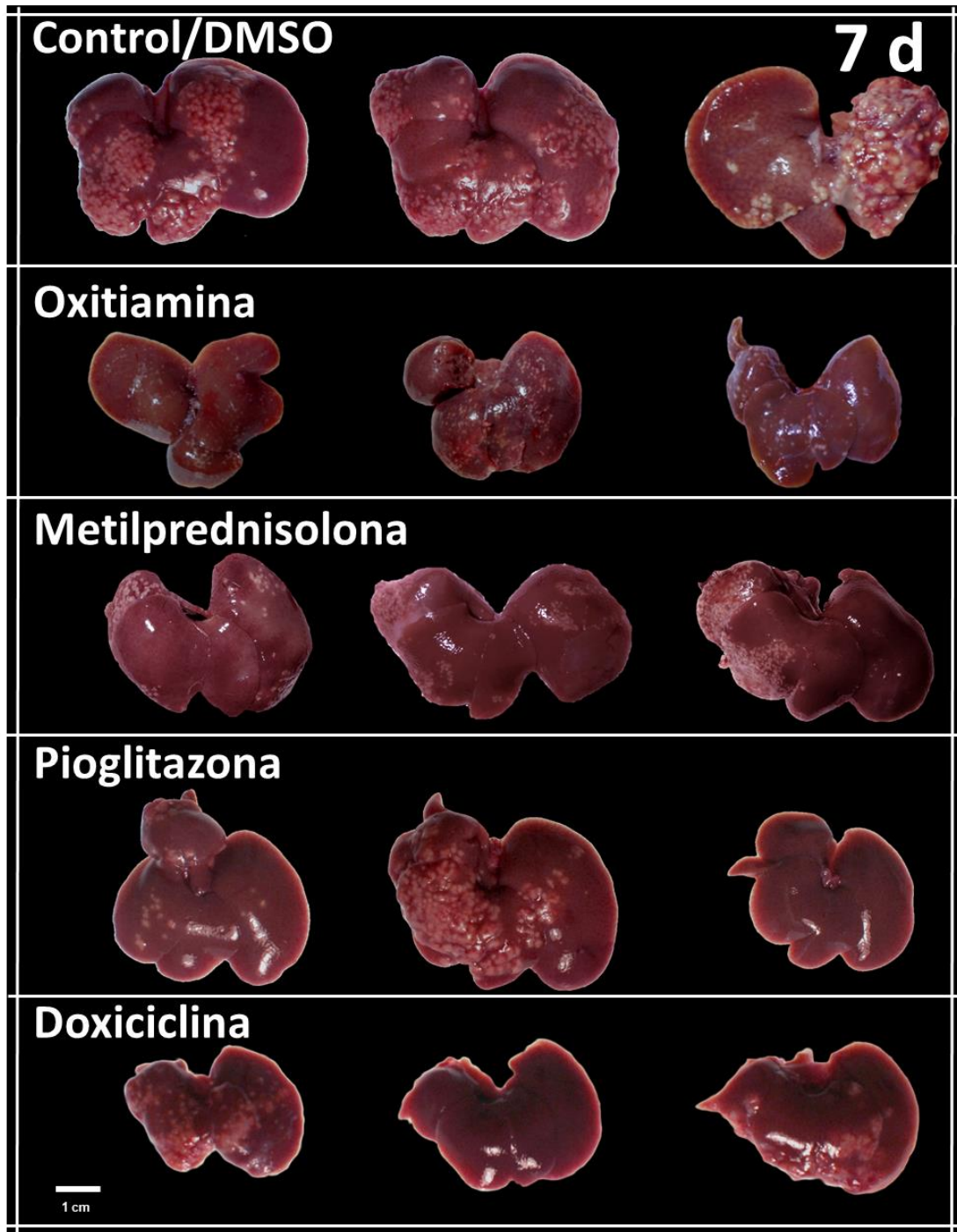
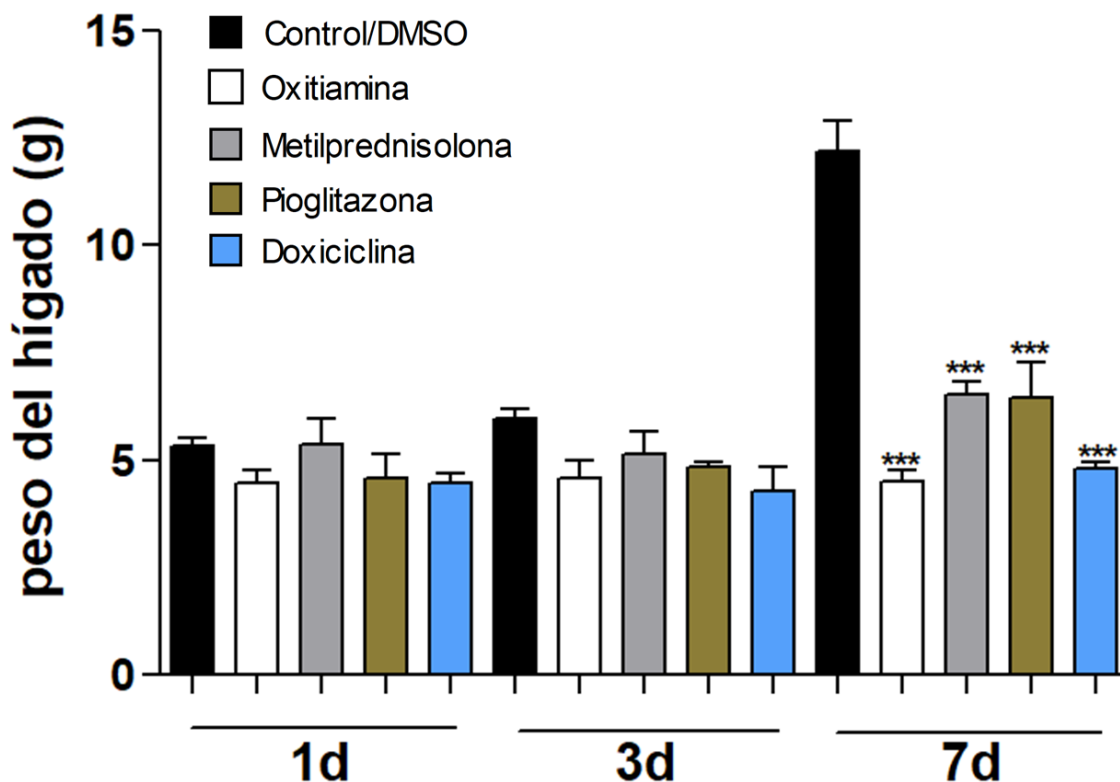
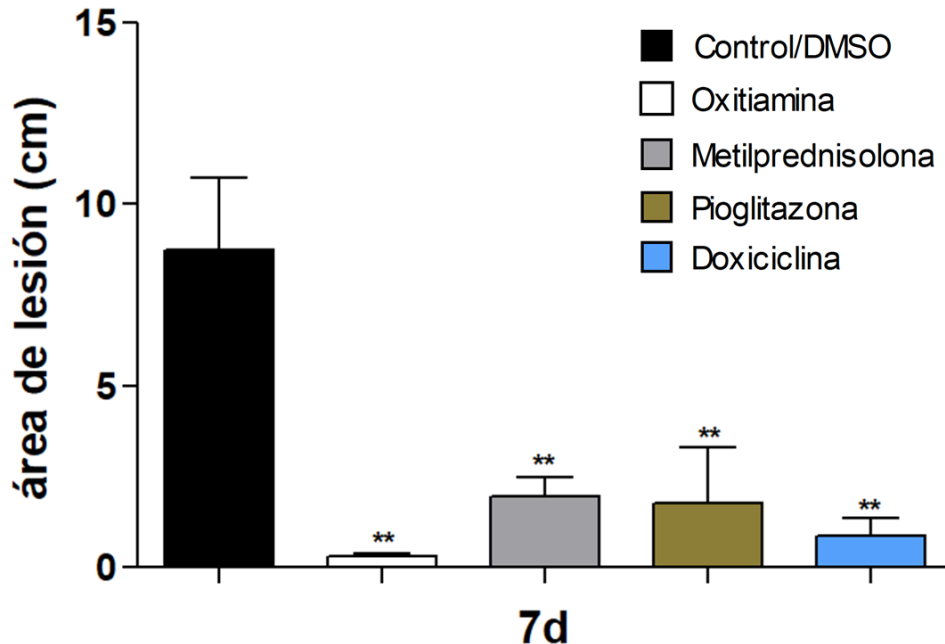


Figura 14. Evaluación macroscópica del absceso hepático amibiano en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina después de 7 días de infección. Aspecto macroscópico de hígados de hámster a los 7 días de infección con 1×10^6 trofozoítos. La imagen muestra hígados de animales controles y tratados con los fármacos.



Gráfica 3. Determinación y comparación del peso de los hígados de los grupos controles (AHAEH) y los tratados con oxitiamina, pioglitazona, metilprednisolona y doxiciclina a los 1, 3 y 7 días. Las barras representan la media (n=3) ± EEM del peso de los hígados de los animales tratados con oxitiamina, pioglitazona, metilprednisolona y doxiciclina. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA una vía con post-prueba estadística Dunnett. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control como se indica, ***P≤0.001.

Debido a que sólo hubo diferencias significativas en el peso y en el análisis macroscópico de los hígados a los 7 días de infección (figura 14 y gráfica 3), se determinó medir el área de lesión empleando el *software ImageJ-win64*. En la gráfica 4 se observa un decremento significativo en el área de daño en todos los grupos tratados con los compuestos (0.30 a 1.95 cm) con respecto al grupo control en donde el área promedio de lesión fue de 8.75 cm.



Gráfica 4. Determinación macroscópica del área de lesión de los hígados de los animales controles (AHAEH) y los tratados con oxitiamina, pioglitazona, metilprednisolona y doxiciclina a los 7 días. Las barras representan la media (n=3) ± EEM del peso de los hígados de los animales tratados con los compuestos. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA una vía con post-prueba estadística Dunnett. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control como se indica, **P≤0.01.

Evaluación microscópica del absceso hepático amibiano en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina

Después de la evaluación macroscópica, se analizaron los cambios microscópicos del absceso hepático amibiano en los hámsteres tratados con los fármacos, se realizaron las tinciones PAS, TM y RS.

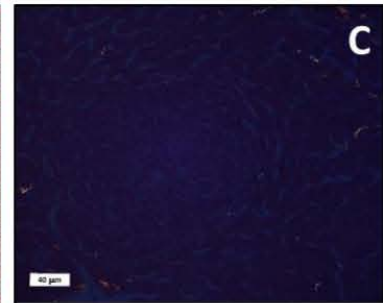
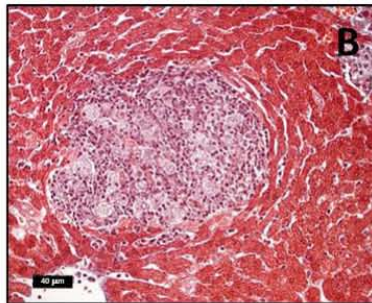
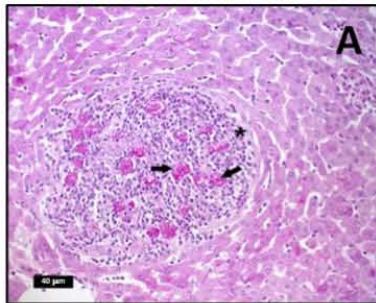
Después de un día de infección (figura 15) en el grupo control, así como en los que fueron tratados con los compuestos; en la tinción de PAS se observan amibas bien conservadas con una coloración rosa intenso rodeadas por pocas células inflamatorias. En los mismos grupos la presencia de fibras de colágena, analizada mediante la tinción tricrómica de Masson y rojo Sirio, fue nula.

Ácido peryódico de Schiff

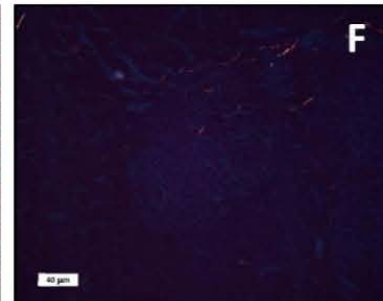
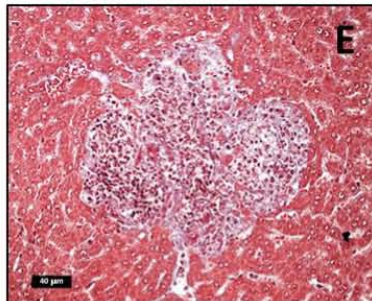
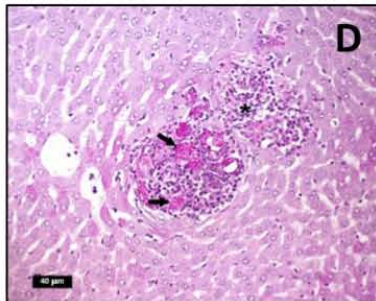
Tricrómica de Masson

Rojo Sirio

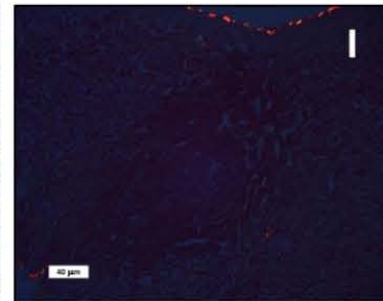
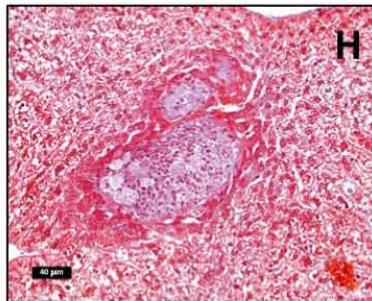
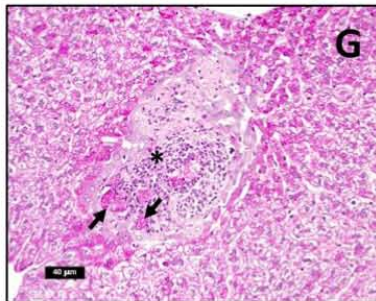
Grupo control



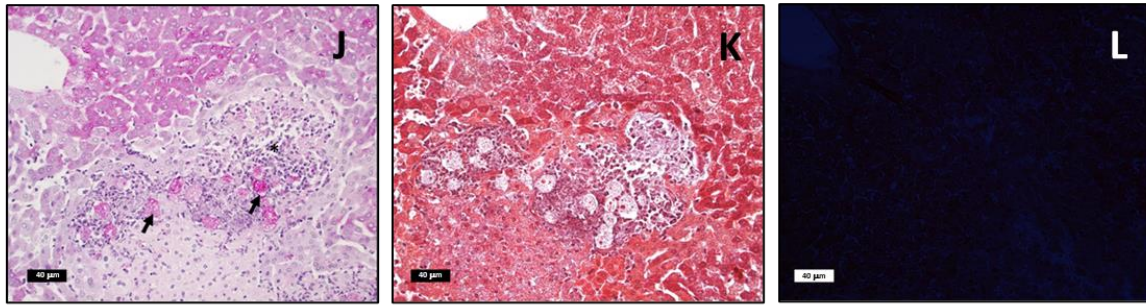
Grupo oxitiamina



Grupo metilprednisolona



Grupo pioglitazona



Grupo doxiciclina

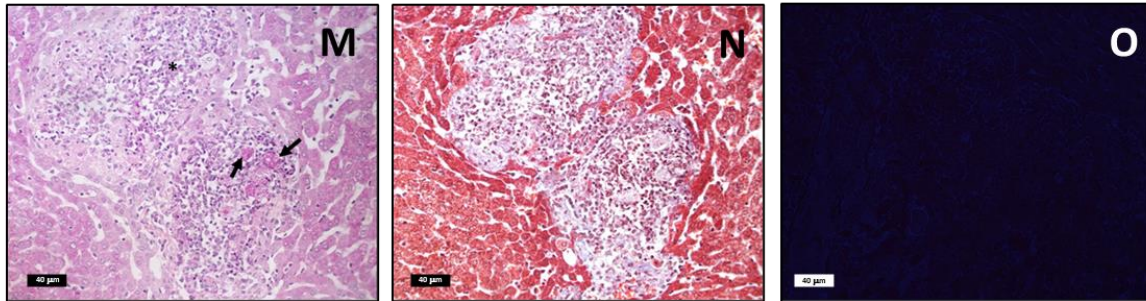


Figura 15. Evaluación microscópica un día después de la infección hepática amibiana en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina. Se muestran fotomicrografías representativas de las tinciones PAS, TM y RS tomadas a 20X de los grupos: control (A-C), oxitiamina (D-F), metilprednisolona (G-I), pioglitazona (J-L) y doxiciclina (M-O). Se observan amibas bien conservadas (➡); células inflamatorias (*).

A pesar de la falta de diferencias macroscópicas a los 3 días del desarrollo del AHAEH (Fig. 13), al realizar el análisis histológico se observó lo siguiente:

- Grupo control: en la figura 16A se observan múltiples lesiones redondeadas con parásitos bien conservados y rodeados por abundantes células inflamatorias. Además, la zona de fibrogénesis y el daño en el tejido se hizo evidente (necrosis), se observaron fibras en una coloración azul alrededor de la zona necrótica (Fig. 16B), lo cual es similar a lo que muestra la tinción RS en donde las fibras se observaron de color rojo intenso que corresponde a colágeno tipo I (Fig. 16C). A partir de este tiempo, se observan a las células alargadas, presentan núcleos esféricos, su citoplasma se extiende desde el núcleo observándose prolongaciones.
- Grupo oxitiamina: en este grupo se observan tres casos: 1) amibas bien conservadas, algunas en contacto directo con los hepatocitos (Fig. 16D); 2)

amibas fragmentadas (Fig. 16G); y 3) lesiones residuales (Fig. 16J) que es muy raro observar en el grupo control. Además, no es visible la zona de fibrogénesis, es decir las células alargadas se encuentran ausentes (Fig. 16 D, G, J) y no existe un incremento de fibras de colágeno (Fig. 16 E,F,H,I,K,L). También, las lesiones son pequeñas e irregulares rodeadas por mínimo infiltrado inflamatorio (Fig. 16G, D) y en algunas se observan restos celulares en coloración azul oscuro (Fig. 16D).

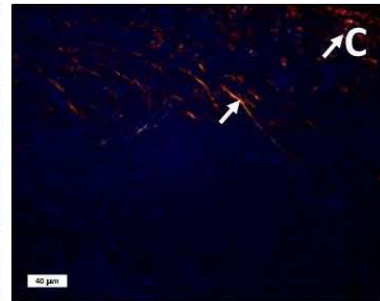
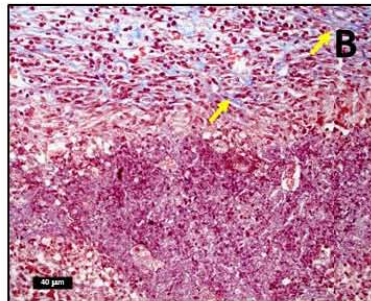
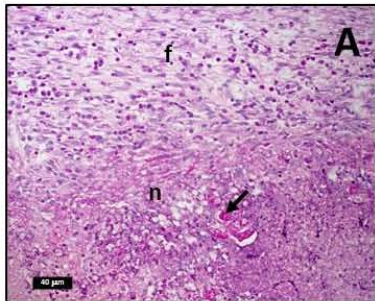
- Grupo metilprednisolona: se observa una mayor cantidad de parásitos bien conservados con respecto al control (Fig. 16M). Las lesiones son redondas y pequeñas, presentando una menor infiltración de leucocitos. Además, el daño tisular es escaso. La presencia de fibras de colágena fue casi nula (tinción TM y RS) y no se observa la zona de fibrogénesis (Fig. 16 N,O).
- Grupo pioglitazona: se observan amibas bien conservadas rodeadas por células inflamatorias (Fig. 16P). Además, la destrucción tisular es casi nula y no se observa la zona de fibrogénesis ni las fibras de colágeno (Fig. 16 Q,R).
- Grupo doxiciclina: En la figura 16S se observan amibas rodeadas por una menor cantidad de leucocitos, las lesiones son irregulares. No hay aparente necrosis y, además la presencia de fibras en coloración azul y roja es nula (Fig. 16 T, U).

Ácido peryódico de Schiff

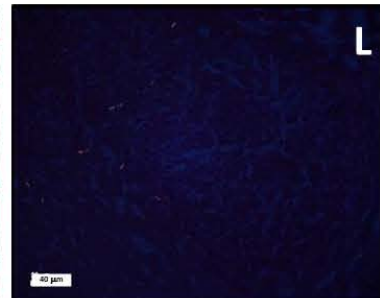
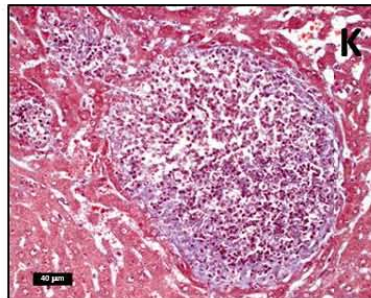
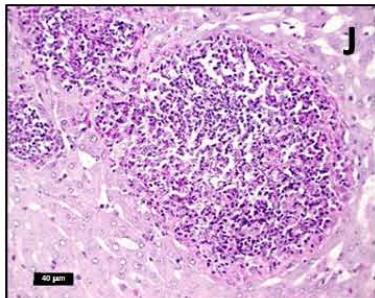
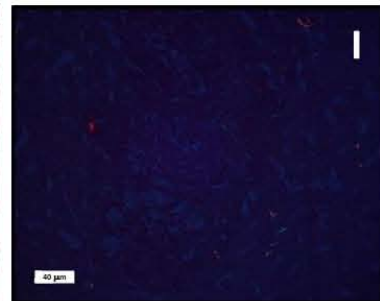
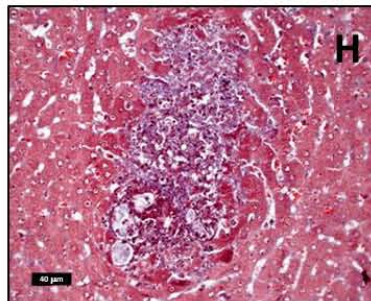
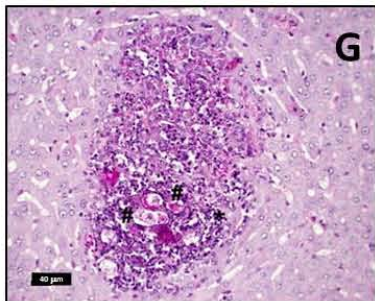
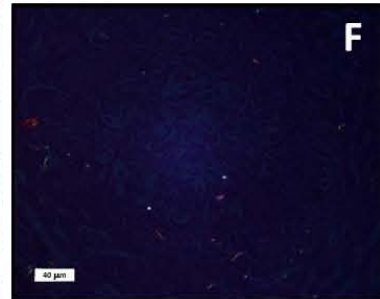
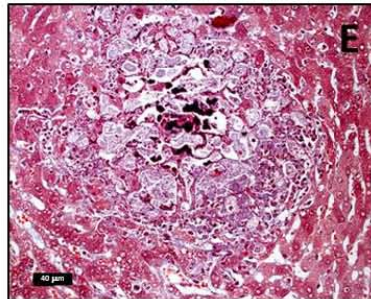
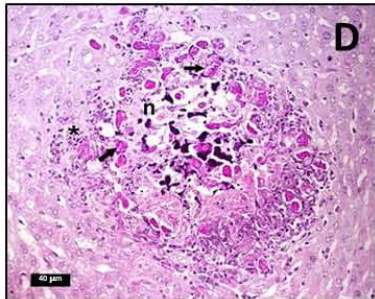
Tricrómica de Masson

Rojo Sirio

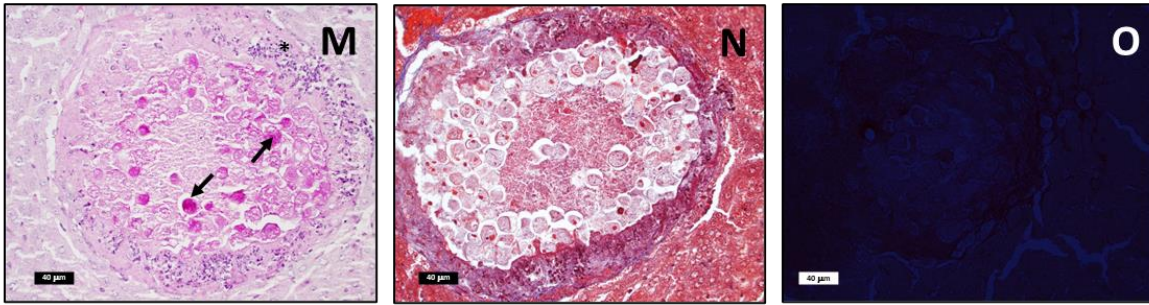
Grupo control



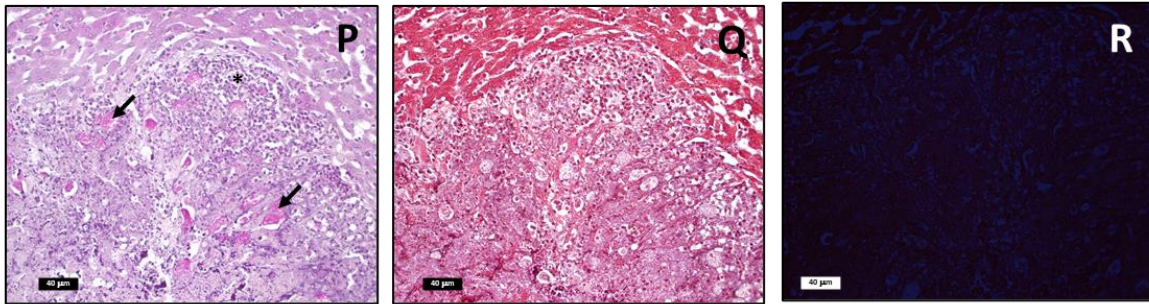
Grupo oxitiamina



Grupo metilprednisolona



Grupo pioglitazona



Grupo doxiciclina

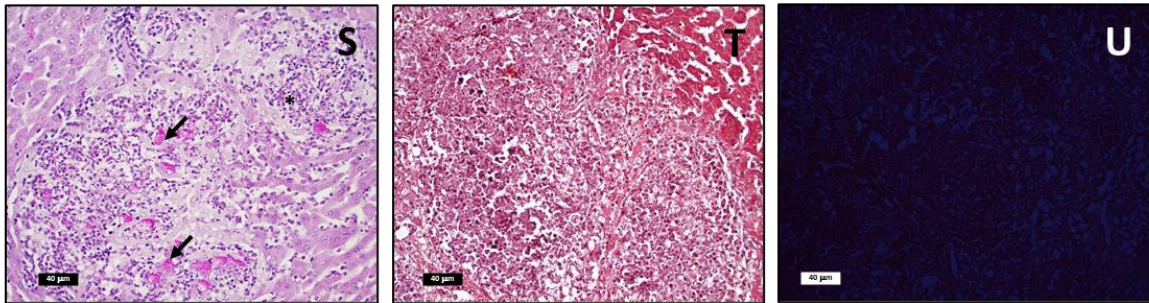


Figura 16. Evaluación microscópica tres días después de la infección hepática amibiana en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina. Se muestran fotomicrografías representativas de las tinciones PAS, TM y RS tomadas a 20X de los grupos: control (A-C), oxitiamina (D-L), metilprednisolona (M-O), pioglitazona (P-R) y doxiciclina (S-U). Se observan amibas bien conservadas (➡); células inflamatorias (*); fibras de colágena (➡); la zona de fibrogénesis (f), la zona necrótica (n) y amibas fragmentadas (#).

Se examinaron los cambios histológicos en todos los grupos después de 7 días de infección y se observó lo siguiente:

- Grupo control: se observan varios trofozoítos bien conservados orientados en la zona periférica (Fig. 17A) rodeados por una gran cantidad de fibras de colágena en color azul y rojo (tinción TM y RS), las fibras se localizan en la

misma zona donde se encuentran las células alargadas (Fig. 17 B, C). Además, la necrosis es extensa asociado a la fusión de los abscesos.

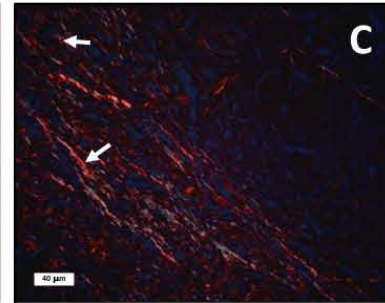
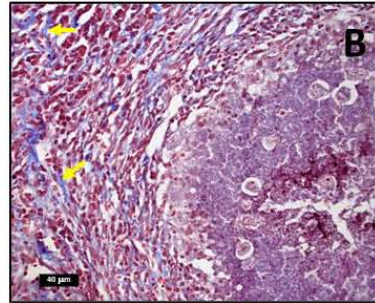
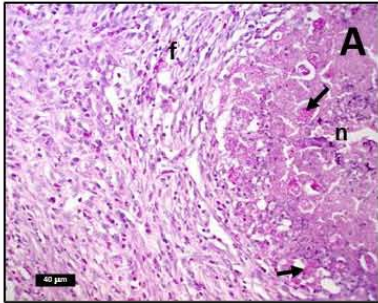
- Grupo oxitiamina: en la figura 17D se observaron algunas lesiones con amibas fragmentadas y vacuoladas, el daño tisular es mínimo. También, en algunas zonas se observan lesiones residuales sin amibas (Fig. 17G). La presencia de la zona de fibrogénesis y necrosis no es evidente en este grupo. Además, existe una escasa presencia de fibras de colágena evidenciado en la tinción TM y RS (Fig. 17 E, F, H, I).
- Grupo metilprednisolona: se observa una gran cantidad de trofozoítos aglomerados en una coloración rosa intensa (Fig. 17J), en contacto directo con los hepatocitos. Además, la presencia de destrucción tisular, células inflamatorias y fibras de colágena es escasa (Fig. 17 J, K, L).
- Grupo pioglitazona: en este grupo se observan pequeñas lesiones residuales (Fig. 17 M), en ausencia de fibras de colágeno (Fig. 17 N, O) Además, en este grupo se observan pequeñas lesiones muy similares al grupo control (Fig. 17A) con presencia de fibras de colágeno en azul y rojo (Fig. 17 P, Q, R), a pesar de ello las lesiones son más pequeñas.
- Grupo doxiciclina: en la figura 17S únicamente se observan lesiones residuales en ausencia de trofozoítos y de fibras de colágeno (Fig. 17 T, U).

Ácido peryódico de Schiff

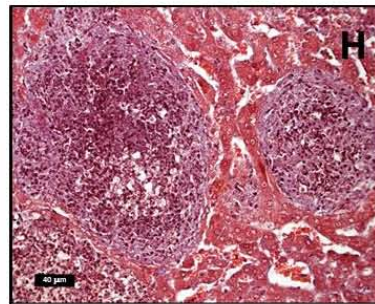
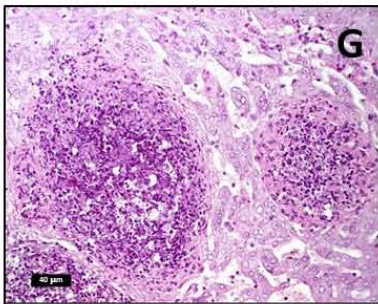
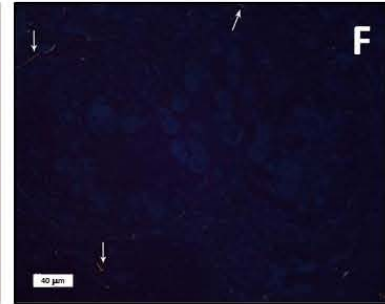
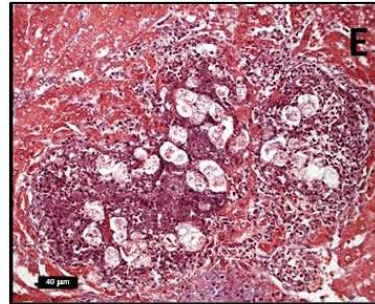
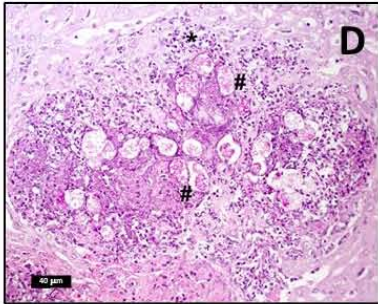
Tricrómica de Masson

Rojo Sirio

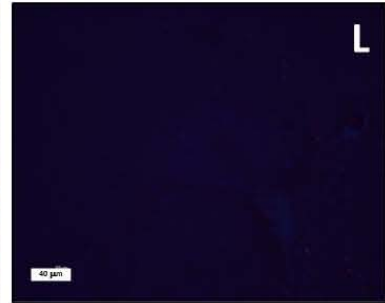
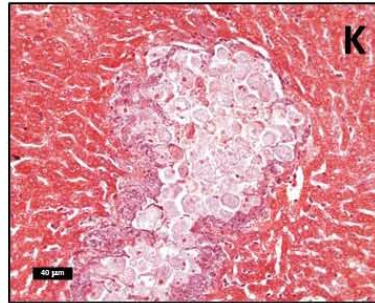
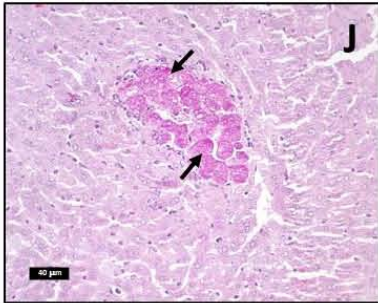
Grupo control



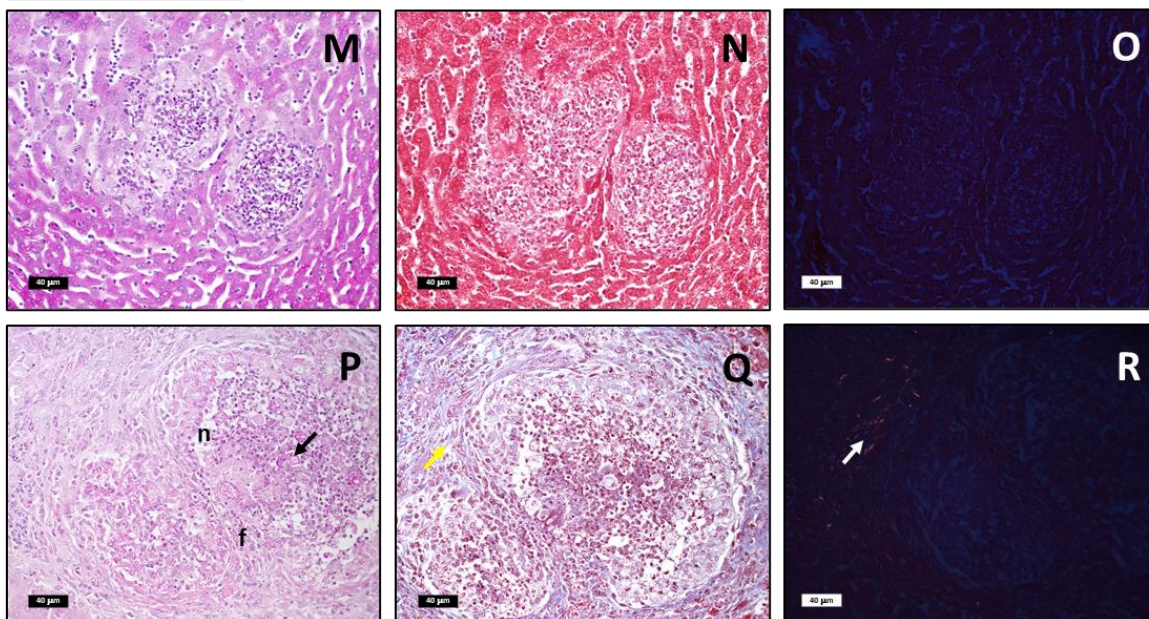
Grupo oxitiamina



Grupo metilprednisolona



Grupo pioglitazona



Grupo doxiciclina

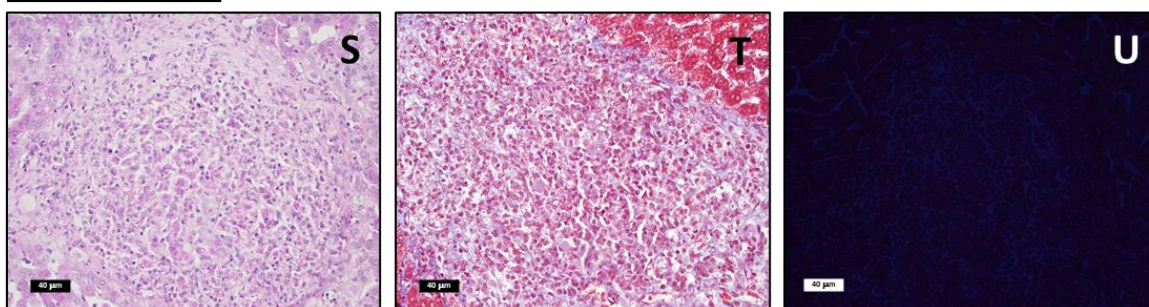


Figura 17. Evaluación microscópica siete días después de la infección hepática amibiana en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina. Se muestran fotomicrografías representativas de las tinciones PAS, TM y RS tomadas a 20X de los grupos: control (A-C), oxitiamina (D-I), metilprednisolona (J-L), pioglitazona (M-R) y doxiciclina (S-U). Se observan amibas bien conservadas (➡); células inflamatorias (*); fibras de colágena (👉); la zona de fibrogénesis (f), la zona necrótica (n) y amibas fragmentadas (#).

Distribución de las células estelares durante el desarrollo del absceso hepático amibiano en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina

Después de realizar el análisis histológico, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con la finalidad de determinar la localización y expresión de la proteína alfa-actina de músculo liso (α -SMA) que se ha determinado como uno

de los marcadores más utilizados para identificar a las CEH activadas (Shang L, 2017; Sufletel RT, 2020).

Se utilizaron hígados de animales sanos como control adicional. En la figura 18, (tejido de animales sanos) no se observó la expresión de α -SMA.

α -SMA

Hígado sano

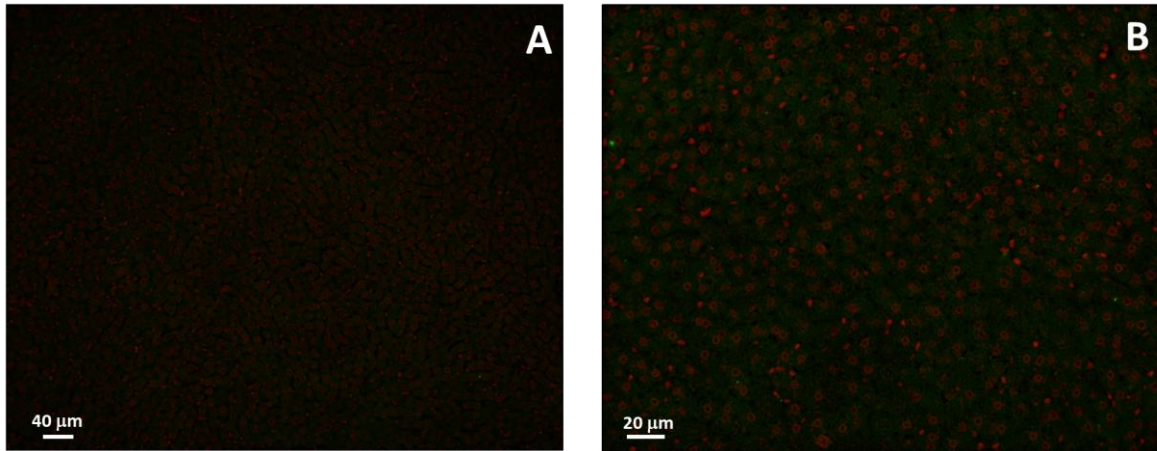


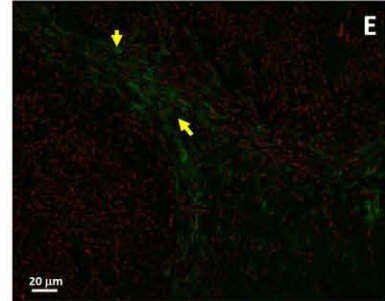
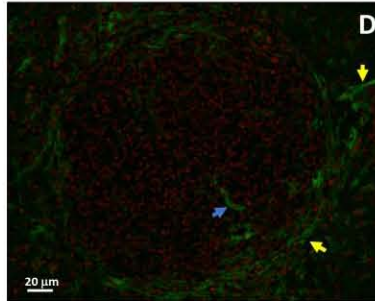
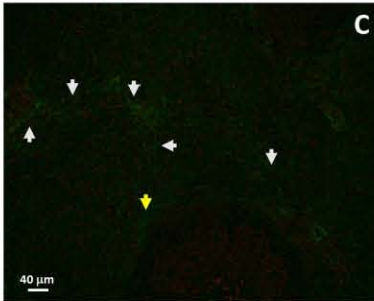
Figura 18. Distribución de α -SMA en el hígado de animales sanos. Se muestran fotomicrografías representativas de las inmunofluorescencias tomadas a 10X y 20X. Los núcleos se observan en color rojo.

Por otra parte, a los 3 días después de la infección hepática amibiana se observó tinción positiva en el grupo control (Fig. 19C-E). La figura 19C muestra en verde fluorescente la marca para α -SMA (flechas blancas) migrando de otras partes del tejido aparentemente sano hacia el borde de la zona de fibrogénesis en donde también se observa positividad (flechas amarillas). Además, existe reacción positiva dentro de la zona necrótica y en la unión de los abscesos (Fig.19 D-E). En el caso de los grupos tratados con los compuestos es muy raro observar marca para α -SMA (Fig. 19 F-Q) a excepción de algunas células que muestran reacción positiva para este marcador (Fig. 19 H, M, Q).

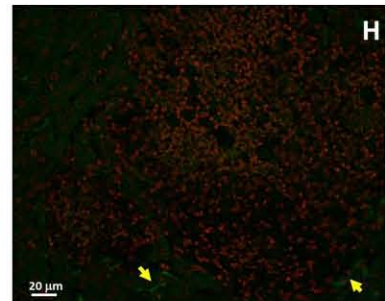
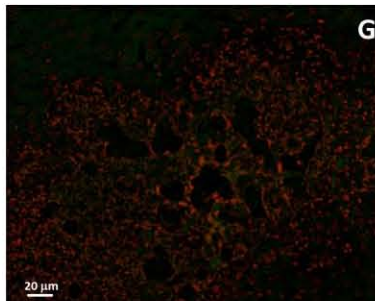
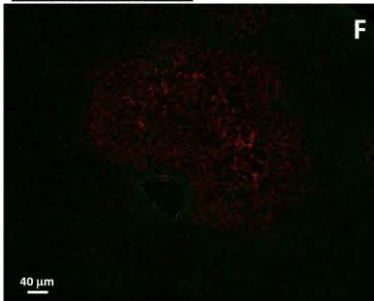
α -SMA

Grupo control

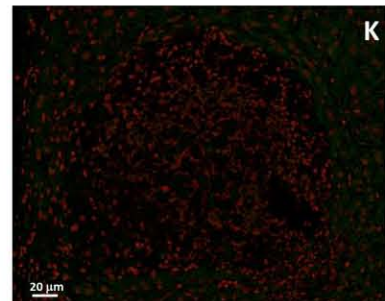
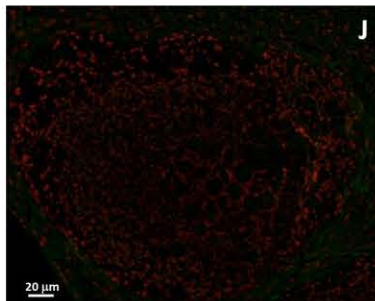
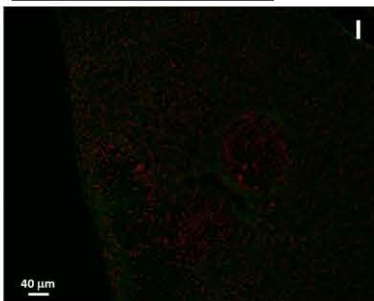
3 días



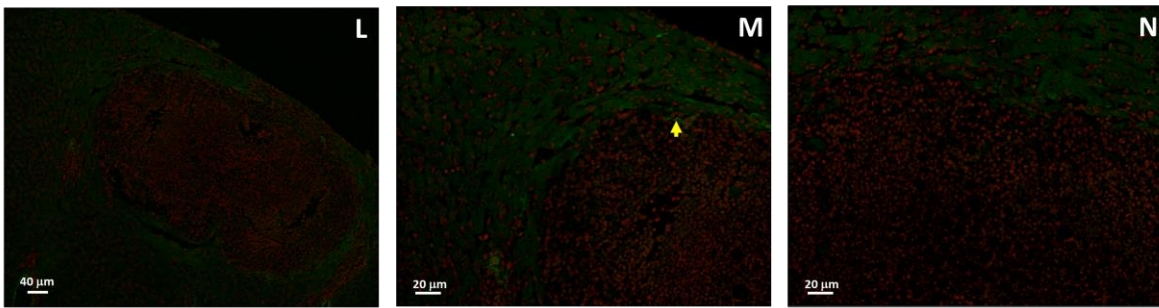
Grupo oxitiamina



Grupo metilprednisolona



Grupo pioglitazona



Grupo doxiciclina

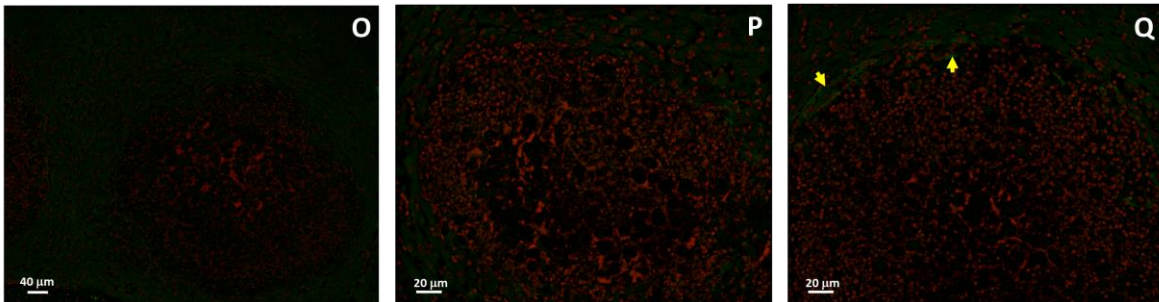




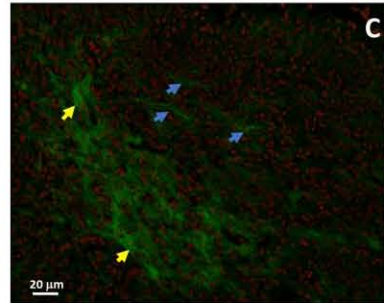
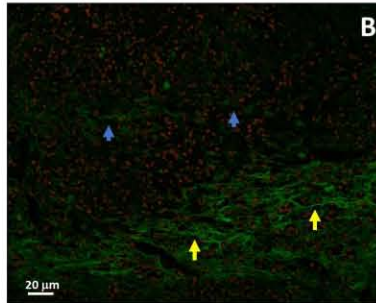
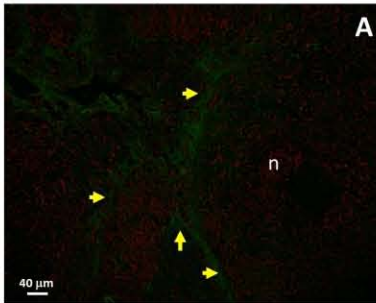
Figura 19. Distribución de α -SMA tres días después de la infección hepática amibiana en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina. Se muestran fotomicrografías representativas tomadas a 10X y 20X de los grupos: control (C-E), oxitiamina (F-H), metilprednisolona (I-K), pioglitazona (L-N) y doxiciclina (O-Q). α -SMA (verde ). Núcleos (rojo) .

A los 7 días de después de la infección hepática amibiana en el grupo sin tratamiento, la expresión de α -SMA se localizó principalmente en la periferia de los abscesos y rodeando todas las lesiones (Fig. 20A). Así mismo, en las figuras 20 B-C se muestra una menor reacción positiva dentro de la zona necrótica (flechas azules). En el caso de oxitiamina y pioglitazona se observó mínima expresión de este marcador rodeando las lesiones (flechas amarillas) (Fig. 20 E, K). Por otro lado, en los grupos metilprednisolona y doxiciclina, no hubo presencia de α -SMA (Fig. 20G-I; 20M-O).

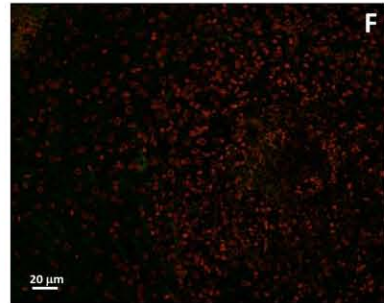
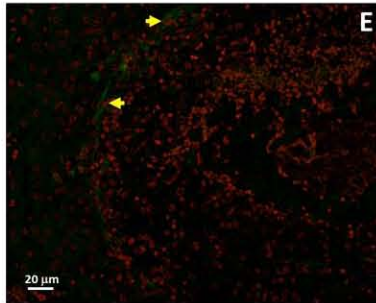
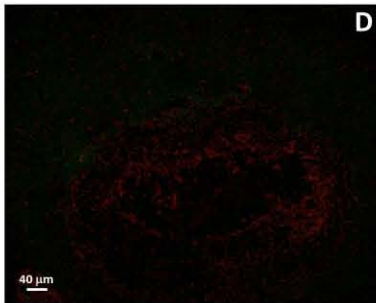
α -SMA

Grupo control

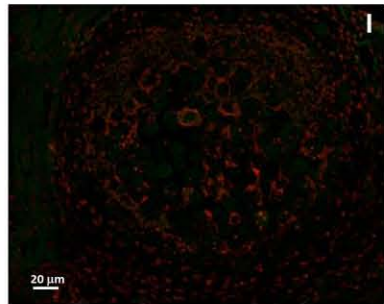
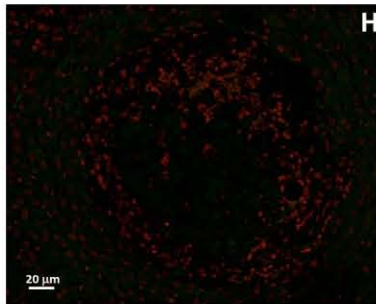
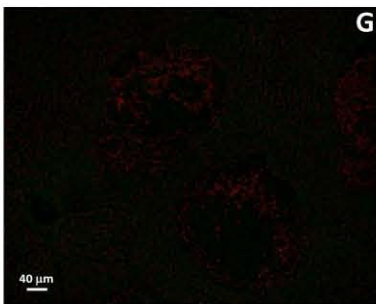
7 días



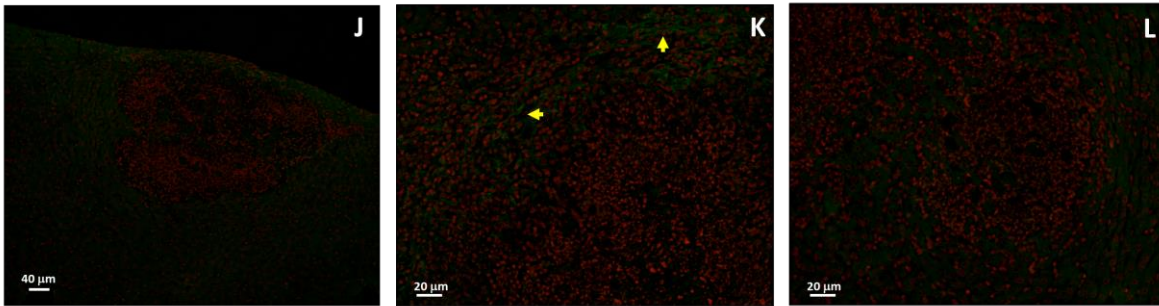
Grupo oxitiamina



Grupo metilprednisolona



Grupo pioglitazona



Grupo doxiciclina

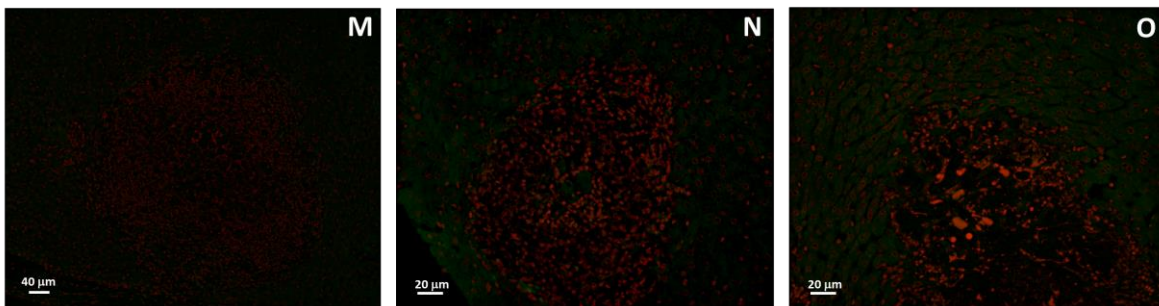



Figura 20. Distribución de α -SMA siete días después de la infección hepática amibiana en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina. Se muestran fotomicrografías representativas tomadas a 10X y 20X de los grupos: control (A-C), oxitiamina (D-F), metilprednisolona (G-I), pioglitazona (J-L) y doxiciclina (M-O). α -SMA (verde ). Núcleos (rojo).

En resumen y de acuerdo con los análisis histológicos en los hígados teñidos con PAS y marcados para α -SMA (Fig. 21A, B), a los 7 días del desarrollo del absceso hepático se observa en la zona de fibrogénesis, células con morfología alargada lo que sugiere fuertemente que son células estelares.

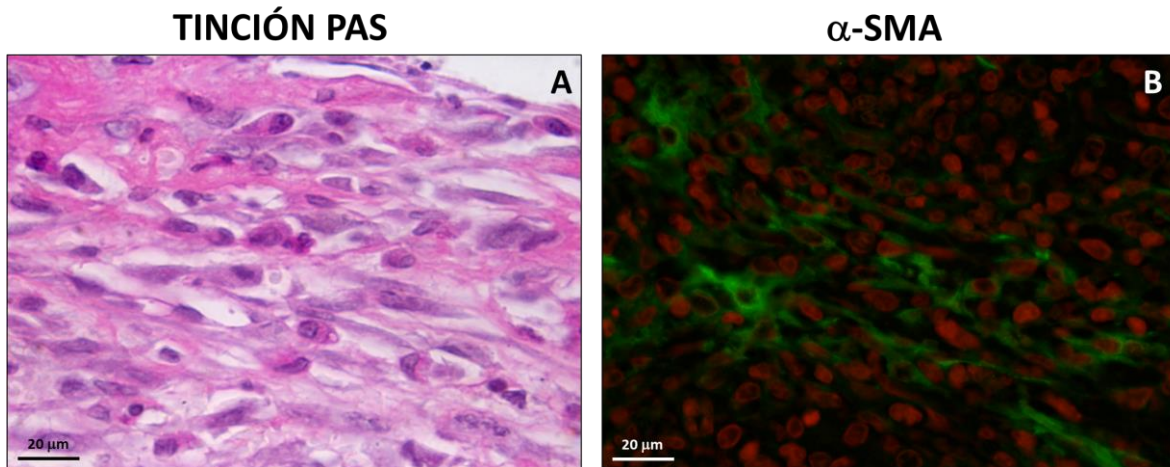


Figura 21. Identificación de células estelares siete días después de la infección hepática amibiana. Se muestran fotomicrografías representativas tomadas a 80X. **A.** Tinción de PAS. **B.** Inmunofluorescencia de α -SMA.

Localización celular y distribución de la metaloproteasa de matriz 9 durante el desarrollo del absceso hepático amibiano en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina

Por otro lado, las metaloproteasas de matriz juegan un papel muy importante en la patogénesis de numerosos trastornos hepáticos, por tanto, pudieran estar involucradas en la destrucción tisular (zona de fibrólisis). Debido a lo anterior, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con la finalidad de determinar la localización y distribución de la metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9) que es una de las primeras MMPs en activarse en problemas hepáticos, además de que degrada la mayoría de las fibras de la MEC.

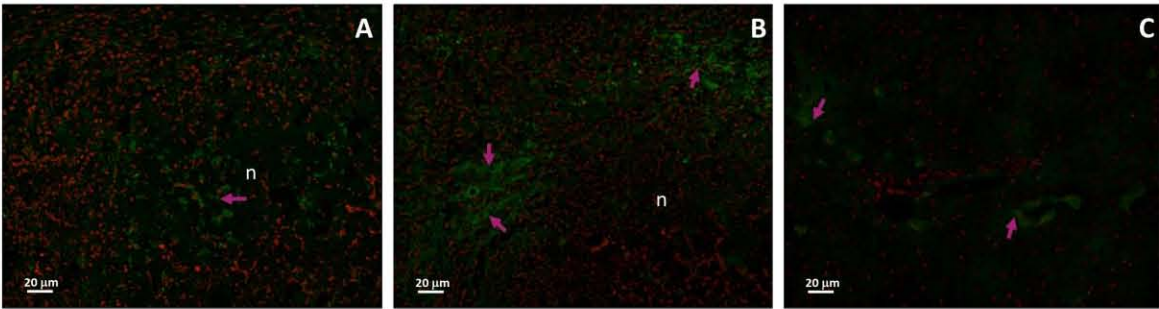
En la figura 22, en los paneles que corresponden al grupo control, se observa reacción positiva en: 1) la zona necrótica (Fig. 22A), 2) en la periferia de la zona de fibrogénesis y 3) en el citoplasma de las células alargadas (Fig. 22B). Además, se observó un efecto interesante, la presencia de células con marca positiva para MMP-9 en forma de estrella en el tejido aparentemente sin daño (Fig. 22C).

En el caso de los grupos tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina no se observó reacción positiva para MMP-9 en este tiempo (Fig. 22D-K).

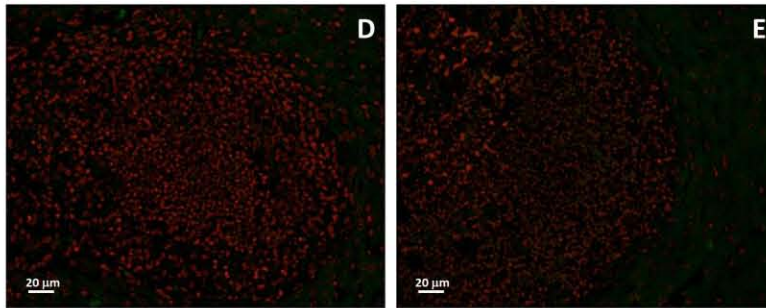
MMP-9

Grupo control

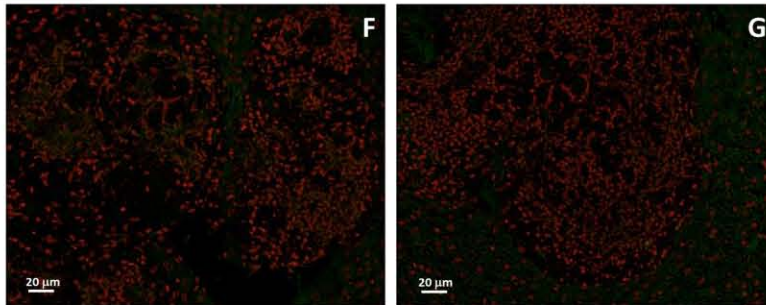
3 días



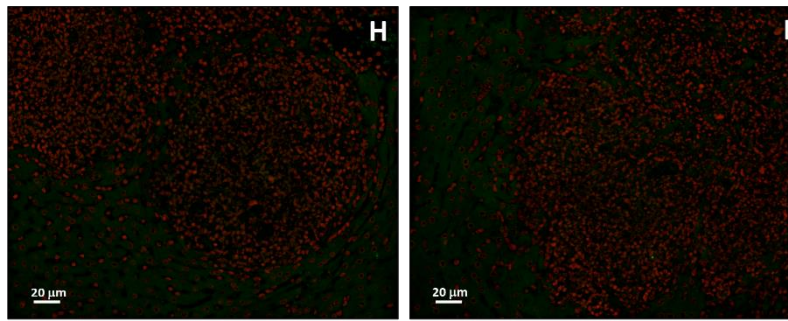
Grupo oxitiamina



Grupo metilprednisolona



Grupo pioglitazona



Grupo doxiciclina

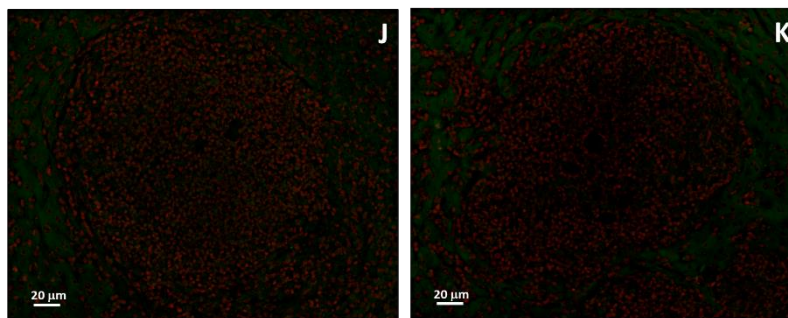



Figura 22. Distribución de MMP-9 tres días después de la infección hepática amibiana en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina. Se muestran fotomicrografías representativas tomadas a 20X de los grupos: control (A-C), oxitiamina (D-E), metilprednisolona (F-G), pioglitazona (H-I) y doxiciclina (J-K). MMP-9 (verde ). Núcleos (rojo).

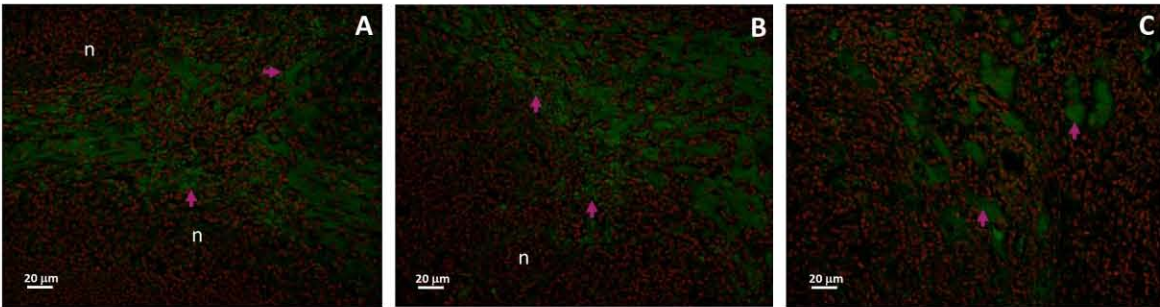
Después de 7 días de infección hepática amibiana, en el grupo control se observó tinción positiva para esta metaloproteasa principalmente en la zona de fibrogénesis y en la unión de los abscesos (Fig. 23A-B), aunque también se observó en algunas zonas de necrosis (Fig. 23B). Adicionalmente, se observa gran positividad en el citoplasma de las células alargadas (Fig. 23C).

En el caso de los animales tratados con oxitiamina, metilprednisolona y doxiciclina no se observa reacción positiva para MMP-9 (Fig. 23). En la figura 23 I que corresponde al grupo pioglitazona la tinción positiva es mínima.

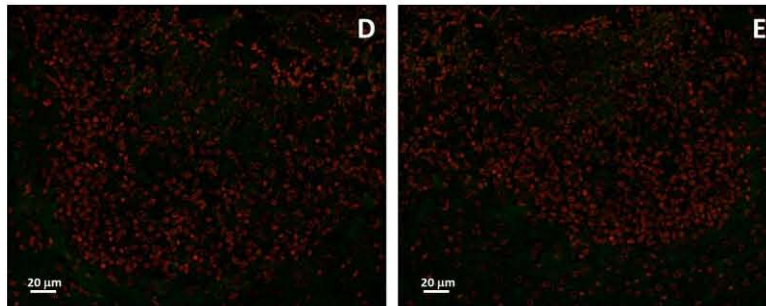
MMP-9

Grupo control

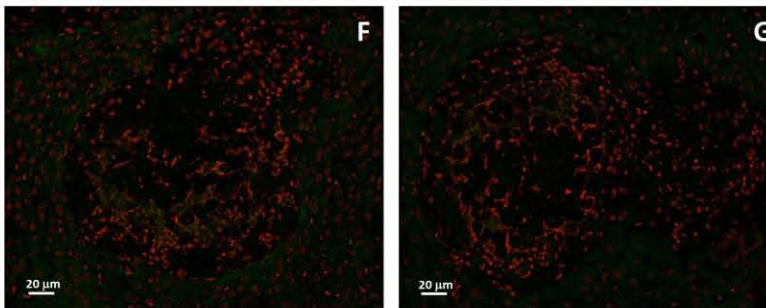
7 días



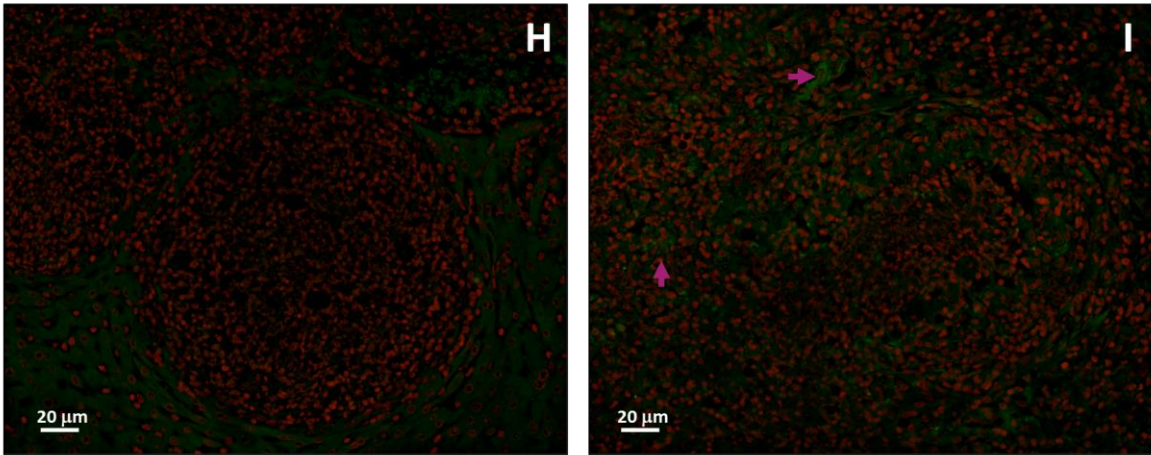
Grupo oxitiamina



Grupo metilprednisolona



Grupo pioglitazona



Grupo doxiciclina

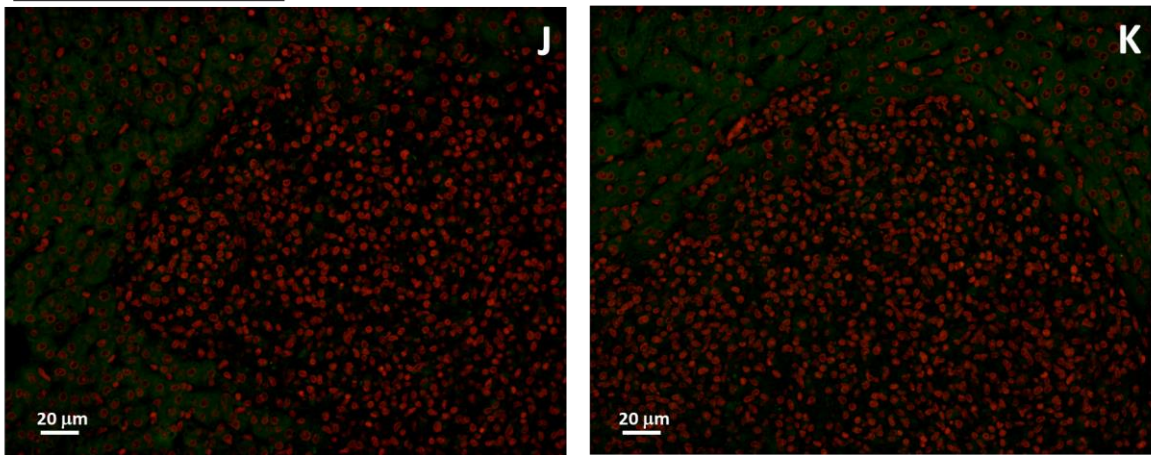



Figura 23. Distribución de MMP-9 siete días después de la infección hepática amibiana en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina. Se muestran fotomicrografías representativas tomadas a 20X de los grupos: control (A-C), oxitiamina (D-E), metilprednisolona (F-G), pioglitazona (H-I) y doxiciclina (J-K). MMP-9 (verde ). Núcleos (rojo).

Finalmente, en la tabla 2 y 3 se presenta un resumen de los cambios más evidentes a los tres y siete días después de la infección hepática amibiana en el grupo control y en los tratados con los inhibidores.

Tabla 2. Resumen de las principales características morfológicas a los tres días después de la infección hepática amibiana en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina.

GRUPO EXPERIMENTAL CONDICIÓN ANALIZADA	3 días				
	CONTROL	OXITIAMINA	METILPREDNISOLONA	PIOGLITAZONA	DOXICICLINA
HEPATOMEGALIA	No evidente	No evidente	No evidente	No evidente	No evidente
AMIBAS BIEN CONSERVADAS	Presentes	Presentes	Presentes/abundantes	Presentes	Presentes
AMIBAS FRAGMENTADAS Y VACUOLADAS	Ausentes	Presentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
INFILTRADO INFLAMATORIO	Abundante	Mínimo	Mínimo	Mínimo	Mínimo
LESIONES RESIDUALES	Ausentes	Presentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
DAÑO TISULAR	Abundante	Escaso	Escaso	Escaso	Escaso
CÉLULAS ALARGADAS	Presentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
FIBRAS TM	Presentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
FIBRAS RS	Presentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
MARCADOR α -SMA	Presente	Leve	No se observa	Leve	Leve
MMP-9	Presente	No se observa	No se observa	No se observa	No se observa

Tabla 3. Resumen de las principales características morfológicas a los siete días después de la infección hepática amibiana en hámsteres tratados con oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina.

GRUPO EXPERIMENTAL CONDICIÓN ANALIZADA	7 días				
	CONTROL	OXITIAMINA	METILPREDNISOLONA	PIOGLITAZONA	DOXICICLINA
HEPATOMEGALIA	Evidente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
AMIBAS BIEN CONSERVADAS	Presentes	Ausentes	Presentes/abundantes	Escasas	Ausentes
AMIBAS FRAGMENTADAS Y VACUOLADAS	Ausentes	Presentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
INFILTRADO INFLAMATORIO	Abundante	Mínimo	Ausente	Escaso/moderado	Escaso
LESIONES RESIDUALES	Ausentes	Presentes	Ausentes	Presentes	Presentes
DAÑO TISULAR	Abundante	Escaso	Ausente	Escaso/moderado	Escaso
CÉLULAS ALARGADAS	Presentes	Ausentes	Ausentes	Escasas	Ausentes
FIBRAS TM	Presentes	Ausentes	Ausentes	Escasas	Ausentes
FIBRAS RS	Presentes	Ausentes	Ausentes	Escasas	Ausentes
MARCADOR α -SMA	Presente	Leve	No se observa	Leve	No se observa
MMP-9	Presente	No se observa	No se observa	Leve	No se observa

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la actualidad, el modelo de amibiasis hepática experimental en hámster se ha empleado para estudiar los mecanismos de patogenicidad y virulencia de *E. histolytica*. Además, debido a la gran similitud con lo que ocurre en los humanos, la identificación de las moléculas o células del hospedero involucradas en la destrucción tisular en dicho modelo puede ayudar a entender los mecanismos moleculares y celulares relacionados a esta patología, lo que a su vez puede generar conocimiento que lleve al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas con efecto anti-amibiano.

Durante mucho tiempo se sostuvo que la patogenicidad de *E. histolytica* se debía primordialmente a su capacidad de destruir tejidos. Sin embargo, los trabajos de Tsutsumi V, Martínez-Palomo y Pérez-Tamayo demostraron que los trofozoítos no causan directamente el daño en el tejido hepático de manera significativa (Tsutsumi V, 1988; Pérez-Tamayo R, 1991). Existe abundante evidencia que indica que la inflamación del hospedero es probablemente la principal causa del daño característico. Diversos grupos de investigación han propuesto un gran repertorio de células y moléculas de la respuesta inmune como las responsables, entre ellas el NO \cdot , ONOO \cdot (peroxinitrito), intermediarios del estallido oxidante (H $_2$ O $_2$, O $_2^{\cdot-}$) y sustancias liberadas por neutrófilos y macrófagos (defensinas y proteasas) (Pacheco-Yépez J, 2011; Campos-Rodríguez R, 2016). Sin embargo, en etapas tardías del AHAEH estas células se encuentran ausentes o disminuidas y las moléculas propuestas se encuentran inhibidas.

En este trabajo se realizó la inyección intraportal de los trofozoítos en todos los animales. Debido a que el punto crítico para el éxito de la infección se alcanza después de las 12 h (Rigothier MC, 2002); el análisis histológico a las 24 h de infección (Fig. 15) reveló la colonización amibiana en todos los grupos experimentales, observándose trofozoítos íntegros.

La tinción de PAS a los 3 y 7 días del grupo control (Fig.16A, 17A) mostró la histología descriptiva del desarrollo de la infección, que es muy similar a lo reportado. Las etapas tardías implican la formación del granuloma y extensas áreas de necrosis producidas por la fusión de 2 o más focos (Tsutsumi V, 1984). Además, desde las primeras descripciones morfológicas del AHAEH se ha determinado la presencia de fibras de colágeno rodeando las lesiones seguido de una zona de fibrinólisis (Guerrero M, 1981, Guerrero M, 1982); aunque aún se desconoce la etiopatogenia de la formación de los granulomas. Algunos autores han descrito a las células alargadas como las probables responsables de la zona de fibrogénesis, nombradas células epitelioides (Shibayama-Salas M, 1992) e histiocitos (Guerrero 1981; Tsutsumi V, 1984), sin embargo, estas células no producen fibras de colágeno. Por otra parte, Jiménez Cardoso y colaboradores observaron fibroblastos en la zona periférica del granuloma (Jiménez-Cardoso, 1985), estas células pudieran ser fibroblastos portales o bien células estrelladas hepáticas activadas (CEHa).

La evidencia implica a los fibroblastos portales como una fuente de miofibroblastos para colangiocitos, es decir, cuando la lesión es en los conductos biliares en lugar de los hepatocitos (Dranoff JA, 2010; Karin D, 2016). Además, se ha informado que las CEH son la principal fuente de miofibroblastos fibrogénicos de un 80 a 96% (Mederacke I, 2013; Kisseleva T, 2011). Por lo tanto, el presente estudio se centró en el estudio de las CEHa.

Para poder determinar la zona de fibrogénesis se utilizó la tinción TM y RS, ambas tinciones evidencian la presencia de fibras de colágeno, sin embargo, la tinción RS evidencia selectivamente los tipos de colágeno. En las figuras 16C, 17C se observó principalmente colágeno tipo I (birrefringencia roja) en la zona de fibrogénesis, que concuerda con lo reportado, las CEH principalmente sintetizan este tipo de colágeno en un 80% (Seki E, 2007; Li D, 2015). Además, en parte podría explicar la dureza del hígado al diseccionarlo (Colágeno I: rígido).

Para conocer si estas células alargadas corresponden a las CEHa se utilizó un marcador confiable, α -SMA. Esta proteína citoesquelética está ausente en otras células hepáticas residentes, excepto en las células del músculo liso vascular (Levy MT, 1999, Tacke F, 2012), sin embargo, la morfología observada en la zona de fibrogénesis no corresponde a estas células. En las figuras 19 y 20 se identificó inmunotinción positiva de α -SMA a partir de los 3 días de infección haciéndose más evidente a los 7 días. La activación de las CEH es altamente dinámica, en respuesta a diversas citocinas y factores de crecimiento. En el desarrollo del AHAEH las moléculas que pudieran estar implicadas en la activación son las siguientes:

- Factor inducible por hipoxia (HIF-1): una vez que ingresan los trofozoítos al hígado generan oclusión de los vasos sanguíneos, por lo tanto, la isquemia está presente desde las primeras etapas de infección (24h) (Pérez-Tamayo R, 1992; Olivos-García A, 2004), al igual que la hipoxia, la concentración de oxígeno en este tiempo disminuye de un 14% a menos de 5% (Nauck M, 1981; Band RN, 1979). Diversos estudios han demostrado que la hipoxia está asociada con la fibrogénesis, al inducir la producción del HIF-1 (Juliane S, 2011; Zhan L, 2015) que no sólo activa a las CEH sino también promueve su migración y la síntesis de colágeno (Ankoma-Sey, 2000; Yibing Hu, 2018).
- TGF- β : Esta citocina se ha asociado al desarrollo del absceso hepático, ya que sus niveles de expresión están incrementados desde las 12 h de infección y a partir de los 2 días se observó un aumento en el tejido fibroso del absceso (Sánchez-Alemán, 2014; Bansal D, 2005). Además, se ha demostrado que el parásito produce el factor inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM) aumenta la expresión de TGF- β (Bermeo G, 2013; Rojas-Dotor S, 2009). Cuando esta molécula se encuentra expresada se convierte en el activador más potente para las CEH (Arias M, 2002). Además, es el principal mediador clave en la fibrogénesis al estimular la expresión génica de colágeno I y III (Gressner AM, 2002; Shek FW, 2004).

- Etanol: Otra de las probables moléculas involucradas en la activación de las CEH es el etanol, que producen los trofozoítos como principal producto final del metabolismo de glucosa (McLaughlin J, 1985; Saavedra E, 2019). El metabolismo oxidativo del etanol influye en las vías de señalización intracelular y trastorna el control transcripcional de varios genes, incluidos los de las CEH lo que conduce a la fibrogénesis y activación de la inmunidad innata y adaptativa (Ceni E, 2014, Arab JP, 2020).

Adicionalmente, las CEHa pueden ser responsables de la destrucción tisular (zona de fibrinólisis) al sintetizar MMPs, por tal motivo, en este trabajo se identificó la expresión de MMP-9 en el desarrollo del AHAEH por ser una de las MMPs principalmente secretadas por las células estelares (Chunli Yan, 2008) y además por estar involucrada en el proceso de remodelación de la fibrogénesis al degradar la mayoría de los diferentes tipos de colágeno (Li Y, 1999; Benyon RC, 2001).

En las figuras 22 y 23, se observa la expresión de MMP-9 no solo en la zona necrótica sino también en la misma zona donde se encuentran las células estelares. Esta información se correlaciona con lo observado en el AHA en humanos donde existe un mayor nivel de MMP-9 en el líquido del absceso y se asocia a la recurrencia (Singh A, 2021). Además, las MMPs se encuentran dentro de los 5 genes más sobreexpresados en amibiasis intestinal (Peterson KM, 2011).

La producción de MMP-9 está regulada por la propia matriz a través de vías unidas a integrinas (Seltzer JL, 1994) por lo tanto a los 3 días de infección (Fig. 22A-C) cuando existe un incremento en las fibras de colágeno comienza su síntesis y la observamos rodeando la zona de fibrogénesis. Enseguida, la activación ocurre en el espacio extracelular por proteasas, otras MMPs o por algunos oxidantes (HClO, ONOO⁻) (Mondal S, 2020). Se ha atribuido la activación a las cisteín proteinasas (CP) de *E. histolytica*, Thibeaux y colaboradores identificaron en explantes de intestino humano que CP-A5 activa a Pro-MMPs en la enzima catalítica (Thibeaux R, 2014). Está activación y generación de la zona

de fibrinólisis podría explicar en parte la rápida diseminación del parásito a lugares adyacentes (periferia de la zona necrótica) y la fusión de los granulomas.

Es importante mencionar que la síntesis de fibras estimula a las CEHa para la producción de MMPs y las cantidades aumentadas de MMPs activadas actúan como una retroalimentación positiva para promover una mayor proliferación de las células estelares activadas (Benyon RC, 2001; Roeb E, 2018). En el caso específico de MMP-9 puede activar a TGF- β latente, estimulando así la síntesis de colágeno tipo I por las CEHa (Ashraf TS, 2019). Pero también la regulación de MMPs es mediado por las citocinas TNF- α y TGF- β . En el AHAEH la producción de TNF- α por parte de los macrófagos se observa desde las 6 h de infección. Sin embargo, la mayor expresión ocurre después de las 48 h (Acevedo JA, 2000; Blazquez S, 2007) participando en la activación y regulación de la expresión de MMP-9 (Tarrats N, 2011). Además, ambas citocinas podrían ser las responsables de gran atracción leucocitaria.

Enseguida para determinar si las CEH y/o MMPs estaban involucradas en la formación de la zona de fibrogenesis y en la destrucción tisular se utilizaron los fármacos oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina. En el caso de oxitiamina (Fig.16 y 17) no se formó la zona de fibrogenesis, no se observan las fibras de colágeno, pero además la necrosis fue casi nula, aunado a la falta de expresión de α -SMA y MMP-9 (Fig.19, 20, 22, 23). Una de las propuestas por la cual oxitiamina inhibe la activación de las CEH es por la sobreexpresión de los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPS), inhibiendo no solo la expresión de las MMPs (Birukawa NK, 2014), sino también retrasan la migración e inhiben la proliferación e inducen apoptosis a estas células. Chih-Min Yang y colaboradores observaron la inhibición de la expresión de MMP-2 y MMP-9 al utilizar oxitiamina a la misma concentración utilizada en este estudio (Yang C, 2010). Además, la ausencia de fibras puede deberse a que oxitiamina es un inhibidor de transcetolasa enzima involucrada en la vía de las pentosas fosfato, por lo tanto, podría alterar la vía y privar a las células estelares de intermediarios metabólicos y

de los sustratos que son necesarios para su función de síntesis de colágeno (Matsubara S, 2002; Mariadasse R, 2016).

Con respecto al grupo metilprednisolona, la inhibición de ambos procesos (fibrogénesis y fibrólisis) fue más evidente (Fig.16M-O, 17J-L), aunado a la falta de inmunotinción de α -SMA y MMP-9 (Fig. 19, 20, 22, 23), por lo que previno los cambios morfológicos de las CEH. Existen diversos informes que han demostrado que la terapia con prednisolona conduce a la mejora o resolución de la fibrosis hepática (Mathurin P, 1996; Czaja AJ, 2004). Los posibles mecanismos de acción por los cuales este fármaco inhibe la síntesis y degradación de fibras por las CEH es el siguiente: 1) metilprednisolona inhibe a TGF- β (principal molécula fibrogénica) por lo tanto no se activan las células y no producen fibras (Mohamadnejad M, 2005; Czaja AJ, 2012); 2) TGF- β regula positivamente la expresión de MMPs por ende no existe el proceso de fibrinólisis (Benyon RC, 2001); 3) metilprednisolona aumenta la apoptosis de las células inmunes y de las CEHa al inhibir la vía mediada por NF- κ B que agota las proteínas coactivadoras nucleares necesarias para la prevención de la apoptosis (Czaja AJ, 2012). 4) Inhibe la producción de citocinas importantes en la proliferación de linfocitos (Zhang CY, 2016) que explica la ausencia de células inflamatorias.

Algo interesante se observa en este grupo, la gran proliferación amibiana en aglomerados (Fig. 16M, 17J) en ausencia de destrucción y células inflamatorias, por lo que probablemente la destrucción es necesaria para la movilidad e invasión del parásito. Por otra parte, aunque no es el objetivo de este trabajo, la gran cantidad de trofozoítos puede deberse a una mayor actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP) (Ayyar VS, 2017) que se observa al utilizar metilprednisolona, y como se sabe la proliferación de los trofozoítos se ve favorecida por la reprogramación metabólica de las células hepáticas por un aumento en la actividad de la PPP (Guerrero M, 1981; Olivos-García, 2020).

Por otro lado, el grupo tratado con pioglitazona, a los 3 y 7 días se observó una disminución en la expresión de α -SMA y MMP-9 (Fig.19,20,22,23) y además no se observan gran cantidad de fibras de colágeno (Fig. 16 y 17). Estos resultados sugieren que se previno la fibrogénesis, así como en otros modelos experimentales de fibrosis (Jain M, 2018), esto puede deberse a que pioglitazona es un agonista de PPAR γ que regula a la baja la activación de las células estelares al inhibir la señalización de TGF- β (Ciaramella V, 2019). Además, en este grupo se observa poca afluencia leucocitaria, que puede deberse a que pioglitazona tiene actividad antiinflamatoria (Ibrahim SA, 2021).

Algunos estudios han demostrado que doxiciclina parece preferencialmente inhibir la actividad y expresión de MMP-9 (Sobrin L, 2000; Xin Xu, 2017), aunque de manera general es considerado un inhibidor de MMPs de amplio espectro (Nicoud IB, 2007; Alaseem A, 2019). Adicionalmente este fármaco incrementa los niveles de TIMP-1 endógeno, inhibiendo la función de las MMPs (Xin Xu, 2017); además, regula también a la baja la expresión de TGF- β (Ueberham E, 2003). Por lo tanto, en el análisis histológico del desarrollo del AHAEH no se observa la presencia de las células estelares y de fibras, y la expresión de α -SMA y MMP-9 se encuentra disminuida. Un hecho importante, al utilizar doxiciclina es que a los 7 días no se observan trofozoítos únicamente se encuentran lesiones residuales, por lo que podría funcionar como una alternativa terapéutica.

Finalmente, otro de los efectos observados es la disminución de las células inflamatorias en el tejido de los animales que recibieron los tratamientos, esto puede deberse a la ausencia de las CEHa y por tanto no se secretan citocinas proinflamatorias (TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-1 β) que se comportan como quimioatrayentes en el reclutamiento de las células inflamatorias (Pan LX, 2019; Kisseleva T, 2021).

A pesar de que las células estrelladas hepáticas han sido estudiadas, descritas y caracterizadas ampliamente en diversas enfermedades hepáticas, con respecto al

AHA poco o ningún trabajo adicional se había descrito hasta este estudio. Por lo tanto, es necesario comprender y estudiar los mecanismos moleculares de daño involucrados en esta infección con la esperanza de encontrar dianas terapéuticas que contribuyan a su resolución.

CONCLUSIONES

Los resultados de los cortes histológicos y de las inmunofluorescencias del grupo control demostraron que muy probablemente las células estelares activadas son las responsables de la zona de fibrogénesis y que además contribuyen en la destrucción tisular al sintetizar MMPs.

El fármaco oxitiamina inhibe la fibrogénesis y fibrólisis, además la sobrevida del parásito se reduce a 3 días.

El uso de metilprednisolona reduce la cantidad de células inflamatorias y la síntesis de fibras. A pesar de la gran cantidad de trofozoítos no se observa destrucción tisular, evidenciando claramente que los parásitos no son responsables del daño característico.

El compuesto pioglitazona reduce la formación de fibras y el daño tisular es moderado.

Los resultados observados tanto histológicamente y mediante las inmunofluorescencias demostraron que el fármaco doxiciclina inhibe la formación de fibras y la activación de MMP-9.

De manera general, el uso de los inhibidores de CEH y MMPs (oxitiamina, metilprednisolona, pioglitazona y doxiciclina), inhiben la síntesis de fibras de colágeno y disminuyen la destrucción tisular en el tejido hepático.

Finalmente, la inhibición de las CEH es fundamental para la resolución de la destrucción tisular.

PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO

A partir del estudio y discusión presentados, los trabajos futuros para corroborar la presencia de las células estelares es utilizar algunos otros marcadores como GFAP (proteína ácida fibrilar glial) y sinemina, debido a que se expresan únicamente en las CEHa y no en los fibroblastos portales.

Otro punto importante es determinar si otras MMPs (MMP-2, MMP-13) están involucradas en el daño hepático durante el desarrollo del AHAEH, mediante inmunofluorescencia o Western Blot.

Finalmente, sería interesante utilizar algunos otros fármacos específicos para inhibir a las células estelares y MMPs, que podrían funcionar como alternativas terapéuticas para combatir a la amibiasis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acevedo JA, Pacheco-Yépez J, Serrano-Luna J, Espinosa-Cantellano M, Tsutsumi V, Shibayama M (2000) Experimental amebic liver abscess: in vivo localization of TNF- α . Arch Med Res.
2. Adil M, Iqbal W, Adnan F, Wazir S, Khan I, Khayam MU, Kamal MA, Ahmad S, Ahmed J, Khan IN (2018) Association of Metronidazole with Cancer: A Potential Risk Factor or Inconsistent Deductions? Curr Drug Metab.
3. Alaseem A, Alhazzani K, Dondapati P, Alobid S, Bishayee A, Rathinavelu A (2019) Matrix Metalloproteinases: A challenging paradigm of cancer management. Semin Cancer Biol.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008) Specialized tissues, stem cells, and tissue renewal. Molecular Biology of the Cell 5th ed. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group, pp. 1442–1444.
5. Alpini G, McGill JM, Larusso NF (2002) The pathobiology of biliary epithelia. Hepatology.
6. Ankoma-Sey V, Wang Y, Dai Z (2000) Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. Hepatology.
7. Ankri S, Padilla-Vaca F, Stolarsky T, Koole L, Katz U, Mirelman D (1999) Antisense inhibition of expression of the light subunit (35 kDa) of the Gal/GalNac lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. Mol Microbiol.
8. Ankri S, Stolarsky T, Bracha R, Padilla-Vaca F, Mirelman D (1999) Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. Infect Immun.
9. Arab JP, Cabrera D, Sehwat TS, Jalan-Sakrikar N, Verma VK, Simonetto D, Cao S, Yaqoob U, Leon J, Freire M, Vargas JI, De Assuncao TM, Kwon JH, Guo Y, Kostallari E, Cai Q, Kisseleva T, Oh Y, Arrese M, Huebert RC, Shah VH (2020) Hepatic stellate cell activation promotes alcohol-induced steatohepatitis through Igfbp3 and SerpinA12. J Hepatol.
10. Arias M, Lahme B, Van de Leur E, Gressner AM, Weiskirchen R (2002) Adenoviral delivery of an antisense RNA complementary to the 3' coding sequence of transforming growth factor- β 1 inhibits fibrogenic activities of hepatic stellate cells. Cell Growth Differ.
11. Arthur MJ, Stanley A, Iredale JP, Rafferty JA, Hembry RM, Friedman SL (1992) Secretion of 72 kDa type IV collagenase/gelatinase by cultured human lipocytes. Analysis of gene expression, protein synthesis and proteinase activity. Biochem J.
12. Ashraf TS, Obaid A, Saeed TM, Naz A, Shahid F, Ahmad J, Ali A (2019) Formal model of the interplay between TGF β 1 and MMP-9 and their dynamics in hepatocellular carcinoma. Math Biosci Eng.
13. Ayyar VS, Almon RR, DuBois DC, Sukumaran S, Qu J, Jusko WJ (2017) Functional Proteomic Analysis of Corticosteroid Pharmacodynamics in Rat Liver: Relationship to Hepatic Stress, Signaling, Energy Regulation, and Drug Metabolism. J Proteomics.
14. Babuta M, Bhattacharya S, Bhattacharya A (2020) *Entamoeba histolytica* and pathogenesis: A calcium connection. PLoS Pathog.

15. Bancroft JD, Gamble M. Theory and practice of histological techniques. 5^a ed. China: Churchill Livingstone: 2002.
16. Band RN, Cirrito H (1979) Growth response of axenic *Entamoeba histolytica* to hydrogen, carbon dioxide, and oxygen. J Protozool.
17. Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Mahajan RC, Malla N (2004). In vitro activity of antiamebic drugs against clinical isolates of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Ann Clin Microbiol Antimicrob.
18. Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Malla N, Mahajan RC (2005) Cytokine mRNA expressions in symptomatic vs. asymptomatic amoebiasis patients. Parasite Immunol.
19. Becerril MA. Parasitología médica. 3a ed. España: McGraw-Hill Interamericana; 2011.
20. Ben-Moshe S, Shapira Y, Moor AE, Manco R, Veg T, Bahar Halpern K, Itzkovitz S (2019) Spatial sorting enables comprehensive characterization of liver zonation. Nat Metab.
21. Benyon RC, Arthur MJ (2001) Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. Semin Liver Dis.
22. Bermeo G, Ibarra A, García E, Flores-Romero A, Rico-Rosillo G, Marroquín R, Mestre H, Flores C, Blanco-Favela F, Silva-García R (2013) Monocyte Locomotion Inhibitory Factor Produced by *E. histolytica* Improves Motor Recovery and Develops Neuroprotection after Traumatic Injury to the Spinal Cord. Biomed Res Int.
23. Berninghausen O, Leippe M (1997). Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. Infect Immun.
24. Birukawa NK, Murase K, Sato Y, Kosaka A, Yoneda A, Nishita H, Fujita R, Nishimura M, Ninomiya T, Kajiwara K, Miyazaki M, Nakashima Y, Ota S, Murakami Y, Tanaka Y, Minomi K, Tamura Y, Niitsu Y (2014) Activated hepatic stellate cells are dependent on self-collagen, cleaved by membrane type 1 matrix metalloproteinase for their growth. J Biol Chem.
25. Blazquez S, Rigotherier MC, Huerre M, 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. Int J Parasitol.
26. Bogitsh BJ, Carter CE, Oeltmann TN. Human Parasitology. 5a ed. United States: Academic Press; 2018.
27. Bonnans C, Chou J, Werb Z (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease. Nat Rev Mol Cell Biol.
28. Borges LF, Gutierrez PS, Marana HR, Taboga SR (2007) Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. Micron.
29. Borkham-Kamphorst E, van Roeyen CR, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R (2007) Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. J Hepatol.
30. Bracha R, Nuchamowitz Y, Leippe M, Mirelman D (1999) Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. Mol Microbiol.
31. Braet F, Wisse E (2002) Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. Comp Hepatol.

32. Brandt H, Tamayo RP (1970) Pathology of human amebiasis. *Hum Pathol*.
33. Bruchhaus I, Loftus BJ, Hall N, Tannich E (2003) The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot Cell*.
34. Burchard GD, Mirelman D (1988) *Entamoeba histolytica*: virulence potential and sensitivity to metronidazole and emetine of four isolates possessing nonpathogenic zymodemes. *Exp Parasitol*.
35. Campos-Rodríguez R, Gutiérrez-Meza M, Jarillo-Luna RA, Drago-Serrano ME, Abarca-Rojano E, Ventura-Juárez J, Cárdenas-Jaramillo LM, Pacheco-Yépez J (2016) A review of the proposed role of neutrophils in rodent amebic liver abscess models. *Parasite*.
36. Ceni E, Mello T, Galli A (2014) Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World J Gastroenterol*.
37. Chadee K, Meerovitch E (1984) The pathogenesis of experimentally induced amebic liver abscess in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Am J Pathol*.
38. Choudhuri G, Rangan M (2012) Amebic infection in humans. *Indian J Gastroenterol*.
39. Ciaramella V, Sasso FC, Di Liello R, Corte CMD, Barra G, Viscardi G, Esposito G, Sparano F, Troiani T, Martinelli E, Orditura M, De Vita F, Ciardiello F, Morgillo F (2019) Activity and molecular targets of pioglitazone via blockade of proliferation, invasiveness and bioenergetics in human NSCLC. *J Exp Clin Cancer Res*.
40. Clark CG, Alsmark UC, Tazreiter M, Saito-Nakano Y, Ali V, Marion S, Weber C, Mukherjee C, Bruchhaus I, Tannich E, Leippe M, Sicheritz-Ponten T, Foster PG, Samuelson J, Noël CJ, Hirt RP, Embley TM, Gilchrist CA, Mann BJ, Singh U, Ackers JP, Bhattacharya S, Bhattacharya A, Lohia A, Guillén N, Duchêne M, Nozaki T, Hall N (2007) Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Adv Parasitol*.
41. Cortes A, Nequiz M, Sandoval J, Mendoza E, Gudiño M, López-Velázquez G, Enríquez-Flores S, Saavedra E, Pérez-Tamayo R, Olivós-García A (2019) Mechanisms of natural resistance of Balb/c mice to experimental liver amoebiasis. *Biosci Rep*.
42. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*.
43. Cui N, Hu M, Khalil RA (2017) Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*.
44. Czaja AJ (2012) Drug choices in autoimmune hepatitis: part A—Steroids. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*.
45. Czaja AJ, Carpenter HA (2004) Decreased fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis. *J Hepatol*.
46. De Minicis S, Candelaresi C, Agostinelli L, Taffetani S, Saccomanno S, Rychlicki C, Trozzi L, Marziani M, Benedetti A, Svegliati-Baroni G (2012) Endoplasmic Reticulum stress induces hepatic stellate cell apoptosis and contributes to fibrosis resolution. *Liver Int*.
47. Debnath A, Parsonage D, Andrade RM, He C, Cobo ER, Hirata K, Chen S, García-Rivera G, Orozco E, Martínez MB, Gunatilleke SS, Barrios AM, Arkin MR, Poole LB, McKerrow JH, Reed

- SL (2012) A high-throughput drug screen for *Entamoeba histolytica* identifies a new lead and target. *Nat Med*.
48. Debnath A, Rodriguez MA, Ankri S (2019) Editorial: Recent Progresses in Amebiasis. *Front Cell Infect Microbiol*.
 49. Denis M, Chadee K (1988) In vitro and in vivo studies of macrophage functions in amebiasis. *Infect Immun*.
 50. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE (2013) Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol*.
 51. Dranoff JA, Wells RG (2010) Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology*.
 52. Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ (2015) Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol*.
 53. Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*.
 54. Ehrenkauf GM, Hackney JA, Singh U (2009) A developmentally regulated Myb domain protein regulates expression of a subset of stage-specific genes in *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol*.
 55. Ehrenkauf GM, Haque R, Hackney JA, Eichinger DJ, Singh U (2007) Identification of developmentally regulated genes in *Entamoeba histolytica*: insights into mechanisms of stage conversion in a protozoan parasite. *Cell Microbiol*.
 56. Elvevold K, Smedsrød B, Martinez I (2008) The liver sinusoidal endothelial cell: a cell type of controversial and confusing identity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.
 57. Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A (2000) Pathogenesis of intestinal amebiasis: From molecules to disease. *Clin Microbiol Rev*.
 58. Fasciglione GF, Gioia M, Tsukada H, Liang J, Iundusi R, Tarantino U, Coletta M, Pourmotabbed T, Marini S (2012) The collagenolytic action of MMP-1 is regulated by the interaction between the catalytic domain and the hinge region. *J Biol Inorg Chem*.
 59. Flisser A, Pérez-Tamayo R. *Aprendizaje de la parasitología basado en problemas*. México: Editores de textos mexicanos; 2006.
 60. Friedman SL (1999) Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis*.
 61. Friedman SL (2000) Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*.
 62. Friedman SL (2008) Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*.
 63. Friedman SL, Wei S, Blaner WS (1993) Retinol release by activated rat hepatic lipocytes: regulation by Kupffer cell-conditioned medium and PDGF. *Am J Physiol*.
 64. García-Mendoza H, Arenas-Guzmán R (2018) Hotchkiss and McManus and PAS stain. *DCMQ*.

65. García-Rivera G, Rodríguez MA, Ocádiz R, Martínez-López MC, Arroyo R, González-Robles A, Orozco E (1999) *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol Microbiol*.
66. Gebhardt R, Matz-Soja M (2014) Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis. *World J Gastroenterol*.
67. Geervliet E, Bansal R (2020) Matrix Metalloproteinases as Potential Biomarkers and Therapeutic Targets in Liver Diseases. *Cells*.
68. Gissen P, Arias IM (2015) Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *J Hepatol*.
69. Godbold GD, Mann BJ (1988) Involvement of the actin cytoskeleton and p21rho-family GTPases in the pathogenesis of the human protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Braz J Med Biol Res*.
70. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*.
71. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S (2002) Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci*.
72. Guerrero M, Larriva-Shahd J, Ramírez ME, Ríos D, Ruíz Molina A (1982) Collagen fibers in liver experimental amebic lesión. An ultrastructural study. *Arch Invest Med (Mex)*.
73. Guerrero M, Ríos D, Ramírez ME (1981) Histochemical aspects of liver lesions induced in hamsters by inoculation of *E. histolytica* in axenic culture. II. Evidence of perinecrotic fibrosis. *Rev Gastroenterol Mex*.
74. Han YP, Yan C, Zhou L, Qin L, Tsukamoto H (2007) A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix. *J Biol Chem*.
75. Hanna RM, Dahniya MH, Badr SS, El-Betagy A (2000) Percutaneous catheter drainage in drug-resistant amoebic liver abscess. *Trop Med Int Health*.
76. Häussinger D, Kordes C (2019) Space of Disse: a stem cell niche in the liver. *Biol Chem*.
77. Helk E, Bernin H, Ernst T, Iltrich H, Jacobs T, Heeren J, Tacke F, Tannich E, Lotter H (2013) TNF α -mediated liver destruction by Kupffer cells and Ly6Chi monocytes during *Entamoeba histolytica* infection. *PLoS Pathog*.
78. Hellberg A, Nickel R, Lotter H, Tannich E, Bruchhaus I (2001) Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. *Cell Microbiol*.
79. Higashi N, Senoo H (2003) Distribution of vitamin A-storing lipid droplets in hepatic stellate cells in liver lobules--a comparative study. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*.
80. Hu Y, Hu D, Yu H, Xu W, Fu R (2018) Hypoxia-inducible factor 1 α and ROCK1 regulate proliferation and collagen synthesis in hepatic stellate cells under hypoxia. *Mol Med Rep*.
81. Ibrahim SA, Mohamed MZ, El-Tahawy NF, Abdelrahman AM (2021) Antifibrotic effects of bezafibrate and pioglitazone against thioacetamide-induced liver fibrosis in albino rats. *Can J Physiol Pharmacol*.

82. Iredale JP (2001) Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis.*
83. Irmer H, Tillack M, Biller L, Handal G, Leippe M, Roeder T, Tannich E, Bruchhaus I (2009) Major cysteine peptidases of *Entamoeba histolytica* are required for aggregation and digestion of erythrocytes but are dispensable for phagocytosis and cytopathogenicity. *Mol Microbiol.*
84. Ito T, Oyake Y (1951) Astrocytoma; histological study of astrocytomas. *Gan.*
85. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S (2016) Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem.*
86. Jackson BC, Nebert DW, Vasiliou V (2010) Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. *Hum Genomics.*
87. Jain MR, Giri SR, Bhoi B, Trivedi C, Rath A, Rathod R, Ranvir R, Kadam S, Patel H, Swain P, Roy SS, Das N, Karmakar E, Wahli W, Patel PR (2018) Dual PPAR α / γ agonist saroglitazar improves liver histopathology and biochemistry in experimental NASH models. *Liver Int.*
88. Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliansky VE, Wang SS, Bissell DM (1994) Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol.*
89. Javier-Reyna R, Montaña S, García-Rivera G, Rodríguez MA, González-Robles A, Orozco E (2019) EhRabB mobilises the EhCPADH complex through the actin cytoskeleton during phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol.*
90. Jiménez-Cardoso J, Jiménez E, Bernal MJ, Kumate J (1985) Estudio histopatológico de las alteraciones hepáticas en hámsters inoculados con amibas sin y con protección. Informe preliminar. *Revista de la Facultad de Medicina.*
91. Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-John S, zum Büschenfelde KH, Blessing M (1999) TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol.*
92. Kapoor C, Vaidya S, Wadhwan V, Hitesh, Kaur G, Pathak A (2016) Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J Cancer Res Ther.*
93. Karin D, Koyama Y, Brenner D, Kisseleva T (2016) The characteristics of activated portal fibroblasts/myofibroblasts in liver fibrosis. *Differentiation.*
94. Keeley KJ, Schmaman A, Scott A (1962) Definitive diagnosis of amoebic liver abscess: value of liver biopsy. *Br Med J.*
95. Keene WE, Hidalgo ME, Orozco E, McKerrow JH (1990) *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. *Exp Parasitol.*
96. Khomich O, Ivanov AV, Bartosch B (2019) Metabolic Hallmarks of Hepatic Stellate Cells in Liver Fibrosis. *Cells.*
97. Kinnman N, Hultcrantz R, Barbu V, Rey C, Wendum D, Poupon R, Housset C (2000) PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Lab Invest.*

98. Kisseleva T, Brenner D (2021) Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*.
99. Kisseleva T, Brenner DA (2011) Anti-fibrogenic strategies and the regression of fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*.
100. Kojima S, Hayashi S, Shimokado K, Suzuki Y, Shimada J, Crippa MP, Friedman SL (2000) Transcriptional activation of urokinase by the Krüppel-like factor Zf9/COPEB activates latent TGF-beta1 in vascular endothelial cells. *Blood*.
101. Kristine M Peterson, Xiaoti Guo, Abdel G Elkahloun, Dinesh Mondal, Pradip K Bardhan, Akira Sugawara, Priya Duggal, Rashidul Haque, William A Petri Jr (2011) The expression of REG 1A and REG 1B is increased during acute amebic colitis. *Parasitol Int*.
102. Lalor PF, Lai WK, Curbishley SM, Shetty S, Adams DH (2006) Human hepatic sinusoidal endothelial cells can be distinguished by expression of phenotypic markers related to their specialised functions in vivo. *World J Gastroenterol*.
103. Leippe M (1997) Amoebapores. *Parasitol Today*.
104. Leippe M, Müller-Eberhard HJ (1994) The pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. *Toxicology*.
105. Leippe M, Tannich E, Nickel R, van der Goot G, Pattus F, Horstmann RD, Müller-Eberhard HJ (1992) Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *EMBO J*.
106. Lemoine S, Cadoret A, El Mourabit H, Thabut D, Housset C (2013) Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta*.
107. Levy MT, McCaughan GW, Abbott CA, Park JE, Cunningham AM, Müller E, Rettig WJ, Gorrell MD (1999) Fibroblast activation protein: a cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis. *Hepatology*.
108. Li D, He L, Guo H, Chen H, Shan H (2015) Targeting activated hepatic stellate cells (aHSCs) for liver fibrosis imaging. *EJNMMI Res*.
109. Li YL, Sato M, Kojima N, Miura M, Senoo H (1999) Regulatory role of extracellular matrix components in expression of matrix metalloproteinases in cultured hepatic stellate cells. *Cell Struct Funct*.
110. Lin JY, Chadee K (1992) Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol*.
111. Lohia A (2003) The cell cycle of *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Biochem*.
112. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. (2012) Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*.
113. Ludvik J, Shipstone AC (1970) The ultrastructure of *Entamoeba histolytica*. *Bull World Health Organ*.
114. MacParland SA, Liu JC, Ma XZ, Innes BT, Bartczak AM, Gage BK, Manuel J, Khuu N, Echeverri J, Linares I, Gupta R, Cheng ML, Liu LY, Camat D, Chung SW, Seliga RK, Shao Z,

- Lee E, Ogawa S, Ogawa M, Wilson MD, Fish JE, Selzner M, Ghanekar A, Grant D, Greig P, Sapisochin G, Selzner N, Winegarden N, Adeyi O, Keller G, Bader GD, McGilvray ID (2018) Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nat Commun.*
115. Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR (2005) New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol.*
116. Mann BJ (2002) Structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. *Int Rev Cytol.*
117. Manna D, Lentz CS, Ehrenkauf GM, Suresh S, Bhat A, Singh U (2018) An NAD⁺-dependent novel transcription factor controls stage conversion in *Entamoeba*. *Elife.*
118. Mariadasse R, Biswal J, Jayaprakash P, Rao GR, Choubey SK, Rajendran S, Jeyakanthan J (2016) Mechanical insights of oxythiamine compound as potent inhibitor for human transketolase-like protein 1 (TKTL1 protein). *J Recept Signal Transduct Res.*
119. Marra F, Romanelli RG, Giannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC, Pinzani M, Laffi G, Montalto P, Gentilini P (1999) Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology.*
120. Mathurin P, Duchatelle V, Ramond MJ, Degott C, Bedossa P, Erlinger S, Benhamou JP, Chaput JC, Rueff B, Poynard T (1996) Survival and prognostic factors in patients with severe alcoholic hepatitis treated with prednisolone. *Gastroenterology.*
121. Matsubara S, Matsubara D, Yamada T, Koike T, Sato I (2002) Glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat hepatic stellate cells: an ultrastructural enzyme-cytochemical study. *Hepatology Res.*
122. Mattern CF, Keister DB (1977) Experimental amebiasis. II. Hepatic amebiasis in the newborn hamster. *Am J Trop Med Hyg.*
123. McLaughlin J, Aley S (1985) The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. *J Protozool.*
124. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, Pradere JP, Schwabe RF (2013) Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun.*
125. Mohamadnejad M, Malekzadeh R, Nasser-Moghaddam S, Hagh-Azali S, Rakhshani N, Tavangar SM, Sedaghat M, Alimohamadi SM (2005). Impact of immunosuppressive treatment on liver fibrosis in autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci.*
126. Molino G (1991) The functioning liver mass. *Ric Clin Lab.*
127. Mondal S, Adhikari N, Banerjee S, Amin SA, Jha T (2020) Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. *Eur J Med Chem.*
128. Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Isupov M, Lindqvist Y, Schneider G, Tryggvason K (1999) Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science.*
129. Moriwaki H, Blaner WS, Piantadosi R, Goodman DS (1988) Effects of dietary retinoid and triglyceride on the lipid composition of rat liver stellate cells and stellate cell lipid droplets. *J Lipid Res.*

130. Mortimer L, Chadee K (2010) The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol*.
131. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*.
132. Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knäuper V, Atkinson S, Gavrilovic J (1999) Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS*.
133. Nagase H, Visse R, Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*.
134. Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T (2004) Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc*.
135. Naito M, Hasegawa G, Takahashi K (1997) Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc Res Tech*.
136. Napoli S, Scuderi C, Gattuso G, Bella VD, Candido S, Basile MS, Libra M, Falzone L (2020) Functional Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Melanoma. *Cells*.
137. Nauck M, Wölfle D, Katz N, Jungermann K (1981) Modulation of the glucagon-dependent induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase and tyrosine aminotransferase by arterial and venous oxygen concentrations in hepatocyte cultures. *Eur J Biochem*.
138. Nicoud IB, Jones CM, Pierce JM, Earl TM, Matrisian LM, Chari RS, Gorden DL (2007) Warm hepatic ischemia-reperfusion promotes growth of colorectal carcinoma micrometastases in mouse liver via matrix metalloproteinase-9 induction. *Cancer Res*.
139. Olivos A, Ramos E, Nequiz M, Barba C, Tello E, Castañón G, González A, Martínez RD, Montfort I, Pérez-Tamayo R (2005) *Entamoeba histolytica*: mechanism of decrease of virulence of axenic cultures maintained for prolonged periods. *Exp Parasitol*.
140. Olivos-García A, Carrero JC, Ramos E, Nequiz M, Tello E, Montfort I, Pérez-Tamayo R (2007) Late experimental amoebic liver abscess in hamster is inhibited by cyclosporine and N-acetylcysteine. *Exp Mol Pathol*.
141. Olivos-García A, Nequiz-Avendaño M, Tello E, Martínez RD, González-Canto A, López-Vancell R, García de León MC, Montfort I, Pérez-Tamayo R (2004) Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. *Exp Mol Pathol*.
142. Olivos-García A, Saavedra E, Enríquez-Flores S, Guillen N, Nequiz-Avendaño N, Martínez Y, Cortes A, Mendoza E, Carrero JC, Zúñiga P, López-Velázquez G, Pérez-Tamayo R (2020) Oxidative Stress and Heat Stress in Experimental Amoebic Liver Abscess. In: Guillen N. (eds) *Eukaryome Impact on Human Intestine Homeostasis and Mucosal Immunology*. Springer, Cham.
143. Olivos-García A, Saavedra E, Nequiz M, Pérez-Tamayo R (2011) Amibiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*. *Rev Fac Med (Méx)*.
144. Orozco E, Martínez-Palomo A, Lopez-Revilla R (1978) An in vitro model for the quantitative study of *E. histolytica* virulence. *Arch Invest Med (Mex)*.
145. Osna NA, Donohue TM Jr, Kharbanda KK (2017) Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and Current Management. *Alcohol Res*.

146. Pacheco-Yépez J, Rivera-Aguilar V, Barbosa-Cabrera E, Rojas Hernández S, Jarillo-Luna RA, Campos-Rodríguez R (2011) Myeloperoxidase binds to and kills *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Parasite Immunol.*
147. Pan LX, Li LY, Zhou H, Cheng SQ, Liu YM, Lian PP, Li L, Wang LL, Rong SJ, Shen CP, Li J, Xu T (2019) TMEM100 mediates inflammatory cytokines secretion in hepatic stellate cells and its mechanism research. *Toxicol Lett.*
148. Pellicoro A, Aucott RL, Ramachandran P, Robson AJ, Fallowfield JA, Snowdon VK, Hartland SN, Vernon M, Duffield JS, Benyon RC, Forbes SJ, Iredale JP (2012) Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis. *Hepatology.*
149. Pérez-Tamayo R, Martínez RD, Montfort I, Becker I, Tello E, Pérez-Montfort R (1991) Pathogenesis of acute experimental amebic liver abscess in hamsters. *J Parasitol.*
150. Pérez-Tamayo R, Montfort I, Tello E, Olivos A (1992) Ischemia in experimental acute amebic liver abscess in hamsters. *Int J Parasitol.*
151. Petri WA Jr, Haque R, Mann BJ (2002) The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol.*
152. Pinilla AE, López MC, Viasus DF (2008) History of the *Entamoeba histolytica* protozoan. *Rev Med Chil.*
153. Pinto C, Giordano DM, Maroni L, Marziani M (2018) Role of inflammation and proinflammatory cytokines in cholangiocyte pathophysiology. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.*
154. Pinzani M, Abboud HE, Gesualdo L, Abboud SL (1992) Regulation of macrophage colony-stimulating factor in liver fat-storing cells by peptide growth factors. *Am J Physiol.*
155. Pozzi A, LeVine WF, Gardner HA (2002) Low plasma levels of matrix metalloproteinase 9 permit increased tumor angiogenesis. *Oncogene.*
156. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL (2013) Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol.*
157. Ralston KS (2015) Chew on this: amoebic trophocytosis and host cell killing by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol.*
158. Ralston KS, Petri WA Jr (2011) Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol.*
159. Ralston KS, Solga MD, Mackey-Lawrence NM, Somlata, Bhattacharya A, Petri WA Jr (2014) Trophocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion. *Nature.*
160. Rappaport AM (1958) The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat Rec.*
161. Reinertson JW, Thompson PE (1951) Experimental amebic hepatitis in hamsters. *Proc Soc Exp Biol Med.*

162. Reed S, Bouvier J, Pollack AS, Engel JC, Brown M, Hirata K, Que X, Eakin A, Hagblom P, Gillin F (1993) Cloning of a virulence factor of *Entamoeba histolytica*. Pathogenic strains possess a unique cysteine proteinase gene. *J Clin Invest*.
163. Rico G, Leandro E, Rojas S, Giménez JA, Kretschmer RR (2003) The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Parasitol Res*.
164. Rigotherier MC, Khun H, Tavares P, Cardona A, Huerre M, Guillén N (2002) Fate of *Entamoeba histolytica* during establishment of amoebic liver abscess analyzed by quantitative radioimaging and histology. *Infect Immun*.
165. Rockey DC (2013) Translating an understanding of the pathogenesis of hepatic fibrosis to novel therapies. *Clin Gastroenterol Hepatol*.
166. Rockey DC, Fouassier L, Chung JJ, Carayon A, Vallee P, Rey C, Housset C (1988) Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells. *Hepatology*.
167. Roeb E (2018) Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects). *Matrix Biol*.
168. Rojas-Dotor S, Pérez-Ramos J, Giménez-Scherer JA, Blanco-Favela F, Rico-Rosillo G (2009) Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *E. histolytica* on cytokines and chemokine receptors in T CD4+ lymphocytes. *Biol Res*.
169. Ross MH, Pawlina W. *Ross Histología, texto y atlas. Correlación con biología celular y molecular*. 7ª ed. Wolters Kluwer. España. 2015.
170. Saavedra E, Encalada R, Vázquez C, Olivos-García A, Michels PAM, Moreno-Sánchez R (2019) Control and regulation of the pyrophosphate-dependent glucose metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*.
171. Saavedra E, Olivos García A (2017) Amibiasis.
172. Sánchez-Alemán E, Quintanar-Stephano A, Escobedo G, Campos-Esparza Mdel R, Campos-Rodríguez R, Ventura-Juárez J (2015) Vagotomy induces deregulation of the inflammatory response during the development of amoebic liver abscess in hamsters. *Neuroimmunomodulation*.
173. Sánchez-Ramírez B, Ramírez-Gil M, Vázquez-Moctezuma I, Ramos-Martínez E, Talamás-Rohana P (2004) *Entamoeba histolytica*: induction of cyclooxygenase-2 expression during amoebic liver abscess formation in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Exp Parasitol*.
174. Santos F, Marcial-Quino J, Gómez-Manzo S, Enríquez-Flores S, Nequiz-Avendaño M, Cortes A, De la Luz León-Avila G, Saavedra E, Pérez-Tamayo R, Olivos-García A (2020) Functional characterization and subcellular distribution of two recombinant cytosolic HSP70 isoforms from *Entamoeba histolytica* under normal and stress conditions. *Parasitol Res*.
175. Schaefer B, Rivas-Estilla AM, Meraz-Cruz N, Reyes-Romero MA, Hernández-Nazara ZH, Domínguez-Rosales JA, Schuppan D, Greenwel P, Rojkind M (2003) Reciprocal modulation of matrix metalloproteinase-13 and type I collagen genes in rat hepatic stellate cells. *Am J Pathol*.
176. Seigneur M, Mounier J, Prevost MC, Guillén N (2005) A lysine- and glutamic acid-rich protein, KERP1, from *Entamoeba histolytica* binds to human enterocytes. *Cell Microbiol*.

177. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF (2007) TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med*.
178. Seltzer JL, Lee AY, Akers KT, Sudbeck B, Southon EA, Wayner EA, Eisen AZ (1994) Activation of 72-kDa type IV collagenase/gelatinase by normal fibroblasts in collagen lattices is mediated by integrin receptors but is not related to lattice contraction. *Exp Cell Res*.
179. Sepulveda B (1982) Progress in amebiasis. *Scand J Gastroenterol Suppl*.
180. Schulte W, Scholze H (1989) Action of the major protease from *Entamoeba histolytica* on proteins of the extracellular matrix. *J Protozool*.
181. Shang L, Hosseini M, Liu X, Kisseleva T, Brenner DA (2018) Human hepatic stellate cell isolation and characterization. *J Gastroenterol*.
182. Shek FW, Benyon RC (2004) How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis? *Eur J Gastroenterol Hepatol*.
183. Shibayama-Salas M, Tsutsumi V, Campos-Rodríguez R, Martínez-Palomo A (1992) Morphological characterization of experimental amebic liver lesions in gerbils. *Arch Med Res*.
184. Shirley DT, Farr L, Watanabe K, Moonah S (2018) A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis. *Open Forum Infect Dis*.
185. Singh A, Banerjee T, Shukla SK (2021) Factors Associated with High Rates of Recurrence of Amebic Liver Abscess (ALA) in North India. *Am J Trop Med Hyg*.
186. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Secretaría de Salud, México. Anuario 2020.
187. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, North PE, Dalton S, Duncan SA (2010) Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology*.
188. Sobrin L, Liu Z, Monroy DC, Solomon A, Selzer MG, Lokeshwar BL, Pflugfelder SC (2000) Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid and corneal epithelial culture supernatant. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
189. Somlata, Nakada-Tsukui K, Tomoyoshi Nozaki (2017) AGC family kinase 1 participates in trogocytosis but not in phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Nat Commun*.
190. Stanley SL Jr (2003) Amoebiasis. *Lancet*.
191. Steiling H, Mühlbauer M, Bataille F, Schölmerich J, Werner S, Hellerbrand C (2004) Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease. *Am J Pathol*.
192. Strazzabosco M, Fabris L, Spirli C (2005) Pathophysiology of cholangiopathies. *J Clin Gastroenterol*.
193. Suflețel RT, Melincovici CS, Gheban BA, Toader Z, Miha CM (2020) Hepatic stellate cells - from past till present: morphology, human markers, human cell lines, behavior in normal and liver pathology. *Rom J Morphol Embryol*.
194. Tacke F, Weiskirchen R (2012) Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*.

195. Tandon BN, Tandon HD, Ravi VV, Gandhi PC (1975) Diffuse liver injury in amebic abscess of the liver: an electron microscopic study. *Exp Mol Pathol*.
196. Tanimoto M, Sepulveda B, Vazquez Saavedra JA, Landa I (1971) Lesiones producidas en el hígado por inoculación de *Entamoeba histolytica* cultivada en medio axénico. *Arch Invest Med (Mex)*.
197. Tanyuksel M, Petri WA Jr (2003) Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev*.
198. Tarrats N, Moles A, Morales A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, Mari M (2011) Critical role of tumor necrosis factor receptor 1, but not 2, in hepatic stellate cell proliferation, extracellular matrix remodeling, and liver fibrogenesis. *Hepatology*.
199. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos N (2016) Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*.
200. Thibeaux R, Avé P, Bernier M, Morcelet M, Frileux P, Guillén N, Labruyère E (2014) The parasite *Entamoeba histolytica* exploits the activities of human matrix metalloproteinases to invade colonic tissue. *Nat Commun*.
201. Tillack M, Biller L, Irmer H, Freitas M, Gomes MA, Tannich E, Bruchhaus I (2007) The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics*.
202. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH (2017) The liver. *Curr Biol*.
203. Troeger JS, Schwabe RF (2011) Hypoxia and hypoxia-inducible factor 1 α : potential links between angiogenesis and fibrogenesis in hepatic stellate cells. *Liver Int*.
204. Tsuchida T, Friedman SL (2017) Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*.
205. Tsutsumi V, Martinez-Palomo A (1988) Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *Am J Pathol*.
206. Tsutsumi V, Mena-Lopez R, Anaya-Velazquez F, Martinez-Palomo A (1994) Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol*.
207. Tsutsumi V, Shibayama M (2006) Experimental amebiasis: A selected review of some in vivo models. *Arch Med Res*.
208. Ueberham E, Löw R, Ueberham U, Schönig K, Bujard H, Gebhardt R (2003) Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis. *Hepatology*.
209. Van Hal SJ, Stark DJ, Fotedar R, Marriott D, Ellis JT, Harkness JL (2007) Amoebiasis: current status in Australia. *Med J Aust*.
210. Villalba-Magdaleno JD, Pérez-Ishiwara G, Serrano-Luna J, Tsutsumi V, Shibayama M (2011) *In vivo* programmed cell death of *Entamoeba histolytica* trophozoites in a hamster model of amoebic liver abscess. *Microbiology (Reading)*.
211. Wang W, Keller K, Chadee K (1994) *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. *Immunology*.

212. Winn H, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman diagnóstico microbiológico: Texto y atlas en color. 8ª ed. Argentina: Médica Panamericana; 2008.
213. Wynn TM, Barron L (2011) Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin Liver Dis.*
214. Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Morán P, Shibayama M, González E, Valadez A, Hernández E, Valenzuela O, Limón A, Partida O, Silva EF (2010) Human amebiasis: breaking the paradigm? *Int J Environ Res Public Health.*
215. Xu F, Zhou D, Meng X, Wang X, Liu C, Huang C, Li J, Zhang L (2016) Smad2 increases the apoptosis of activated human hepatic stellate cells induced by TRAIL. *Int Immunopharmacol.*
216. Xu X, Abdalla T, Bratcher PE, Jackson PL, Sabbatini G, Wells JM, Lou XY, Quinn R, Blalock JE, Clancy JP, Gaggar A (2017) Doxycycline improves clinical outcomes during cystic fibrosis exacerbations. *Eur Respir J.*
217. Yan C, Zhou L, Han YP (2008) Contribution of hepatic stellate cells and matrix metalloproteinase 9 in acute liver failure. *Liver Int.*
218. Yang CM, Liu YZ, Liao JW, Hu ML (2010) The in vitro and in vivo anti-metastatic efficacy of oxythiamine and the possible mechanisms of action. *Clin Exp Metastasis.*
219. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Fukui H (2003) Extracellular matrix remodeling may predominate over hepatocyte injury in hepatocellular carcinoma development. *Oncol Rep.*
220. Zhan L, Huang C, Meng XM, Song Y, Wu XQ, Yang Y, Li J (2015) Hypoxia-inducible factor-1alpha in hepatic fibrosis: A promising therapeutic target. *Biochimie.*
221. Zhang CY, Yuan WG, He P, Lei JH, Wang CX (2016) Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World J Gastroenterol.*
222. Zhang X, Zhang Z, Alexander D, Bracha R, Mirelman D, Stanley SL Jr (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. *Infect Immun.*

ANEXOS

En esta sección se mencionan las técnicas utilizadas y fundamentos de las tinciones histológicas, con la finalidad de profundizar aspectos específicos de dicha metodología.

Anexo 1. Técnica para deshidratación, inclusión en parafina y corte de tejidos

Una vez obtenidos los tejidos, se colocan en formol al 10% vol/vol en PBS, hasta su inclusión en parafina o al menos 24 h. Enseguida se colocan los tejidos en casetes para su inclusión.

Se sigue el siguiente proceso:

- a) Formol 10%, 10 min
- b) Alcohol 96% 1, 2h
- c) Alcohol 96% 2, 2h
- d) Alcohol 96% 3, 2h
- e) Alcohol 100% 1, 2h
- f) Alcohol 100% 2, 2h
- g) Alcohol 100% 3, 2h
- h) Alcohol-Xilol (1:1), 2h
- i) Xileno 1, 2h
- j) Xileno 2, 2h
- k) Parafina 1, 2h
- l) Parafina 2 (Inclusión)

Una vez incluidos se ponen en la plancha fría para su solidificación, se realizan los cortes a 5 μ m, se colocan en laminillas silanizadas y finalmente se secan en el horno 30-45min (65°-70°C).

Anexo 2. Técnica para desparafinar tejidos

Los cortes se desparafinan y se rehidratan como a continuación se indica:

- a. Xilol 1, 30min
- b. Xilol 2, 30min

- c. Xilol-alcohol absoluto, 45min
- d. Alcohol absoluto, 20min
- e. Alcohol 96%, 20min
- f. Agua de la llave
- g. Agua destilada

Anexo 3. Fundamento de la tinción ácido peryódico de Schiff

Se emplea para determinar carbohidratos entre ellos el glucógeno. En esta tinción histoquímica, primero se realiza una modificación química en el tejido antes a la coloración. El ácido peryódico oxida las uniones carbono-carbono de los carbohidratos donde hay hidroxilos adyacentes y grupos amino primarios o secundarios, formando aldehídos que pueden reaccionar con el reactivo de Schiff, para dar un color rojo-púrpura intenso (Ross MH, 2015).

Anexo 4. Fundamento de la tinción Tricrómica de Masson

Esta tinción diferencia tres tipos de estructuras: núcleos, citoplasma y tejido conjuntivo (fibras de colágeno). Esta técnica utiliza tres colorantes: 1) hematoxilina, que se une a cualquier molécula que tenga grupos ácidos, por lo tanto, tiñe a los núcleos de azul-negro; 2) Escarlata-fucsina se une a los componentes del tejido acidófilo; después cuando se trata con los fosfoácidos, los componentes menos permeables retienen el rojo (citoplasma, queratina, músculo) mientras que el rojo se elimina del colágeno; y 3) azul de anilina, los ácidos fosfomolibdico-fosfotúngstico actúan como medio de unión entre el colágeno y el azul de anilina, tiñendo las fibras de azul cielo (Bancroft JD, 2002)

Anexo 5. Fundamento de la tinción Rojo Sirio

Se utiliza para determinar selectivamente colágeno tipo I y III. Al utilizar microscopía de luz polarizada, la birrefringencia natural de colágeno es mucho mayor debido a la unión de las moléculas largas y alineadas de rojo sirio, por lo tanto, las fibras de colágeno se observan brillantes contra un fondo oscuro (Borges LF, 2007).

Anexo 6. Medio de cultivo TYI-S-33

Biosate peptona	120 g
Dextrosa	40 g
K ₂ HPO ₄	4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g
NaCl	8 g
Cisteína	4 g
Ácido Ascórbico	0.8 g
Citrato férrico de amonio (FAC)	90mg

Disolver secuencialmente los compuestos en 3480 mL de agua bidestilada.

Ajustar el pH a 6.8 con NaOH 1N

Filtrar con papel filtro

Esterilizar a 121°C por 15 min

Suplementar el medio con vitaminas 3% (tween 80 Mixtone) y suero bovino adulto 10%.