



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**“FACTORES MOLECULARES DE PATOGENICIDAD DE
Entamoeba histolytica”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ESPIRIDIÓN RAMOS MARTÍNEZ

TUTOR

TUTOR: DR. RUY PÉREZ TAMAYO.

MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE DE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE
MEDICINA EXPERIMENTAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA
DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES: RUY
PÉREZ TAMAYO, IRMGARD MONTFORT HAPPEL Y JUAN
PEDRO LACLETTE SAN ROMAN.**

DEDICATORIA

A MIS PADRES AVELINA Y MARIO

A MIS HERMANOS OBDULIA Y JOSÉ MANUEL

A IRAIS

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Ruy Pérez Tamayo y la Dra. Irmgard Montfort Happel[†] por haberme permitido realizar este trabajo e incorporarme a su grupo de trabajo.
- Al Dr. Alfonso Olivos García por su asesoría en todo lo relacionado al trabajo.
- A los técnicos Eusebio Tello y Mario Nequiz, del laboratorio de Patología Experimental, por su apoyo en la realización de las diferentes metodologías incluidas en este trabajo.
- Al MVZ Daniel Sánchez del bioterio del Departamento de Medicina Experimental, por su asistencia en el cuidado de los animales empleados en esta tesis.
- Al técnico en computación Marco Gudiño del Departamento de Medicina Experimental por su apoyo en la digitalización de las imágenes mostradas.

CONTENIDO

Introducción	1
Hipótesis	9
Objetivos	10
Materiales y Métodos	11
Reactivos	11
Parásitos y absceso hepático amibiano en hámster	11
Infecciones con dosis sub-infectivas de <i>Ehvir</i> en hígado de hámster	11
Eritrofagocitosis, actividad hemolítica y proteolítica, resistencia a complemento y citotoxicidad hacia PMNs	11
Sobrevida amibiana en ciego de ratón	11
Susceptibilidad a NO	14
Resistencia a O ₂	15
Determinación de O ₂ ⁻ y peroxidada-H ₂ O ₂ en parásitos vivos	15
O ₂ ⁻ en lisados amibianos	16
Actividad tiol-peroxidasa y producción de H ₂ O ₂ en lisados amibianos	17
Atrapadores de ROS en cultivos	17
Metabolitos amibianos	18
Actividad de la Piruvato: ferredoxin oxido reductasa (PFOR) amibiana	19
Peroxidación de lípidos	20
Resistencia a H ₂ O ₂	20
Oxidación de proteína amibiana	21
Terapia hiperbárica y menadione en el desarrollo del AHAEH	22
Efecto del NO sobre el desarrollo del AHAEH	22
Tratamiento con SNP, NaNO ₂ y NaNO ₃	23
Ensayos de apoptosis:	23
A) Fragmentación de DNA	23
B) YOPRO-1	24
C) TUNEL	24
Efecto del Z-VAD-FMK y el E-64 sobre la citotoxicidad amibiana causada por el SNP	25
Determinación de la actividad proteolítica en amibas intactas y en lisados amibianos	25
Eritrofagocitosis, resistencia a complemento y actividad proteolítica y hemolítica en amibas sometidas a especies relacionadas al óxido nítrico	26
Determinación de metabolitos	26
Análisis estadístico	27
Resultados	28
Eritrofagocitosis, actividad hemolítica y proteolítica, resistencia a complemento, citotoxicidad a PMNs, sobrevida amibiana en ciego de ratón, susceptibilidad a NO, H ₂ O ₂ y O ₂	28
Resistencia a O ₂	28
O ₂ ⁻ y la actividad peroxidada-H ₂ O ₂ en parásitos vivos	29
Atrapadores de ROS en cultivo	31
Reactividad del ácido tiobarbitúrico	31
O ₂ ⁻ en lisados amibianos	32
Actividad tiol-peroxidasa y producción de H ₂ O ₂ en lisados amibianos	32
Metabolitos	33
Actividad de PFOR	35
Oxidación de proteínas y resistencia a H ₂ O ₂	36

CONTENIDO

Terapia hiperbárica y menadione en el desarrollo del AHAEH	37
Parásitos tratados con SNP, NaNO ₂ y NaNO ₃	38
Determinación de apoptosis	39
Efecto del Z-VAD-FMK y E-64 sobre la citotoxicidad del SNP	42
Eritrofagocitosis, resistencia a complemento y actividad proteolítica y hemolítica	43
SNP en el desarrollo del AHAEH	44
Determinación de metabolitos	45
Discusión	46
Referencias	58
Publicacion	73

Palabras clave: *Entamoeba histolytica*, virulencia, Absceso hepático amibiano, antioxidantes, óxido nítrico, apoptosis, oxígeno, especies reactivas de oxígeno.

RESUMEN

La amibiasis humana causada por *Entamoeba histolytica* constituye un grave problema de salud en países subdesarrollados y los factores que determinan su patogenicidad se desconocen. La virulencia de este parásito es evaluada experimentalmente por su capacidad de formar abscesos en hígado de hámster (AHAEH). En el presente trabajo se exploraron los mecanismos de virulencia de *E. histolytica*, mediante estudios comparativos *in vitro* e *in vivo*, entre dos fenotipos de la cepa HM-1: IMSS, *E. histolytica* virulenta (*Ehv*) y *E. histolytica* no virulenta (*Ehnv*). De todas las funciones analizadas *in vitro*, solo la resistencia a O₂ se correlacionó con la virulencia. A diferencia de *Ehv*, la susceptibilidad de *Ehnv* a O₂ se debe a una falla metabólica a través de la inhibición irreversible de la piruvato-ferrodoxin-oxido-reductasa (PFOR) causada por el O₂ acumulado, que a su vez es consecuencia de su baja capacidad reductora de O₂ (formación de O₂^{·-} y H₂O₂) y de H₂O₂. Además, la evasión del óxido nítrico (NO) es una condición necesaria para la virulencia de *E. histolytica* ya que este radical es capaz de eliminarla mediante apoptosis. Nuestros resultados sugieren que la sobrevida amibiana es una condición necesaria para su virulencia. Durante el desarrollo del AHAEH, la virulencia de *E. histolytica* es determinada inicialmente (antes de 4 horas) por su capacidad reductora de O₂ y posteriormente por su capacidad antioxidante (neutralización de H₂O₂ y NO, principalmente).

ABSTRACT

Human amoebiasis is caused by *Entamoeba histolytica*. This illness is a serious health problem in underdeveloped countries and the factors that determine its pathogenicity are unknown. The virulence of this parasite is experimentally evaluated by their ability to form amoebic liver abscesses in hamster (ALAH). In order to explore the mechanisms of *E. histolytica* virulence, we performed comparative *in vitro* and *in vivo* Studies using two phenotypes of the strain HM-1: IMSS, virulent *E. histolytica* (*vEh*) and non virulent *E. histolytica* (*nvEh*). Of all the functions tested *in vitro*, only O₂ resistance was correlated with virulence. In contrast with *vEh*, O₂ *Eh*nv susceptibility is due to a metabolic flaw, as shown by the irreversible inhibition of the pyruvate-ferrodoxin-oxide-reductase (PFOR) caused by O₂ acumulation, which is the result of its low capacity to metabolize O₂ (formation of O₂⁻ and H₂O₂) and H₂O₂. In addition, nitric oxide (NO) evasion is a condition necessary for *E. histolytica* virulence because this radical is able to eliminate it through apoptosis. Our results suggest that amibian survival is a condition necessary for its virulence. During ALAH development, *E. histolytica* virulence is initially determined (before 4 hours) by its O₂ reducing capacity and alter this time by its antioxidant capacity (mainly neutralization of H₂O₂ and NO).

INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica es el protozoo parásito causante de la amibiasis humana (figura 1). Esta enfermedad ocasiona aproximadamente 100,000 muertes por año en el mundo (WHO, 1997) y la mayor incidencia se encuentra en países en vías de desarrollo (Walsh, 1986).

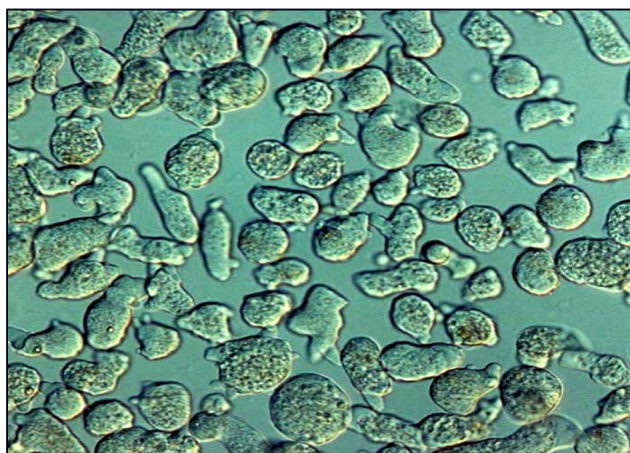


Figura 1: Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS

La infección comienza cuando las personas ingieren agua o alimentos contaminados con quistes del parásito, algunos de los cuales al llegar al intestino delgado se desenquistan y se transforman en trofozoítos. En el colon los trofozoítos proliferan, se enquistan y al ser eliminados junto con las heces pueden continuar su ciclo biológico. Durante el recorrido de la amiba por el intestino humano pueden ocurrir tres situaciones: 1) Que *E. histolytica* no dañe al hospedero en una colonización asintomática; 2) Que el parásito cause daño a nivel intestinal, ocasionando una serie de problemas, de los cuales el más frecuente es la colitis amibiana; y 3) Que *E. histolytica* perfora la mucosa intestinal y entre en la circulación hasta llegar al hígado, donde causa el absceso hepático amibiano (figura 2). En algunas ocasiones las amibas pueden

invadir otros órganos como la piel, el pulmón e incluso el cerebro (Huston *et al.*, 1999) (figura 3).

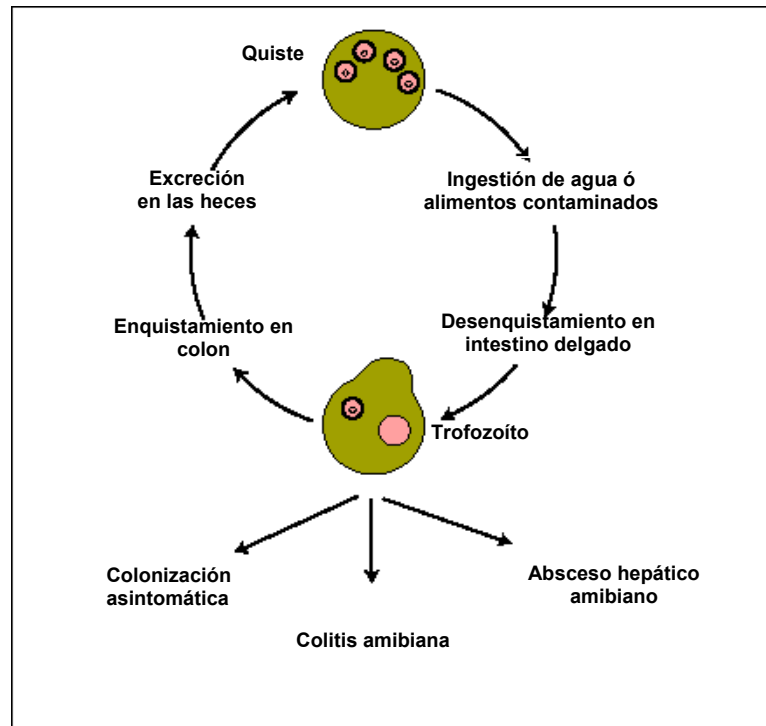


Figura 2. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica* y las manifestaciones clínicas de la infección en humanos (Modificada de Huston *et al.*, 1999)

La amibiasis se caracteriza por inflamación aguda y necrosis, tanto en el intestino grueso como en otros órganos. (figura 3) (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000; Pérez Tamayo, 1986), y lo mismo sucede en varios modelos experimentales de la enfermedad (Tsutsumi y Shibayama, 2006), como en el hámster en donde la lesión al igual que en el humano sin tratamiento, progresa hasta ocasionar la muerte (figura 4).

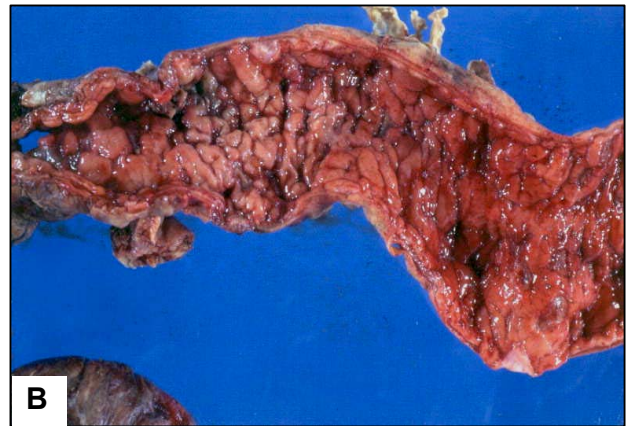


Figura 3: La amibiasis se caracteriza por inflamación aguda y necrosis, En la figura se observan diferentes cuadros de amibiasis invasiva en el ser humano. **A**, Absceso hepático amibiano. **B**, Megacolon tóxico. **C**, Absceso hepático amibiano perforado a pulmón. **D**, Amibiasis cerebral. **E**, amibiasis cutánea en abdomen.

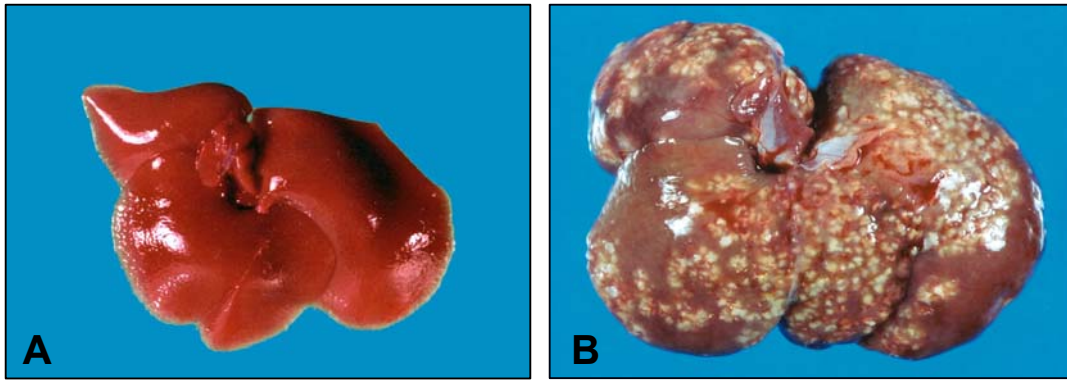


Figura 4: Aspecto macroscópico de A) hígado de hámster normal y B) hígado de hámster con absceso hepático amibiano experimental de 7 días.

Factores de virulencia

Un factor de virulencia se define como un componente de un organismo patógeno que al ser bloqueado específicamente reduce la virulencia sin afectar la viabilidad (Casadevall y Pirofski, 1999). En el caso de la amibiasis la virulencia del parásito se atribuye a su capacidad histolítica, que realiza a través de varias moléculas, denominadas factores de virulencia, siendo las más estudiadas las siguientes: (1) **amiboporos**: son proteínas formadoras de poros en la membrana de las células blanco, carecen de actividad enzimática, tienen efecto citolítico sobre bacterias y algunas líneas celulares (Andra *et al.*, 1996) y su inhibición afecta la citotoxicidad amibiana (Bracha *et al.*, 2003), (2) **adhesinas**: son lectinas de superficie capaces de reconocer residuos de carbohidratos en la superficie de células blanco, son esenciales para la adherencia y señalización (Huston *et al.*, 2003); (3) **proteasas de cisteína** (por ejemplo: CP1-CP9, CP112): degradan algunos componentes de la matriz extracelular, anticuerpos, componente C3 del complemento y anafilatoxinas, causan efecto citopático sin citotoxicidad y son citolíticas sobre células muertas (Tran *et al.*, 1998; Reed *et al.*, 1989, Lushbaugh *et al.*, 1985, Keene *et al.*,

1986, Montfort *et al.*, 1993); (4) **fosfolipasas**: capaces de fraccionar lípidos, en las amibas son principalmente dependientes de calcio (Long, *et al.*, 1985) y (5) **colagenasas**: son enzimas localizadas en el citoplasma de la amiba y degradan colágena, molécula presente en tejidos del hospedero (Gadasi y Kessler, 1983). Por otra parte, la virulencia del parásito, determinada por la formación del absceso hepático amibiano en hámsters, disminuye: 1) cuando las amibas no tienen actividad de proteasas (Stanley Jr. *et al.*, 1995), 2) cuando se inhibe la expresión de los genes *EhCP5* (Ankri *et al.*, 1999), de la subunidad ligera de la adhesina de galactosa (Ankri *et al.*, 1999) o del amiboporo A (Bracha *et al.*, 1999) y 3) cuando se bloquea el gen APA (Bracha *et al.*, 2003). Debido a que hasta la fecha no se ha demostrado la actividad histolítica o citotóxica *in vivo* de cada una de estas moléculas y a la falta de estudios histológicos para evaluar la presencia de los parásitos, deficientes en la expresión de dichas moléculas, en los tejidos del hospedero, los datos que apoyan el papel de cada una de estas moléculas como factores de virulencia, no son concluyentes. Según la definición de Casadevall y Pirofski antes mencionada, (1999), es probable que las moléculas amibianas consideradas como factores de virulencia sean, al igual que las moléculas del metabolismo, factores de sobrevivencia.

Por otra parte, se ha observado que cuando *E. histolytica* permanece en cultivo por períodos prolongados pierde su virulencia (Murray *et al.*, 1981; Ghadirian *et al.*, 1986). Sin embargo, al igual que las amibas virulentas, éstas realizan de la misma manera algunas funciones en las que participan adhesinas, amiboporos y proteasas de cisteína. Además, en la propuesta de

los factores de virulencia de *E. histolytica*, se considera la comparación con la amiba no patógena *Entamoeba dispar* (*Ed*), en la que la expresión de dichos factores está disminuida, pero no ausente (Bruchhaus *et al.*, 1996; Pillai *et al.*, 2001). Lo anterior cuestiona nuevamente la participación de los llamados factores de virulencia de *E. histolytica* en su virulencia.

Además, la propuesta de factores de virulencia de *E. histolytica*, se apoya en la comparación con la amiba no patógena *Entamoeba dispar* (*Ed*). Las moléculas propuestas como factores de virulencia, están significativamente más expresadas en *E. histolytica* (Bruchhaus *et al.*, 1996; Pillai *et al.*, 2001); sin embargo, la incapacidad para producir lesión por la especie no patogénica *E. dispar*, hace a esta comparación poco válida.

Estudios recientes muestran que algunos genes amibianos son sobre-expresados en condiciones diferentes al cultivo axénico; por ejemplo, las amibas en el hígado de hámster (Bruchhaus *et al.*, 2002; Santi-Rocca, *et al.*, 2008), en el intestino de ratón o incubadas en un ambiente de alta concentración de O₂ (Akbar *et al.*, 2004). Estos datos abren la posibilidad de que moléculas diferentes a las consideradas “factores de virulencia” puedan estar relacionadas con su virulencia y solo se expresen cuando las amibas se encuentran en el hospedero.

Por otra parte, se ha observado que en ausencia de células inflamatorias las amibas patógenas desaparecen del hígado de hámster en un tiempo corto sin provocar lesión (Olivos *et al.*, 2004) y el tratamiento de los animales con

anti-inflamatorios o antioxidantes inhibe la destrucción tisular. Esto sugiere que la respuesta del hospedero es la principal responsable de la destrucción tisular, como inicialmente fue propuesto por Tsutsumi *et al.*, (1984). Por lo anterior, es poco probable que la virulencia de *E. histolytica* se deba a su capacidad histolítica; tal vez su capacidad de evadir al sistema inmune le permita sobrevivir y por lo tanto estimular a las células del sistema inmune a producir sustancias citotóxicas, que en lugar de eliminar al parásito destruyan el tejido hasta causar la disfunción del órgano y más tarde la muerte del hospedero. Además, otros factores que pueden determinar el cuadro clínico en la amibiasis humana es el tipo de cepa, ya que se han descrito diferentes grados de virulencia en distintos aislados o incluso en amibas cultivadas en forma axénica (Bruckner, 1992); y por otra parte, la respuesta del hospedero hacia el parásito, ya que también, puede determinar el desarrollo del cuadro clínico. (Walkers y Sellards, 1913).

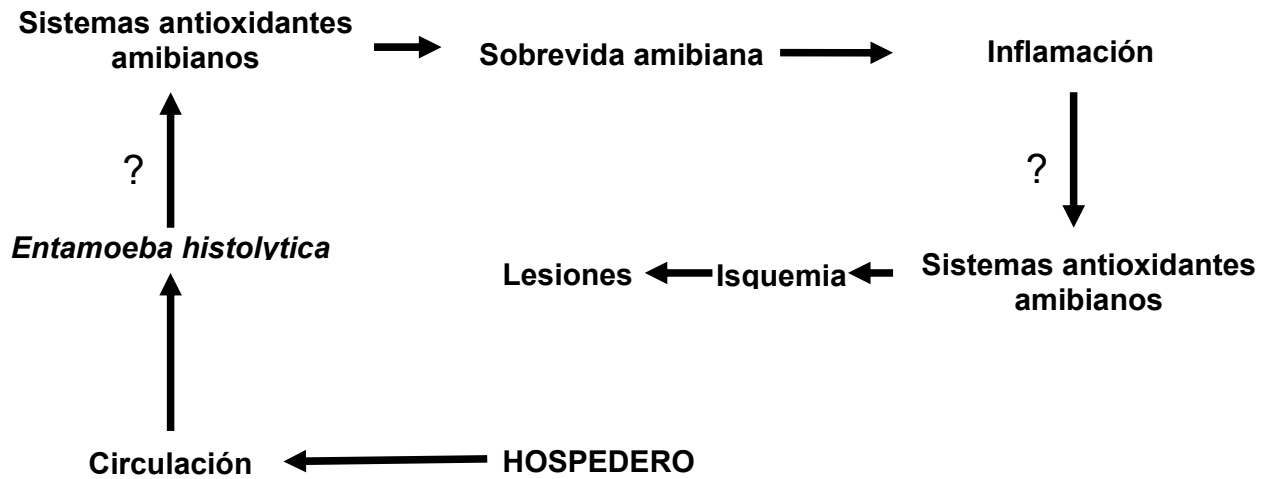
Durante las primeras etapas en el desarrollo del AHAEH (4 horas), las amibas se enfrentan a moléculas citotóxicas como el complemento y el O₂ de la circulación, por lo que un sistema eficiente de evasión para estas moléculas podría determinar su sobrevivencia durante este período. Después de este tiempo, las amibas sobrevivientes tienen que resistir a los productos de la inflamación, como especies reactivas de O₂ y nitrógeno. De manera simultánea se crea una zona de hipoxia que es favorable para la sobrevivencia del parásito (Olivos *et al.*, 2004), originada por la isquemia que genera la inflamación y por la reducción en la concentración de O₂ que puede ser causada tanto por las células inflamatorias como por los parásitos.

E. histolytica es un protozoario microaerófilo que habita en el intestino grueso del humano y es capaz de tolerar hasta un 5% de O₂ y contrarrestar a las especies reactivas de O₂. (Band y Cirrito, 1979); una vez que la amiba invade los tejidos debe tolerar la alta concentración de O₂ (O₂≈~23.5 Torr) y contrarrestar las especies reactivas de O₂ y nitrógeno que se producen en el ambiente inflamatorio.

Se ha propuesto que la eliminación en corto tiempo de *Ehv* del hígado de hámster, puede ser debida a especies reactivas de O₂ o especies relacionadas con NO (Olivos *et al.*, 2005). Esto sugiere que el proceso adaptativo al que se someten las amibas cuando invaden los tejidos es clave para su permanencia. Por todo lo anterior, es probable que la virulencia de *E. histolytica* esté relacionada con sus propiedades oxidantes y/o antioxidantes como fue sugerido hace tiempo (Mirelman, 1987; Bracha y Mirelman, 1984; Kumar *et al.*, 1992).

En el presente trabajo se exploraron los mecanismos de virulencia amibiana, mediante estudios comparativos *in vitro* e *in vivo*, entre dos fenotipos de la misma cepa HM-1: IMSS, *Ehv* y *Eh_v*. Nuestros resultados muestran que un requisito esencial para el desarrollo de las lesiones es la sobrevivencia amibiana, y esta se relaciona directamente con su capacidad de evadir sustancias citotóxicas, principalmente O₂, NO y especies reactivas de O₂ y nitrógeno.

HIPÓTESIS



El requisito esencial para el desarrollo de lesiones en la amibiasis es la sobrevida de *Entamoeba histolytica* virulenta. Es probable que dicha sobrevida se deba a su resistencia a sustancias citotóxicas presentes en el hospedero como las especies reactivas derivadas de O₂ y nitrógeno. La incapacidad para desintoxicar sustancias dañinas podría determinar la eliminación temprana de *E. histolytica* no virulenta del hígado de hámster.

OBJETIVOS

- Comparar las diferentes funciones amibianas *in vitro* e *in vivo* entre dos fenotipos de la cepa HM-1:IMSS, *E. histolytica* virulenta y *E. histolytica* no virulenta.
- Comparar la susceptibilidad de *E. histolytica* virulenta y *E. histolytica* no virulenta al O₂ molecular y especies reactivas de O₂.
- Determinar la producción de especies reactivas de O₂ en ambos fenotipos amibianos en presencia de O₂.
- Explorar los principales blancos metabólicos de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en ambos tipos de amibas.
- Determinar el efecto del óxido nítrico y especies reactivas de nitrógeno sobre trofozoítos de *E. histolytica*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Cloruro de difenilenedione (DPI), edaravone (MCI-186), EUK-8, tempol, dihidroetidio (DHE) y dihidrorodamina (DHR) se adquirieron en Calbiochem (San Diego, CA). Se emplearon cilindros de gas que contenían 99.99 % de O₂ grado medicinal obtenido de INFRA (México). Otros reactivos usados como E-64, azocaseína, glucógeno, H₂O₂, dimetil sulfoxido (DMSO), paraformaldehído, β-NADPH, ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benzen-disulfónico (tiron), ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), menadione, 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH), peroxidasa de rábano (HRP), nitroprusiato de sodio (SNP), nitrito de sodio (NaNO₂), nitrato de sodio (NaNO₃) y Z-VAD-FMK, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO).

Parásitos y absceso hepático amibiano en hámster

Se mantuvieron cultivos axénicos de *Ehv* HM-1:IMSS en medio TYI-S-33 de acuerdo al protocolo ya establecido por Diamond *et al.*, (1978). La virulencia fue definida por la capacidad de 5x10⁵ trofozoítos de producir múltiples abscesos hepáticos en hígados de 4/4 hámsters de 100 g, 7 días después de la inyección intraportal de dichos trofozoítos. La virulencia fue mantenida por pases de las amibas a través de hígado de hámster dos veces por mes, recobrando los parásitos de los abscesos de 7 días, lavándolos dos veces con amortiguador de fosfatos 15 mM pH 7.2, NaCl 0.15 M (PBS) y nuevamente creciéndolos en forma axénica. La razón del tratamiento anterior fue para mantener un nivel uniforme de la virulencia y no debido a la pérdida rápida de la virulencia, ya que este fenómeno ocurre en períodos largos de tiempo; como

en el caso de *Ehmv* utilizadas en este trabajo, las cuales han permanecido en condiciones de cultivo por más de cuatro años y cuando son inoculadas por inyección intraportal son incapaces de inducir lesiones en 4/4 hámsters, incluso en cantidades tan altas como 3×10^6 trofozoítos. En todos los casos la viabilidad fue determinada mediante exclusión con azul de Trypan. Todos los experimentos realizados con animales se desarrollaron de acuerdo a la ley General de Salud de México.

Infecciones con dosis sub-infectivas de Ehv en hígado de hámster

Diferentes cantidades sub-infectivas de *Ehv* (2×10^5 , 1×10^5 y 0.5×10^5 trofozoítos) fueron inyectados en la vena porta de 24 hámsters (4 animales por grupo). Cuatro animales de cada dosis fueron sacrificados a las 6 y 24 horas posteriores a la inyección con los parásitos; sus hígados fueron extirpados, procesados histológicamente y teñidos con la tinción de ácido periódico de Schiff (PAS).

Eritrofagocitosis, actividad hemolítica y proteolítica, resistencia a complemento y citotoxicidad hacia PMNs

a) La eritrofagocitosis fue evaluada de acuerdo a la técnica previamente descrita por Keller *et al.*, (1988). 5×10^5 amibas fueron incubadas con 5×10^7 eritrocitos de hámster en 1 ml de PBS durante 15 minutos a 36°C . Las muestras fueron centrifugadas a $500 \times g$ por 3 minutos, las amibas fueron recuperadas y resuspendidas en 0.4 ml de agua destilada y en seguida fue adicionado 1 ml de PBS. Las muestras fueron nuevamente centrifugadas a $500 \times g$ por 3 minutos y el sedimento fue disuelto con 0.5 ml de ácido fórmico y

posteriormente se agregó 0.5 ml de PBS. Finalmente, la absorbancia fue determinada a 397 nm.

b) La actividad hemolítica fue estimada por la incubación de 5×10^5 trofozoítos con 5×10^8 eritrocitos de hámster en 1 ml de PBS a 36°C durante una hora. Las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a $4,500 \times g$, el sobrenadante fue recuperado y la absorbancia fue determinada a 570 nm (Ankri *et al.*, 1998).

c) La actividad proteolítica fue determinada como ha sido descrito por Pérez Montfort *et al.*, (1987). A 5×10^5 trofozoítos lisados por congelación se les agregó 0.2 ml de PBS y 0.4 ml de una solución de azocaseína a 2.5 mg/ml en PBS. La mezcla fue incubada por 3 horas a 36°C y la reacción fue frenada mediante la adición de 0.6 ml de ácido tricloroacético 10% (peso/volumen). Las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a $4,500 \times g$ y finalmente se determino la absorbancia a 366 nm.

d) La resistencia a complemento fue determinada mediante la incubación de trofozoítos amibianos en suero fresco de hámster ($5 \times 10^5/\text{ml}$) por 2 horas a 36°C (Olivos *et al.*, 2004). La viabilidad de las amibas fue determinada por la exclusión con azul de Trypan.

e) La capacidad citotóxica de los trofozoítos amibianos axénicos fue probada sobre PMNs frescos obtenidos de la cavidad peritoneal de hámsters inyectados previamente con 1 ml de glucógeno 3% en PBS. El experimento fue

desarrollado incubando 1×10^5 amibas con 2.5×10^6 PMNs en medio TYI-S-33 por 3 horas a 36°C y determinando la viabilidad de los PMNs por exclusión con azul de Trypan. Los resultados fueron comparados con controles sin parásitos.

Todos los ensayos descritos fueron realizados por duplicado en 5 experimentos independientes utilizando *Ehv* y *Ehnv*. Con los resultados de cada experimento se calculó el promedio y la DE para cada fenotipo amibiano. Como 100% en todas las funciones se tomaron los niveles encontrados en *Ehv*.

Sobrevida amibiana en ciego de ratón

Estos experimentos fueron desarrollados de acuerdo al protocolo previamente descrito por Houpt *et al.*, (2002). 10 ratones C3H/HeJ (5 hembras y 5 machos) fueron divididos en dos grupos, anestesiados con ketamina/xilazina e inyectados con *Ehv* ó *Ehnv* (5×10^6 / 0.2 ml PBS) dentro del ciego expuesto por laparoscopia quirúrgica. Los animales fueron sacrificados por sobredosis con pentobarbital 3 días después de la infección. La presencia de parásitos viables y móviles fue examinada por exclusión con azul de Trypan.

Susceptibilidad a NO

Para determinar la susceptibilidad de *Ehv* y *Ehnv* al NO, se incubaron un millón de amibas de cada fenotipo, en 4 ml de medio TYI-S-33 con 1 mM de SNP (donador de NO), se incubaron a 36.5°C durante una hora, posteriormente los tubos fueron centrifugados a $2000 \times g$ por 5 minutos, el sobrenadante fue eliminado y reemplazado por medio de cultivo TYI-S-33. Finalmente se

incubaron a 36 °C durante 24 horas y se determinó el número de amibas vivas. Como controles se utilizaron amibas de cada fenotipo sin SNP. Cada determinación se repitió 3 veces por duplicado.

Resistencia a O₂

Para este procedimiento se utilizó medio Hanks sin rojo de fenol (debido a que este colorante interfería con las lecturas en el espectrofluorómetro), este medio fue saturado con O₂ molecular por burbujeo constante durante 30 minutos. La concentración del O₂ fue determinada con un electrodo de Clark. Un millón de *Ehv* ó *Eh_v* fueron incubados en 1.2 ml de medio Hanks a 36°C en tubos Eppendorf de 1.5 ml herméticamente cerrados o con el mismo medio pero saturado de O₂ como se mencionó previamente. La sobrevivencia amibiana fue monitoreada a 30, 45 y 60 minutos mediante exclusión con azul de Trypan. La viabilidad amibiana fue comparada con amibas incubadas por el mismo período en medio TYI-S-33. Se realizaron cinco experimentos independientes por duplicado. Para comparar todos los grupos se usó una gráfica lineal mostrando promedios y DE para cada período de tiempo.

Determinación de O₂⁻ y peroxidasa-H₂O₂ en parásitos vivos

Un millón de *Ehv* ó *Eh_v* fue expuesto a medio Hanks saturado de O₂ durante 15 minutos (dosis subletal) a 36°C en presencia de 5 µM de dihidroetidio (DHE) para O₂⁻ (Zhao *et al.*, 2003) o 10 µM de dihidrorodamina (DHR) para H₂O₂ (Henderson y Chappell, 1993). Ambos reactivos fluorescentes fueron tomados de un stock in DMSO a 2.5 mM. Como controles se utilizaron amibas incubadas en Hanks o TYI-S-33 conteniendo DHE o DHR. Transcurrido el

tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 2000 x g y los trofozoítos fueron fijados mediante la adición de 1% de paraformaldehído (peso/volumen) por 30 minutos. Los parásitos fueron lavados dos veces con PBS y resuspendidos en este mismo amortiguador. Finalmente, 30 µl de cada muestra fueron colocados en portaobjetos para ser observados en un microscopio confocal invertido Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena, Germany) usando un objetivo 20X (NA 0.5 Plan Neofluar). Con una excitación de 543 nm de HeNe para rodamina y 514 nm de laser Ar para oxietidio. Ambas muestras fueron detectadas con un filtro de emisión LP560. Debido a que la DHR no muestra fluorescencia hasta su oxidación a rodamina por la acción de peroxidasa en presencia de H₂O₂ como sustrato (Masaki *et al.*, 1995) consideramos que esta prueba revela la actividad de peroxidasa como la producción de H₂O₂.

O₂⁻ en lisados amibianos

Un millón de *Ehv* o *Ehmv* fue congelado a -70 °C y este lisado fue resuspendido en 1.2 ml de medio Hanks saturado con O₂ e incubado por 1 hora a 36°C, en presencia de 5 µM de DHE, 100 µM de NADPH y 10 µM de tiron (un inhibidor de FeSOD). Posterior a la incubación, la fluorescencia fue monitoreada en un fluorómetro (Fluoroskan ascent) utilizando una excitación de 480 nm y una emisión de 567 nm. En cada experimento se incluyeron controles de fluorescencia sin parásitos (DHE o DHE+O₂), las lecturas obtenidas de estos controles fueron restadas a los promedios obtenidos en cada experimento. Se muestran los resultados de cinco experimentos independientes por duplicado en el que se expresa la media ± DE.

Actividad tiol-peroxidasa y producción de H₂O₂ en lisados amibianos

Para determinar la actividad amibiana tiol peroxidasa, se utilizó 1×10^6 de *Ehv* o *Ehnv* previamente congelado a -70°C y posteriormente fue resuspendido en 1.2 ml de medio Hanks normal o saturado con O₂ en presencia de 10 μM de DHR y 100 μM de NADPH. Finalmente estos lisados fueron incubados por 1 hora a 36°C . En forma paralela y bajo las mismas condiciones, se colocaron tubos con lisados pre-incubados con 1 mM del inhibidor de grupos tioles iodoacetamida. Para determinar la producción de H₂O₂, a lisados de 1×10^6 de *Ehv* o *Ehnv* se les agregó 1 U/ml de peroxidasa de rábano, 10 μM de DHR y 100 μM de NADPH; posteriormente, fueron resuspendido en 1.2 ml de medio Hanks normal o saturado con O₂. La fluorescencia producida por las muestras fue cuantificada a 488 nm de excitación y 525 nm de emisión. La fluorescencia producida por muestras sin parásitos (sólo con DHR o DHR+O₂) fue restada de la obtenida en las muestras experimentales. Se muestran los resultados de cinco experimentos independientes hechos por duplicado, usando sus promedios \pm DE.

Atrapadores de ROS en cultivos

Un millón de trofozoítos amibianos (*Ehv* o *Ehnv*) fueron incubados en 5 ml de medio TYI-S-33 conteniendo 1, 10, 50 y 100 μM de edaravone (atrapador de $\cdot\text{OH}$) (Kawai, *et al.*, 1997), EUK-8 (atrapador de O₂⁻ y H₂O₂) (Brandier, *et al.*, 1997) y tempol (atrapador de O₂⁻) (Gariboldi, *et al.*, 2000). Después de 6 y 24 horas de incubación a 36°C , se determinó la viabilidad en cada uno de los

casos mediante la exclusión con azul de Trypan. Se realizaron cuatro experimentos en forma independiente y se calcularon sus promedios \pm DE.

Metabolitos amibianos

25×10^6 *Ehv* o *Ehmv* fueron distribuidas un millón por tubo eppendorf y expuestas 15 minutos a O_2 molecular, utilizando 1.2 ml de PBS con 5 mM de glucosa en vez del medio Hanks (debido lecturas inespecíficas ocasionadas por este último medio en el espectrofotómetro) e incubándolas a $36^\circ C$. Como control se incluyeron tubos con el mismo fenotipo y cantidad de amibas en PBS-glucosa, sin O_2 . Los tubos de cada grupo fueron mezclados y los trofozoítos fueron colectados por centrifugación a $2000 \times g$ por 5 minutos y 1 ml de cada sobrenadante fue utilizado para determinar etanol. Por otra parte, las amibas fueron resuspendidas en 1 ml de PBS y se les adicionó ácido perclórico frío al 3% (v/v) en presencia de 1 mM de EDTA y agitando vigorosamente hasta visualizar un precipitado blanquecino en la reacción. Cada muestra fue centrifugada a $12000 \times g$ por 5 minutos; el sobrenadante fue separado y neutralizado con diferentes volúmenes de una solución de KOH 100 mM y Tris 3 M; estas muestras se conservaron a $-70^\circ C$. Las determinaciones cuantitativas de metabolitos (G6P, F6P, piruvato, ATP y etanol) se realizaron mediante ensayos enzimáticos como previamente fue descrito por Saavedra *et al.*, (2007); mediante acoplamientos enzimáticos. Las reacciones fueron realizadas con la enzima específica para cada metabolito y la oxidación de NADH o la reducción de $NAD(P)^+$ fue cuantificada a 340 nm.

Actividad de la Piruvato: ferredoxin oxidoreductasa (PFOR) amibiana

8×10^6 de *Ehv* o *Ehvv* se expusieron a PBS-glucosa saturado con O_2 durante 15 minutos de la forma ya descrita. Después de este período, las amibas fueron colectadas y resuspendidas en 0.5 ml de un amortiguador (previamente saturado con nitrógeno) 100 mM de KH_2PO_4 , 25 mM de β -mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA y 1% de triton X-100. Los trofozoítos fueron congelados y descongelados con nitrógeno líquido (3 veces); posteriormente se centrifugaron a $21000 \times g$ por 10 minutos, el sobrenadante fue separado y se almacenó bajo condiciones anaerobias (ambiente N_2) a $-20^\circ C$. La actividad de PFOR fue determinada bajo condiciones anaeróbicas en una celda de 1 ml conteniendo una mezcla del amortiguador pH 7.5, 100 mM Na_2HPO_4 (previamente saturado con N_2) 0.25 mM azul de nitrotetrazolio (NBT), 0.1 mM coenzima A (CoA), 10 mM piruvato y de 2 a 6 μg de los extractos amibianos. La reacción fue iniciada por la adición de CoA o piruvato y la lectura obtenida en ausencia de estas moléculas fue restado a las lecturas de las muestras experimentales. La reducción del NBT fue medida a 560 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu, Kyoto, Japan). Para la inactivación de PFOR, diferentes alícuotas de los extractos amibianos fueron incubadas en PBS saturado previamente con aire ambiental por una hora a $4^\circ C$; posteriormente, se determinó la actividad residual de PFOR. Para la reactivación de PFOR, diferentes alícuotas de extractos amibianos inactivados por aire o extractos amibianos incubados con PBS saturado con O_2 fueron tratados con 1 mM Fe^{2+} y 5 mM DTT por 1 hora en un ambiente nitrogenado y la actividad de PFOR se determinó con el procedimiento ya descrito.

Peroxidación de lípidos

1×10^6 *Ehv* o *Ehmv* fueron expuestas a altas concentraciones de O_2 en medio Hanks de la forma ya mencionada durante 1 hora a $36^\circ C$. Se incluyeron muestras control sin O_2 (ambas en medio Hanks o TYI-S-33) usando las mismas condiciones de incubación. A todas las muestras se les adicionó 2% EDTA y 0.05% de butilhidroxitolueno (BHT); se mantuvieron a $-70^\circ C$ hasta su uso. Cien microlitros de cada muestra se utilizaron para la determinación de peroxidación de lípidos; se determinaron sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) por un método fluorescente (Fraga, *et al.*, 1987). Brevemente, 0.05 ml de BHT al 4% y 1 ml de PBS se adicionaron a 0.1 ml de cada muestra y se incubaron por 30 minutos a $36^\circ C$. Posteriormente se les agregó 1.5 ml de ácido acético al 20% (v/v) y 1.5 ml de ácido 2-tiobarbitúrico 0.8% (p/v). A continuación los tubos fueron hervidos por 45 minutos y las TBARS fueron extraídas con 5 ml de n-butanol. Los tubos fueron centrifugados $500 \times g$ por 5 minutos y la fluorescencia en la capa de butanol fue determinada a 515 nm de excitación y 553 nm de emisión en un espectrofluorometro (Perkin Elmer LS50B). Los valores se expresaron como pmoles de TBARS (equivalentes de malon-dialdehído (MDA)) por mg de proteína, utilizando un estándar de MDA de 1,1,3,3 tetraethoxypropano (El Hafidi y Baños, 1997) Los resultados fueron expresados en promedios \pm DE.

Resistencia a H_2O_2

1×10^6 *Ehv* o *Ehmv* fueron incubadas durante 1 hora a $36^\circ C$ en 1 ml de medio TYI-S-33 conteniendo 2 mM de H_2O_2 . Transcurrida la incubación se

determinó la viabilidad amibiana mediante exclusión con azul de Trypan y se comparó con la viabilidad de los parásitos incubados en el mismo medio sin H₂O₂. Se realizaron 5 experimentos independientes por duplicado y se calcularon promedios ± DE.

Oxidación de proteína amibiana

Después de 15 minutos de exposición de *Ehv* o *Ehmv* a O₂ como se describió previamente, las amibas fueron resuspendidas en 0.5 ml de PBS-glucosa con 1 mM de DTT y congeladas a -70°C. Posteriormente, 1 mg de proteína de cada muestra fue colocado en un tubo eppendorf de 1.5 ml, fue precipitada por la adición de 200 µl de TCA al 20% (p/v) y fue centrifugada a 11000 x *g* por 3 minutos. Posteriormente, los precipitados fueron resuspendidos en 0.5 ml de 2,4-dinitrofenilhidracina 10 mM (disuelta en HCl 2 N) e incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora, agitando cada 10 minutos; transcurrida la incubación, a cada tubo se le adicionó 0.5 ml de TCA 20% y se centrifugaron a 11000 x *g* por 3 minutos. Los sedimentos obtenidos fueron lavados tres veces con 1 ml de etanol-acetato de etilo (1:1) y posteriormente, se disolvieron con 0.6 ml de fosfato de potasio 20 mM (pH 2.3 ajustado con ácido trifluoroacético) y guanidina 6 M. El material insoluble fue eliminado por centrifugación a 11000 x *g* por 3 minutos y el contenido de carbonilos fue determinado en los sobrenadantes a 370 nm usando el coeficiente molar de absorción 22,000 M⁻¹ cm⁻¹ (Levine, *et al.*, 1990).

Terapia hiperbárica y menadione en el desarrollo del AHAEH

5×10^5 *Ehv* fueron incubadas 24 horas en medio TYI-S-33 con 1 mM de menadione (Md-*Ehv*), lavadas 2 veces con PBS e inyectadas en la vena porta de diferentes grupos de hámsters (4/grupo). Algunos grupos recibieron tratamiento con O₂ hiperbárico (HBO) a 2.0 atmósferas absolutas (ATA) por 60 minutos, (en una cámara hiperbárica para animales pequeños REMISA), 30 minutos después de la inyección de los parásitos. La cámara fue presurizada y despresurizada a 0.2 ATA/min. Otro grupo de animales recibió menadione (30 mg/kg) por vía intraperitoneal (Md-tratamiento), 4 horas antes de la inyección con los parásitos y posteriormente cada 12 horas. Los grupos quedaron integrados de la siguiente manera: 1) *Ehv*, 2) *Ehv* + HBO, 3) *Ehv* + Md-tratamiento, 4) *Ehv* + HBO + Md-tratamiento, 5) Md-*Ehv* y 6) Md-*Ehv* + HBO. Un animal de cada grupo fue sacrificado a 6, 24, 72 y 144 horas posteriores a la inyección con los parásitos, sus hígados fueron removidos, pesados y procesados para su análisis histológico. El peso de los hígados de cada grupo fue expresado en promedio \pm DE.

Efecto del NO sobre el desarrollo del AHAEH

1×10^6 trofozoítos de *Ehv* previamente incubados a 36°C por 1 hora con 1 mM de nitroprusiato de sodio (donador de NO, (SNP)), lavados con PBS e incubados 6 horas con TYI-S-33 (viabilidad del 95%) fueron inyectados intraportalmente en dos grupos de hámsters (4/grupo). Cada grupo fue sacrificado por sobredosis de éter a 6 y 24 horas posteriores a la inyección con los parásitos y sus hígados fueron removidos, pesados y procesados para su análisis histológico con tinción de PAS.

Tratamiento con SNP, NaNO₂ y NaNO₃

5x10⁵ *Ehv* fueron incubadas en 1 ml de medio TYI-S-33 en presencia de SNP, NaNO₂ o NaNO₃ a concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 y 5 mM. Estos tubos se incubaron a 36°C por una hora y posteriormente, los parásitos fueron lavados 2 veces con PBS e incubados nuevamente con TYI-S-33. La viabilidad de los parásitos fue determinada cada 6 horas durante 24 horas por exclusión con azul de Trypan.

Ensayos de apoptosis

A) Fragmentación de DNA

La purificación del DNA y el análisis electroforético se realizaron a partir de técnicas convencionales (Sambrook, *et al.*, 1990). 5x10⁶ trofozoítos, de *Ehv* control o tratadas con 1 mM de SNP, lavadas con PBS e incubadas 6 horas con medio TYI-S-33 (con 95% de viabilidad) fueron resuspendidas en 3 ml de solución de buffer de lisis (8 M de Urea, sarkosil 2%, 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA y 0.1 M Tris-HCl pH 7.5) e incubados 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron extracciones con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, y lavados con etanol al 70%. Enseguida los tubos se centrifugaron a 10,000 x g por 10 minutos y se deshidrataron a 50°C. Finalmente, el DNA obtenido se resuspendió en 100 µl de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5 y 1 mM de EDTA). El análisis cualitativo del DNA fue realizado por electroforesis en un gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etídio (0.5 µg/ml) y visualizado con luz ultravioleta.

B) YOPRO-1

Se trataron 2×10^6 de *Ehv* 1 hora con 1mM de SNP, posteriormente fueron lavadas dos veces con PBS y luego incubadas 6 horas con medio TYI-S-33. Tanto las amibas, como las controles (sin tratamiento) se colectaron y se lavaron dos veces con PBS e incubadas con una mezcla de 5 mM de YOPRO-1 y 10 mg/ml de yoduro de propídio (Molecular Probes, Phoenix, US) (Fiers, *et al.*, 1999) durante 30 minutos a temperatura ambiente; 30 μ l de cada muestra se colocaron en un portaobjetos y se observaron mediante microscopia confocal fluorescente. Las imágenes de microscopia fueron obtenidas con un microscopio invertido Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena, Alemania) usando un objetivo de 40X (NA 0.75 Plan Neofluar). Se usó una línea láser He/Ne de 543 nm y 488 nm de un laser de Ar para el yoduro de propídio y el YOPRO-1 respectivamente. Para la detección del yoduro de propídio y el YOPRO-1 se usaron los filtros de emisión BP 565-615 y BP 500-530, respectivamente, usando un factor de acercamiento de 2 en secciones de 1.7 μ m de espesor cada 1 μ m y se realizaron de 7-8 capturas por imagen.

C) TUNEL

La Técnica de TUNEL (Inserción terminal de dUTP mediada por deoxinucleotidiltransferasa) se desarrolló de acuerdo a las recomendaciones del proveedor del sistema (APO-BrdU TUNEL assay kit, Molecular Probes, Phoenix, US). 2×10^6 *Ehv* tratadas con SNP y control fueron fijadas en 5 ml de 1% de paraformaldehído por 15 minutos en hielo, permeabilizadas por 30 minutos con etanol 70 % a 4°C e incubadas toda la noche a temperatura ambiente con 50 μ l de solución marcadora para el DNA. Las muestras fueron

incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente con 100 μ l de la solución del anticuerpo marcado anti-dUTP, y finalmente se adicionaron 500 μ l de yoduro de propídio. Las células apoptóticas fueron observadas bajo microscopia confocal (Cheng, *et al.*, 2004). Las imágenes de microscopia confocal fueron registradas como se mencionó en el párrafo anterior con la excepción que el factor de acercamiento usado fue 1.

Efecto del Z-VAD-FMK y el E-64 sobre la citotoxicidad amibiana causada por el SNP.

5×10^5 trofozoítos de *Ehv* en 1 ml de medio TYI-S-33 fueron cultivados en las siguientes condiciones: a) con 5 μ M Z-VAD-FMK (inhibidor universal de caspasas) (Holzmuller, *et al.*, 2002), b) con E64 (inhibidor de proteasas de cisteína) y c) sin reactivos (cultivo control). Estos cultivos fueron mantenidos por 24 horas a 36°C. Posteriormente, se adicionó 1 mM de SNP a los tres cultivos y se incubaron nuevamente por 24 horas a 36°C. Durante este tiempo cada 6 horas se determinó la viabilidad de los parásitos mediante exclusión con azul de Trypan durante las 24 horas de incubación. En todos los casos, las determinaciones fueron hechas por triplicado

Determinación de la actividad proteolítica en amibas intactas y en lisados amibianos

Para la actividad proteolítica intracelular en amibas intactas se utilizó Arg-Arg-4-methoxy-2-naphthylamida (AMNP). Cuando AMNP es fragmentado por proteasas de cisteína produce un compuesto que al combinarse con 5-nitro-2-salicilaldehído (NSA) forma un aducto insoluble fluorescente. Ambos

compuestos entran libremente a las amibas y en presencia de actividad de proteasas de cisteína se observan múltiples gránulos fluorescentes en el citoplasma (Scholze y Tannich, 1994). Las determinaciones fueron hechas en parásitos sin tratamiento y en parásitos incubados con Z-VAD-FMK o E-64. 0.25×10^6 *Ehv* fueron lavadas dos veces con PBS y el sedimento fue resuspendido en 0.1ml de PBS conteniendo 5 mM de AMNP Y 2.5 Mm de NSA; posteriormente fueron incubadas durante 15 minutos a 36°C. Transcurrida la incubación las amibas fueron observadas bajo el microscopio de fluorescencia (excitación 360-430 nm y emisión 550-600 nm). Además, en las tres condiciones se cuantificó la actividad proteolítica utilizando azocaseína según lo descrito por Pérez-Montfort *et al.*, (1987).

Eritrofagocitosis, resistencia a complemento y actividad proteolítica y hemolítica, en amibas sometidas a especies relacionadas al óxido nítrico.

10×10^6 *Ehv* fueron incubadas por 1 hora a 36°C en medio TYI-S-33 en presencia de 1 mM de SNP, NaNO₂ o NaNO₃ y posteriormente fueron lavadas dos veces con PBS centrifugando a 500 x g por 3 minutos e incubadas 6 horas en TYI-S-33. Después de esta incubación se determinó la eritrofagocitosis, resistencia a complemento y actividad proteolítica y hemolítica, por triplicado en tres experimentos diferentes, utilizando los procedimientos descritos anteriormente.

Determinación de metabolitos

20×10^6 *Ehv* fueron incubadas en medio TYI-S-33 por 6 horas en presencia de 1 mM de SNP, NaNO₂, NaNO₃ o sin reactivo, como control. Los

trofozoítos se centrifugaron a 5000 x g por 3 minutos y se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente, las amibas fueron tratadas con ácido perclórico al 3 % en presencia de 1 mM de EDTA hasta obtener un precipitado blanquecino. Cada muestra fue centrifugada a 12000 x g por 5 minutos, el sobrenadante fue separado y neutralizado con diferentes volúmenes de una solución de KOH 100 mM y Tris 3 M y en seguida fueron congeladas a -70°C. Las determinaciones cuantitativas de los diferentes metabolitos fueron desarrolladas por metodologías de acoplamiento enzimático (Roche, Mannheim, Alemania) utilizando las muestras neutralizadas como sustratos. Las reacciones fueron iniciadas con la enzima específica en cada metabolito y se cuantificó la oxidación de la NADH o la reducción de la NAD(P) a 340 nm (Bergmeyer, 1983).

Análisis estadístico

Para analizar los resultados presentados en la figura 5 se usó la prueba estadística U-Mann Whitney. En las figuras 9, y 11, se utilizó la prueba estadística ANOVA y posthoc de Bonferroni. Para los resultados presentados en las figuras 17 y 18, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para probar hipótesis comparando múltiples grupos. Las pruebas se realizaron con un valor de $p < 0.05$ para la significancia estadística. En todos los casos se utilizó el programa de análisis estadístico SPSS versión 14.0.

RESULTADOS

Eritrofagocitosis, actividad hemolítica y proteolítica, resistencia a complemento, citotoxicidad a polimorfonucleares, sobrevivida amibiana en ciego de ratón, susceptibilidad a NO, H₂O₂ y O₂.

A pesar de que estas funciones amibianas han sido correlacionadas con su virulencia, en este trabajo no se encontraron diferencias entre *Ehv* y *Ehnv*. Sólo se observaron diferencias importantes en la susceptibilidad a H₂O₂ y O₂, como se muestra en la figura 5.

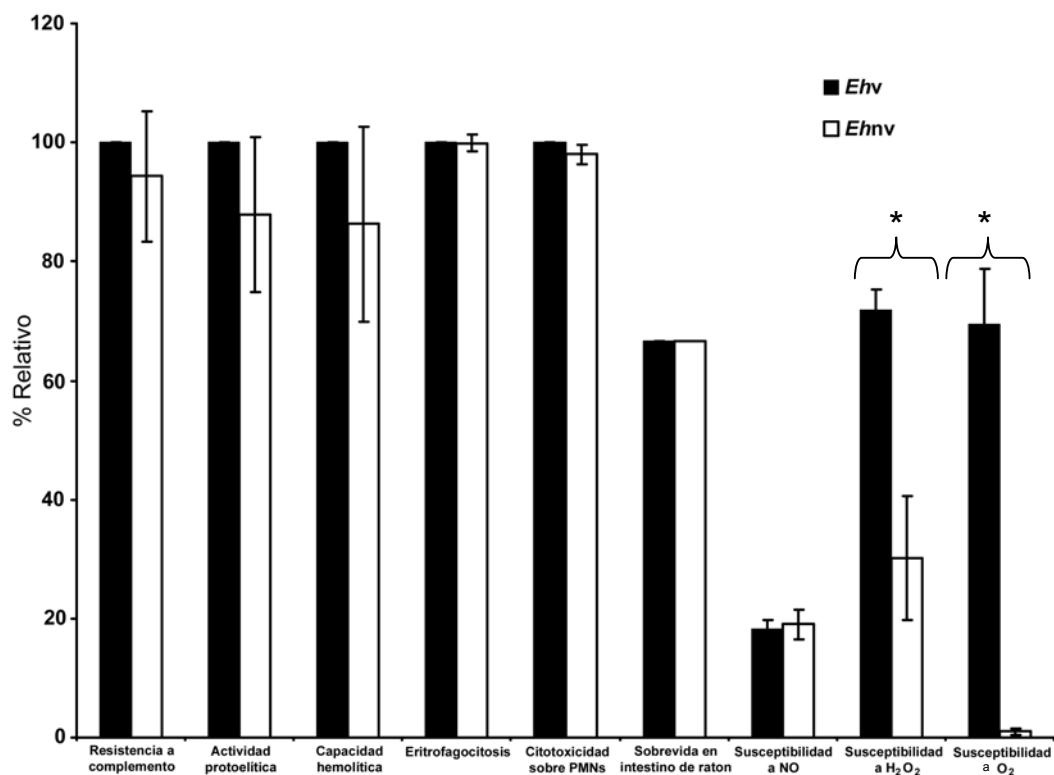


Figura 5. Diferentes propiedades amebianas comparadas entre *Ehv* y *Ehnv*. Sólo la resistencia a H₂O₂ y O₂ correlacionó con el fenotipo virulento. * Diferencias significativas, $p < 0.05$.

Resistencia a O₂

Cuando *Ehv* y *Ehnv* fueron incubadas en medio Hanks saturado con O₂ (0.66 mM), la viabilidad de *Ehnv* disminuyó después de los 30 minutos de

incubación y la muerte fue total después de dos horas. A diferencia de *Eh*nv, *Eh*v mostró una alta resistencia al O₂ y su viabilidad sólo descendió al 65 % después de 2 horas. Por otra parte, el medio Hanks utilizado como control fue ligeramente tóxico para ambos fenotipos amibianos, probablemente por su bajo ambiente redox y/o por la cantidad de aire disuelto en la solución (0.18 mM de O₂) (figura 6).

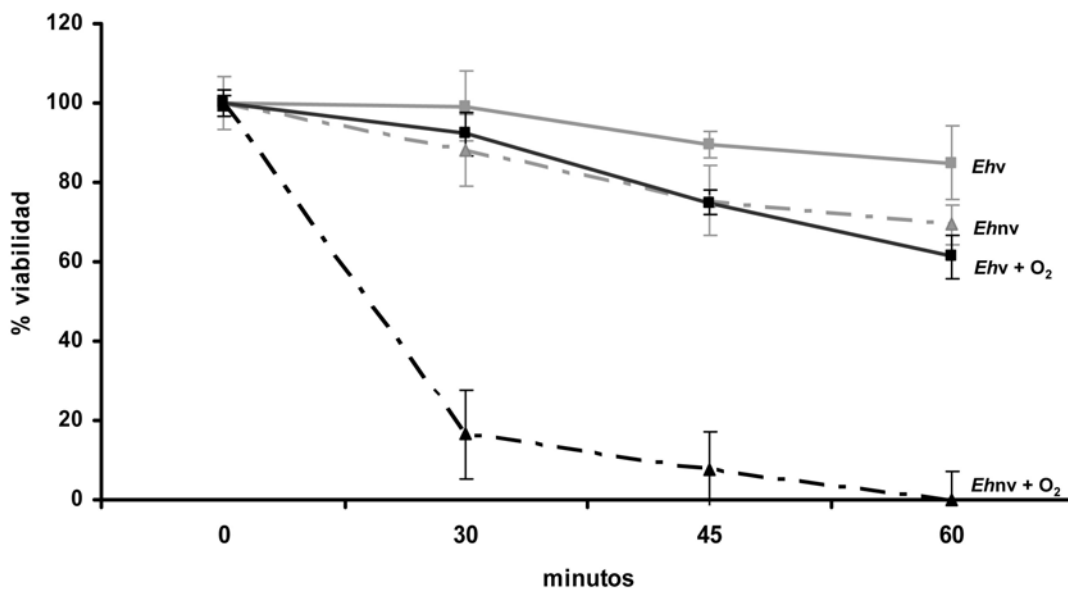


Figura 6. Sobrevida amibiana en medio Hanks normal y saturado con O₂. La viabilidad de *Eh*nv tuvo un descenso súbito después de los 30 minutos de incubación y continuó descendiendo hasta la hora, cuando la muerte fue total en este cultivo.

O₂⁻ y actividad peroxidasa-H₂O₂ en parásitos vivos

Los niveles intracelulares de O₂⁻ (detectados mediante fluorescencia a través de la conversión de dihidroetídio a oxietídio) en *Eh*v y *Eh*nv crecidas en medio TYI-S-33 fueron débilmente perceptibles; sin embargo, cuando este radical se determinó en medio Hanks, la señal aumentó en ambas amibas. Por

otra parte, la incubación en medio Hanks saturado con O_2 dio como resultado un incremento en la señal de O_2^- respecto a *Eh*nv (figura 7).

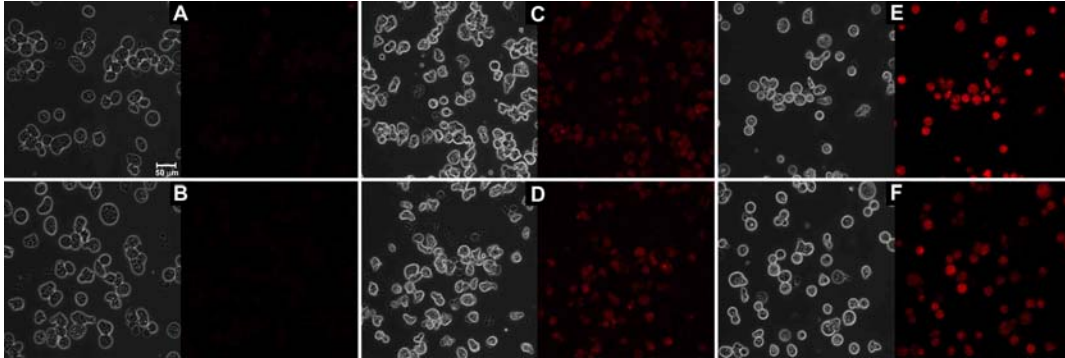


Figura 7. Imágenes de microscopía confocal en las que se muestran los niveles intracelulares de O_2^- (oxietidio), 30 minutos después de la incubación, en las siguientes condiciones: **A)** *Ehv* ó **B)** *Eh*nv en medio TYI-S-33, no muestran señal fluorescente. **C)** *Ehv* y **D)** *Eh*nv en medio Hanks, muestran una intensidad similar en la fluorescencia. Después de la incubación con medio Hanks saturado de O_2 **E)** *Ehv* mostró una señal más intensa que **F)** *Eh*nv. Todas las imágenes se capturaron de secciones ecuatoriales de 4 μ m de grosor. A la izquierda de cada imagen se muestra su fase de contraste.

Al determinar la actividad peroxidasa- H_2O_2 (determinada por la conversión de dihidrorodamina a rodamina), se encontró que después de la incubación con medio Hanks saturado con oxígeno, la señal positiva aumentó considerablemente en *Ehv* comparada con la *Eh*nv (figura 8).

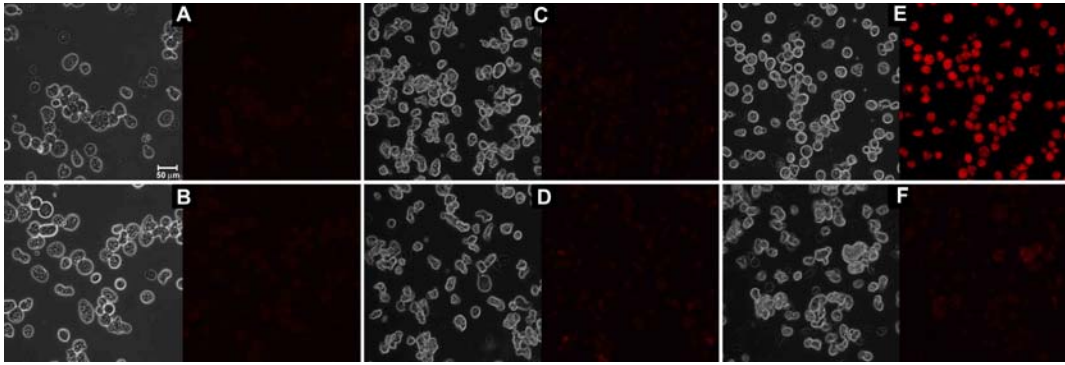


Figura 8. Imágenes de microscopía confocal en las que se muestran los niveles intracelulares de actividad de peroxidasa- H_2O_2 (rodamina), después de 30 minutos de incubación. **A)** *Ehv* ó **B)** *Ehnv* en medio TYI-S-33, no muestran señal fluorescente. **C)** *Ehv* y **D)** *Ehnv* en medio Hanks, muestran una intensidad similar en intensidad de fluorescencia. En la incubación con medio Hanks saturado de O_2 **E)** *Ehv* presentó una fluorescencia más homogénea e intensa comparada con **F)** *Ehnv*. Todas las imágenes se capturaron de secciones ecuatoriales de 4 μm de grosor. A la izquierda de cada una se muestra su fase de contraste.

Atrapadores de ROS en cultivo

Los atrapadores de ROS edaravone (atrapador de $\cdot OH$), EUK-8 (atrapador de $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2) y tempol (atrapador de $O_2^{\cdot -}$) a 10, 50 ó 100 μM fueron letales para *Ehv* después de 24 horas de cultivo. Sin embargo, a bajas concentraciones (1 μM) la viabilidad amibiana fue $90 \pm 1.05 \%$, $71 \pm 5.4 \%$, y $88 \pm 2.0 \%$, respectivamente.

Reactividad del ácido tiobarbitúrico (MDA)

A pesar de que *Ehnv* muere después de 2 horas de incubación en medio Hanks con altas concentraciones de O_2 , en ambos fenotipos amibianos los niveles de TBARS (índice de peroxidación de lípidos) no incrementaron después del tratamiento. Los niveles de TBARS en las amibas sometidas al O_2

fueron muy similares a los producidos en amibas incubadas con medio TYI-S-33 o con medio Hanks sin oxígeno (figura 9-D).

O₂⁻ en lisados amibianos

Para evitar la interferencia de la actividad de la FeSOD amibiana en la acumulación y detección de O₂⁻, este radical fue cuantificado en lisados amibianos en presencia de tiron (un atrapador de Fe, esencial para la actividad de FeSOD). En medio Hanks, cantidades similares de O₂⁻ fueron producidas por *Ehv* y *Ehnv*; mientras que en medio Hanks saturado con O₂, solamente *Ehv* incrementó la producción de O₂⁻ en ~2.7 veces con respecto a *Ehv* con O₂ (figura 9-B).

Actividad tiol-peroxidasa y producción de H₂O₂ en lisados amibianos

En el medio Hanks la actividad de tiol-peroxidasa fue similar en ambos lisados amibianos (*Ehv* y *Ehnv*); mientras que en el medio Hanks saturado con O₂, esta actividad se incremento sólo en los lisados de *Ehv* (7.3 veces) (figura 9-A). Además, el inhibidor de grupos tioles iodoacetamida inhibió la actividad en todas las muestras. Por otra parte, la concentración de H₂O₂ en medio Hanks fue ligeramente más alta en *Ehv* que en *Ehnv* (0.79 veces). Sin embargo, cuando la determinación se realizó con medio Hanks saturado con oxígeno, sólo incrementó la concentración de H₂O₂ en *Ehv* (41%) (figura 9-C). El resultado de estos experimentos fue similar al de las imágenes obtenidas mediante microscopia confocal en parásitos vivos (detección de peroxidasa-H₂O₂) (figura 8E y 8F).

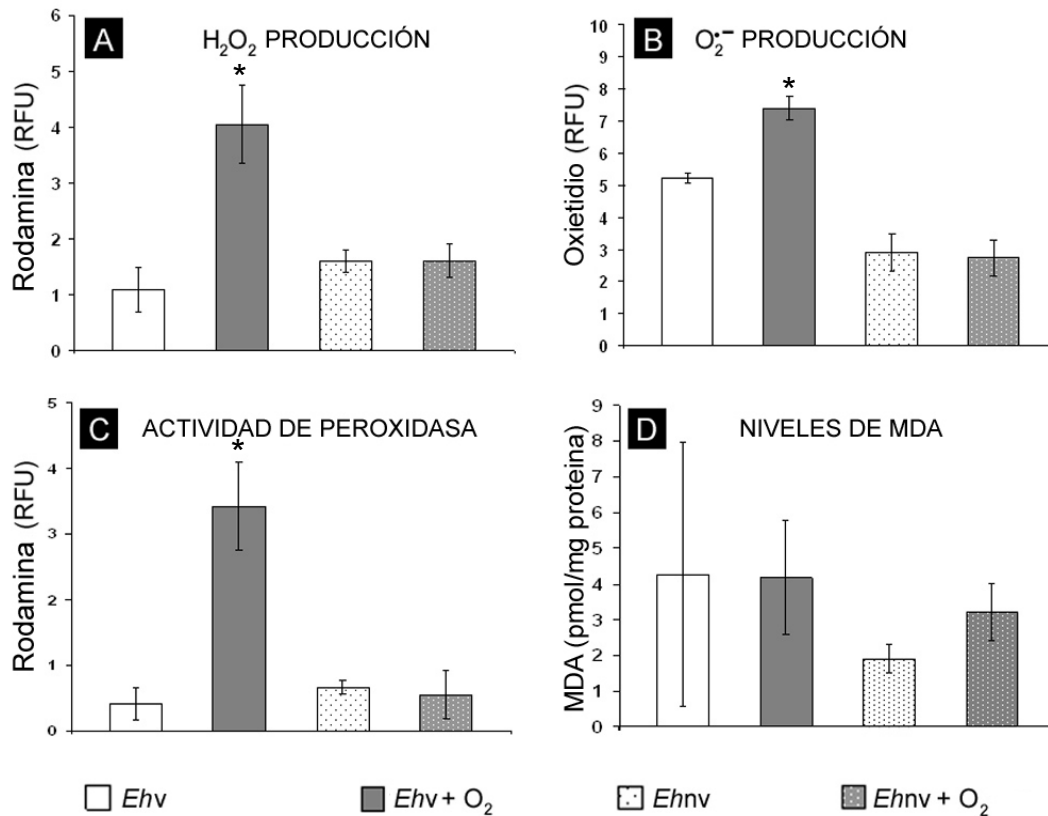


Figura 9. Análisis cuantitativo de la producción de H₂O₂ (DHR+HRP), O₂⁻ (DHE) y de la actividad tiol peroxidasa (DHR) en lisados de *Ehv* y *Ehnv* incubadas 30 minutos en medio Hanks o Hanks saturado con O₂. Los niveles de MDA fueron determinados en los mismos parásitos incubados durante 60 minutos, en las mismas condiciones.* Diferencias significativas, $p < 0.05$.

URF: Unidades relativas de fluorescencia

Metabolitos

Los intermediarios glucolíticos se determinaron en cuatro situaciones experimentales, para encontrar las diferencias metabólicas entre *Ehv* y *Ehnv* en condiciones de saturación con O₂ (figura 8). Al incubar *Ehv* y *Ehnv* con PBS-glucosa, ninguna mostró diferencias en el contenido de glucosa-6-fosfato (G6P), fructosa-6-fosfato (F6P), piruvato (pyr), ATP o producción de etanol. Cuando la determinación de metabolitos se realizó utilizando amibas incubadas

en PBS-glucosa saturado con oxígeno, en ambos fenotipos amibianos se observaron notables incrementos en G6P, F6P y pyr (2.4-6.6 veces), con una ligera tendencia de *Eh_{nv}* a la acumulación de estos tres metabolitos; también en este fenotipo fue notable la reducción del ATP intracelular (29 a 43%) y la producción de etanol. Estos resultados sugieren que probablemente el flujo glucolítico se afectó por: a) el estrés oxidativo, que dañó las enzimas glucolíticas; o b) el O₂ que inhibió directamente el funcionamiento de las proteínas glucolíticas (figura 10).

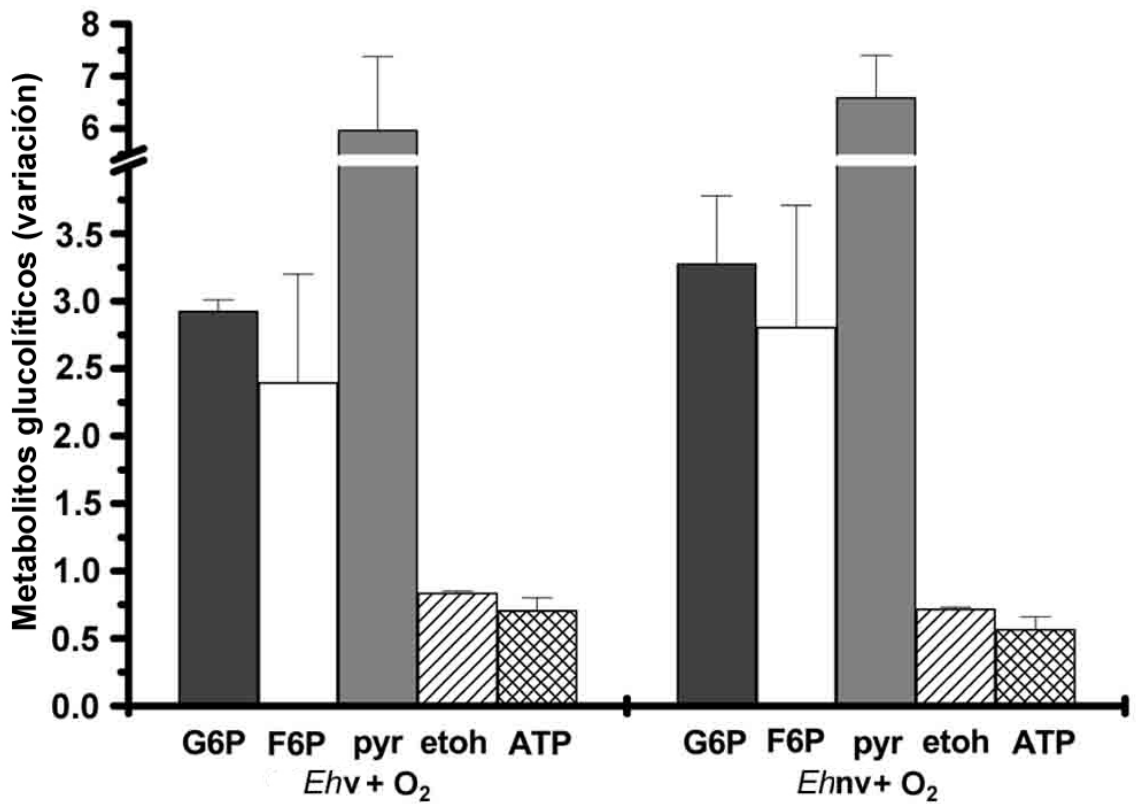


Figura 10. Variaciones en los intermediarios glucolíticos de *Ehv* y *Ehnv*, incubados en PBS saturado con oxígeno, en comparación con *Ehv* y *Ehnv* en PBS sin O₂. En ambas amibas la vía glucolítica fue afectada en la misma proporción; G6P, F6P y pyr se acumularon, mientras el etOH y el ATP disminuyeron. Se muestran los promedios (± DE) de variación.

Actividad de PFOR

La PFOR es una enzima altamente susceptible a la inhibición por oxígeno molecular a través de la oxidación de sus centros de Fe-S. Debido a lo anterior, se decidió evaluar la actividad de PFOR, para explicar la falla en el flujo glucolítico y el cambio en las concentraciones de intermediarios glucolíticos (particularmente la acumulación del piruvato) amibianos incubados con O₂. Como se muestra en la figura 11, en ambos fenotipos amibianos, la PFOR se inactivó en ~ 80-90%, cuando las amibas vivas fueron incubadas en medio saturado con O₂, o cuando los extractos amibianos (sin tratamiento con O₂) fueron expuestos al aire ambiental. Sin embargo, una diferencia importante entre los dos tipos de PFOR es que la inactivación de *Ehv*PFOR fue reversible cuando los extractos fueron incubados en presencia de Fe²⁺ 1 mM bajo condiciones reductoras y anaerobias; por otra parte, la inactivación de *Ehmv*PFOR fue irreversible. El efecto del O₂ sobre la actividad de PFOR fue específico, ya que este tratamiento no afectó las actividades de hexocinasa o 3-fosfofructocinasa (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la *Ehmv*PFOR podría ser dañada por el estrés oxidativo causado por el tratamiento con O₂ molecular.

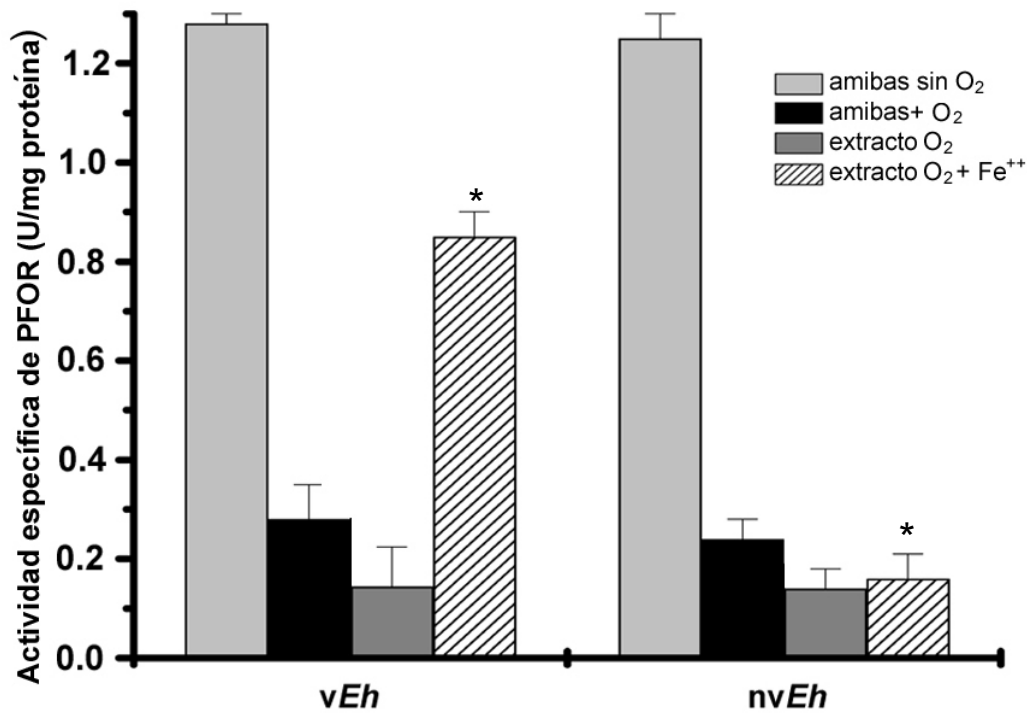


Figura 11. Actividad de PFOR de *Ehv* y *Eh_{nv}* expuestas por 30 minutos a altas concentraciones de O₂. En ambas amibas el tratamiento con O₂ inhibió la actividad de PFOR, aunque esta inhibición fue parcialmente reversible por DTT + Fe²⁺ sólo en *Ehv*. Cuando los extractos amibianos fueron expuestos a las mismas condiciones, los resultados fueron similares. Las barras representan los promedios (± DE) obtenidos de cuatro experimentos independientes utilizando diferentes lotes de amibas. .* Diferencias significativas, p < 0.05, con respecto a la misma condición en el otro fenotipo amibiano.

Oxidación de proteínas y resistencia a H₂O₂

Ehv mostró una viabilidad de $27.8 \pm 6.0\%$ después de haber sido incubada con 2 mM de H₂O₂; mientras la viabilidad de *Eh_{nv}* disminuyó hasta $8.5 \pm 4.9\%$. Por otra parte, *Ehv* presentó un nivel basal más alto de proteínas carboniladas (nmol/mg proteína) que *Eh_{nv}* (6.9 ± 0.5 y 4.6 ± 1 respectivamente). Por otro lado, cuando las amibas fueron expuestas a altas

concentraciones de O₂, los niveles de proteínas carboniladas se elevaron en ambas amibas, siendo mayor en *Eh*nv (*Eh*v 9.5 ± 1.1 y *Eh*nv 12.1 ± 1.2).

Terapia hiperbárica y menadione en el desarrollo del AHAEH

Durante el AHAEH el incremento en el peso de los hígados se correlacionó con el daño tisular. La terapia hiperbárica no modificó el desarrollo del AHAEH, ya que el promedio de peso de los hígados de animales control fue 10.4 ± 0.39 g vs grupo de tratamiento hiperbárico 9.91 ± 1.12 g. Además, en todos ellos el análisis microscópico mostró aspecto muy similar (número de amibas, intensidad del infiltrado inflamatorio y daño al tejido). Por otra parte, en los hámsters infectados con amibas y tratados con menadione no se observó un incremento en el peso de sus hígados (7.35 ± 0.45 g) con respecto a los hígados de los animales sin tratamiento (10.4 ± 0.39 g). El aspecto microscópico fue similar al encontrado con tratamiento anti-inflamatorio, conglomerados de amibas rodeados de pocas células inflamatorias, y con mínima destrucción tisular. Además, la adición del tratamiento hiperbárico disminuyó el peso de los hígados (5.61 ± 1.31 g), y el aspecto microscópico fue similar al grupo tratado sólo con menadione. Por otro lado, el menadione no tuvo efectos tóxicos sobre las amibas cuando fueron incubadas por 24 horas en medio TYI-S-33; no obstante, cuando estas amibas fueron inyectadas por vía intraportal a los hámsters, los parásitos desaparecieron en corto tiempo (3hrs), sin reacción inflamatoria y con un promedio de peso hepático similar al de los animales normales (3.96 ± 0.56 g).

Parásitos tratados con SNP, NaNO₂ y NaNO₃

La incubación de *Ehv* con diferentes concentraciones de SNP y NaNO₂, tuvo un efecto citotóxico dosis dependiente. En el caso de NaNO₃, el efecto citotóxico fue menor a bajas concentraciones, pero fue igualmente letal a altas concentraciones (2-5 mM) (tabla 1). Cultivos de *Ehv* incubados con 1 mM de especies reactivas de nitrógeno mostraron un efecto similar durante las primeras 18 horas; sin embargo, transcurridas 24 horas, sólo el SNP y NaNO₂ causaron la mortalidad del 100% de las amibas, mientras que el nitrato de sodio mantuvo una viabilidad del 40% (figura 12).

Tabla 1. Porcentaje de sobrevivencia de *Ehv* después de 24 horas del tratamiento con diferentes concentraciones de SNP, NaNO₂ y NaNO₃.

Concentración (mM)	SNP	NaNO ₂	NaNO ₃
0.01	100	100	100
0.05	64 ± 8	68 ± 6	100
0.1	51 ± 6.1	75 ± 11	88 ± 9.3
0.5	54 ± 5.2	70 ± 8	92 ± 4.5
1	8.1 ± 6.9	8.3 ± 5.6	44 ± 8.9
2	0	0	0
5	0	0	0

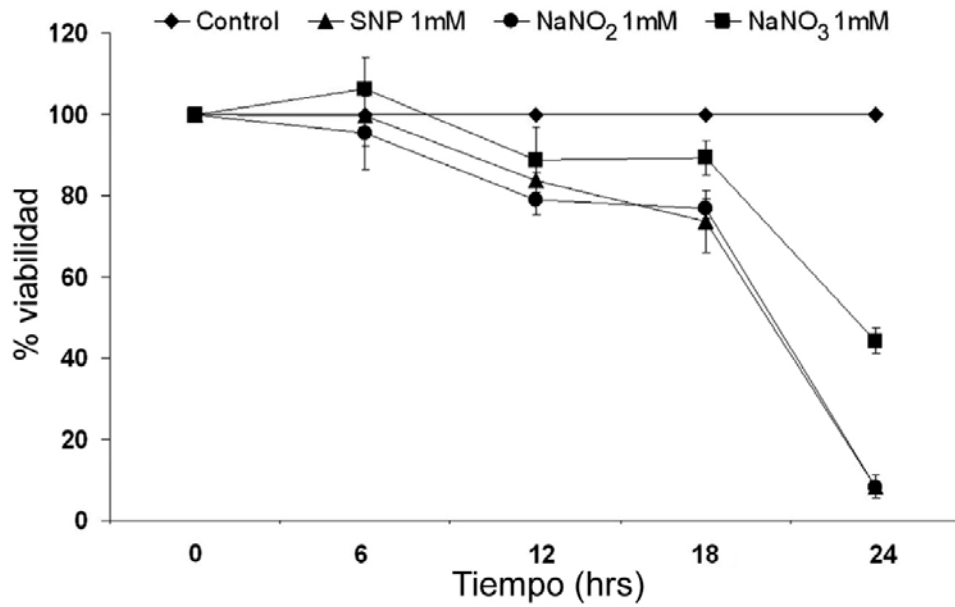


Figura 12. Efecto citotóxico de diferentes especies reactivas de nitrógeno (1 mM) sobre *Ehv.* Todos los compuestos disminuyen parcialmente la viabilidad ambiental a partir de las 12 horas. La incubación con NaNO₃ es menos tóxica que el SNP y el NaNO₂. En la gráfica cada punto representa el promedio y la DE de tres experimentos independientes hechos por duplicado.

Determinación de apoptosis

El análisis electroforético del DNA de amibas tratadas con SNP durante una hora y posteriormente incubadas por 6 horas sólo en medio TYI-S-33, mostró una banda de DNA genómico íntegro y un grupo de bandas pequeñas en forma de escalera, compatibles con la muerte celular programada; mientras estas últimas incrementaron a las 12 horas, el DNA genómico íntegro se degradó en su totalidad. Durante este experimento, en el cultivo control (sin SNP) no se observó DNA fragmentado (figura 13).

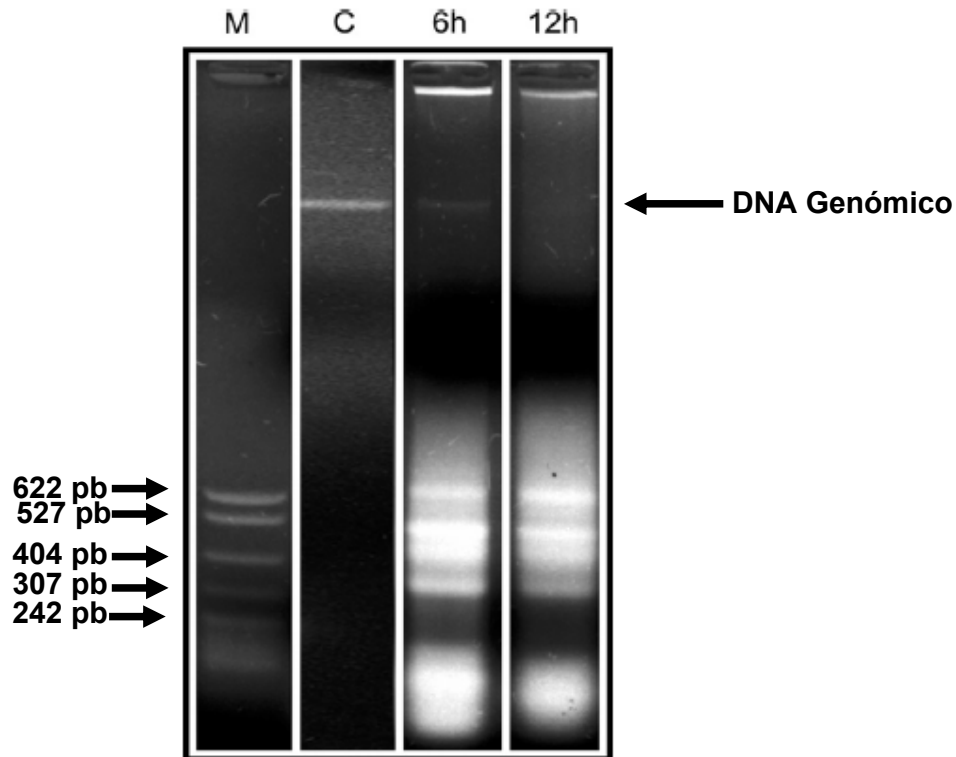


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de DNA amibiano (*Ehv*), obtenido de parásitos tratados una hora con SNP, lavados e incubados a 6 y 12 horas en medio TYI-S-33. M, Marcador de tamaño del DNA (pBR 322 digerido con MspI); C, control de amibas no tratadas; 6h, amibas tratadas con SNP, mostrando DNA genómico y pequeños fragmentos de alrededor de 200pb.; 12h, amibas tratadas con SNP sin DNA genómico.

En la prueba de YOPRO-1 (realizada sobre amibas vivas), 6 horas después del tratamiento con SNP, las amibas mostraron señal positiva a apoptosis (figura 14A, b); dicha señal fue localizada en el núcleo debido a la sobreposición con la señal de yoduro de propídio (figura 14A, d). Por otra parte, en las amibas control no se observó ninguna señal positiva.

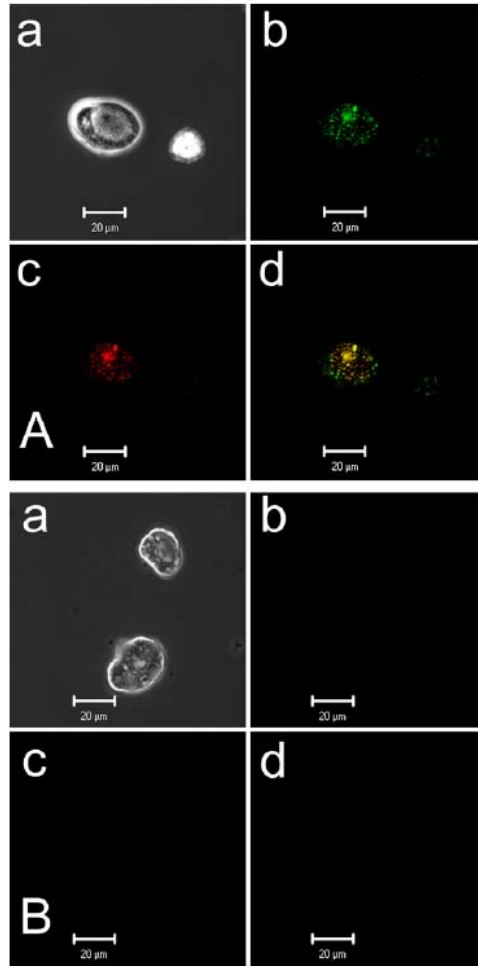


Figura 14. Detección de apoptosis en amibas vivas por la prueba de YOPRO-1. A) Aspecto en contraste de fase de trofozoítos tratados con SNP 1 mM, lavados e incubados 6 horas con medio TYI-S-33 (a) y teñidos con YOPRO-1 (b), mostraron señal positiva. Tinción nuclear con yoduro de propidio (c) y doble tinción mostrando la sobreposición entre la señal positiva a apoptosis (d) y la ubicación del núcleo. B) Amibas control no tratadas (a); sin señal positiva de YOPRO-1 (b), sin tinción de núcleo por yoduro de propidio (c) y sin sobreposición (d). Las imágenes corresponden a la intensidad máxima obtenida de 8 secciones.

Resultados similares fueron observados con la prueba de TUNEL (sobre amibas fijadas y permeabilizadas) (figura 15), en los que las amibas tratadas mostraron señal positiva, mientras que las control fueron uniformemente negativas.

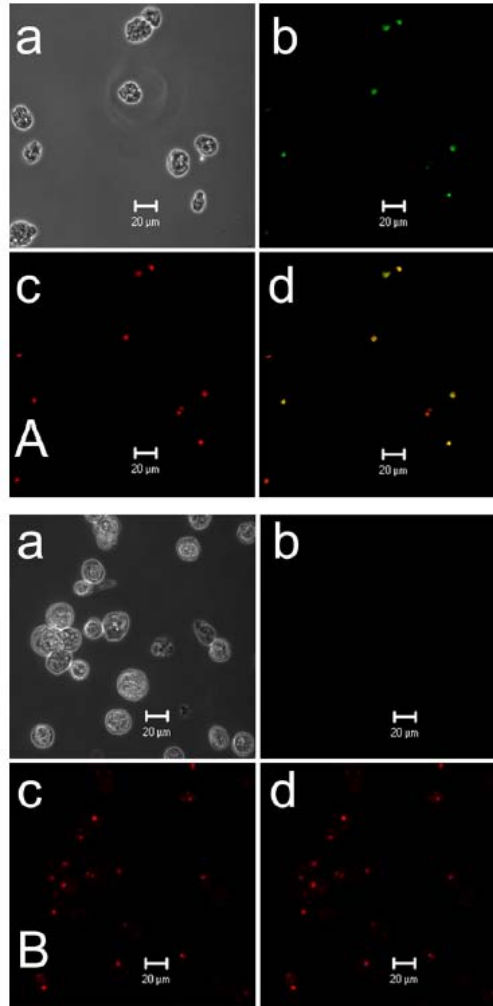


Figura 15. Detección de apoptosis sobre amebas fijadas y permeabilizadas, mediante la prueba de TUNEL y microscopia de fluorescencia. A); aspecto en contraste de fase de trofozoítos tratados con SNP 1 mM (a), lavados e incubados 6 horas en medio TYI-S-33; mostrando señal positiva (b); ubicación de los núcleos por tinción de yoduro de propidio (c) y sobreposición de ambas imágenes positivas (d). B); amebas control sin tratamiento (a), sin mostrar señal positiva (b) posición de los núcleos (c) y en la sobreposición sólo se observa la fluorescencia del núcleo (d).

Efecto del Z-VAD-FMK y E-64 sobre la citotoxicidad del SNP

La incubación de los parásitos con Z-VAD-FMK no modificó el efecto citotóxico del SNP durante 24 horas de incubación; sin embargo, dicho

compuesto causó la inhibición de la actividad intracelular de proteasas de cisteína, de la misma manera que el inhibidor específico de proteasas de cisteína E-64, revelado por la ausencia de cúmulos fluorescentes (figura 16). Además, los resultados de la determinación cuantitativa de la actividad proteolítica en lisados amibianos utilizando la técnica de la azocaseína, mostró una inhibición del 90.7 ± 0.8 y $88.07 \pm 2\%$ usando el Z-VAD-FMK y el E-64 respectivamente.

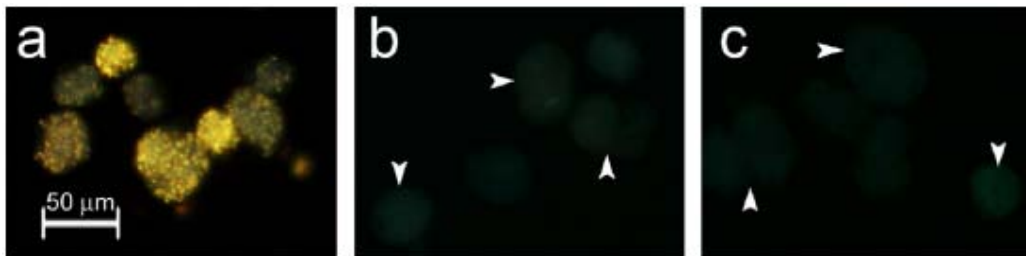


Figura 16. Actividad de proteasas de cisteína en trofozoítos de *Ehv* revelada por la técnica fluorescente de AMNP. (a) amibas control; (b) trofozoítos incubados 24 horas con el inhibidor de apoptosis Z-VAD-FMK; (c) parásitos incubados 24 horas con el inhibidor específico de proteasas de cisteína E-64. Ambos compuestos inhiben casi por completo la actividad de proteasas de cisteína en los trofozoítos.

Eritrofagocitosis, resistencia a complemento y actividad proteolítica y hemolítica.

Las amibas tratadas con SNP, NO₂ o NO₃ durante 1 hora y cultivadas 6 horas con medio TYI-S-33, alteraron algunas de sus funciones de la siguiente manera: 1) En los parásitos tratados con SNP, NO₂ o NO₃ la eritrofagocitosis no fue alterada (aunque la incubación con NaNO₂ disminuyó la eritrofagocitosis esta diferencia no fue estadísticamente significativa); 2) La capacidad hemolítica de los trofozoítos que fueron tratados con SNP y NaNO₂ fue inhibida

casi completamente, aunque en menor medida la incubación con NaNO_3 también tuvo un efecto inhibitor. 3) La actividad proteolítica no fue afectada con ninguno de los tratamientos. 4) Finalmente, la resistencia a complemento disminuyó alrededor de 40% con el tratamiento con NaNO_3 y casi totalmente con el tratamiento de SNP y NaNO_2 (figura 17).

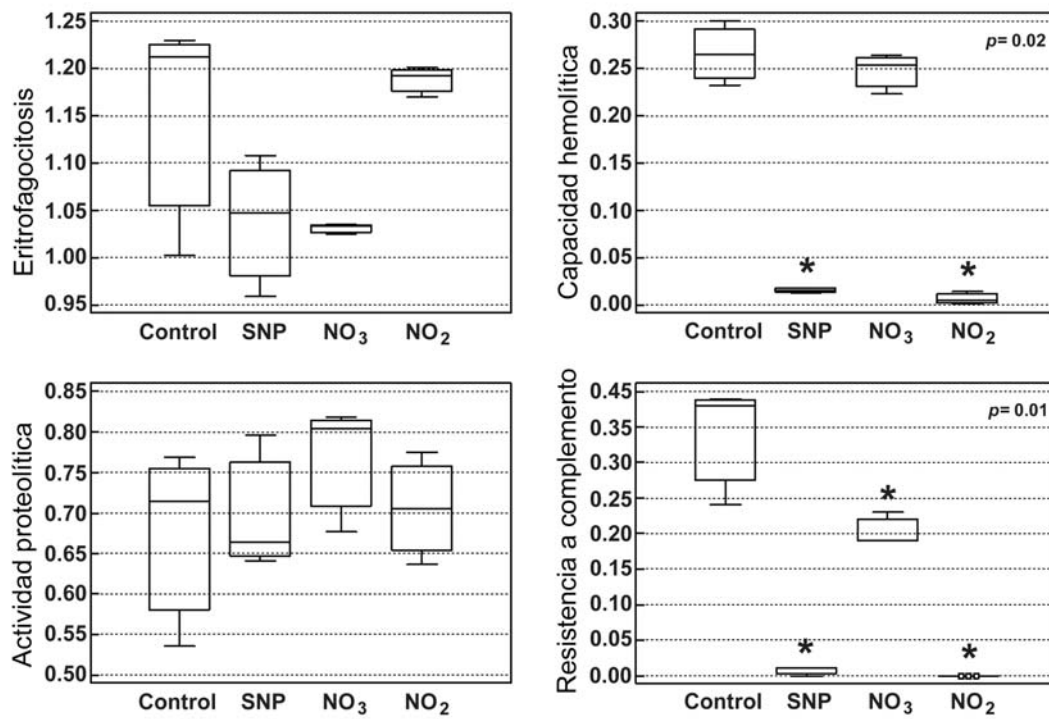


Figura 17. Efecto de las especies derivadas de nitrógeno sobre algunas propiedades *in vitro* de *Ehv*. Sólo la capacidad hemolítica y la resistencia a complemento disminuyeron considerablemente debido a los tratamientos; aunque NaNO_3 tuvo el menor efecto. * Diferencia $p < 0.05$.

SNP en el desarrollo del AHAEH

Las amibas tratadas con SNP fueron más susceptibles a la lisis por complemento *in vitro* y murieron después de las 18 horas de incubación; pero, cuando estas amibas fueron inyectadas a través de la vena porta de los

hámsters, fueron eliminadas del hígado antes de las 6 horas con mínimo o sin infiltrado inflamatorio.

Determinación de metabolitos

Debido a que la apoptosis es un proceso ATP-dependiente, y en *E. histolytica* la glucólisis es la única vía para generar ATP para el trabajo celular, se determinaron los niveles de ATP y dos intermediarios de la glucólisis. Los niveles de ATP y etanol disminuyeron en las muestras tratadas con SNP 1 mM y los de glucosa-6-fosfato (G6P) se acumularon ($p = 0.02$) (figura 18). Además, también se acumularon otros intermediarios como fructosa-6-fosfato (4 veces más con respecto al control) y dihidroxiacetona fosfato (2 veces más), datos no mostrados.

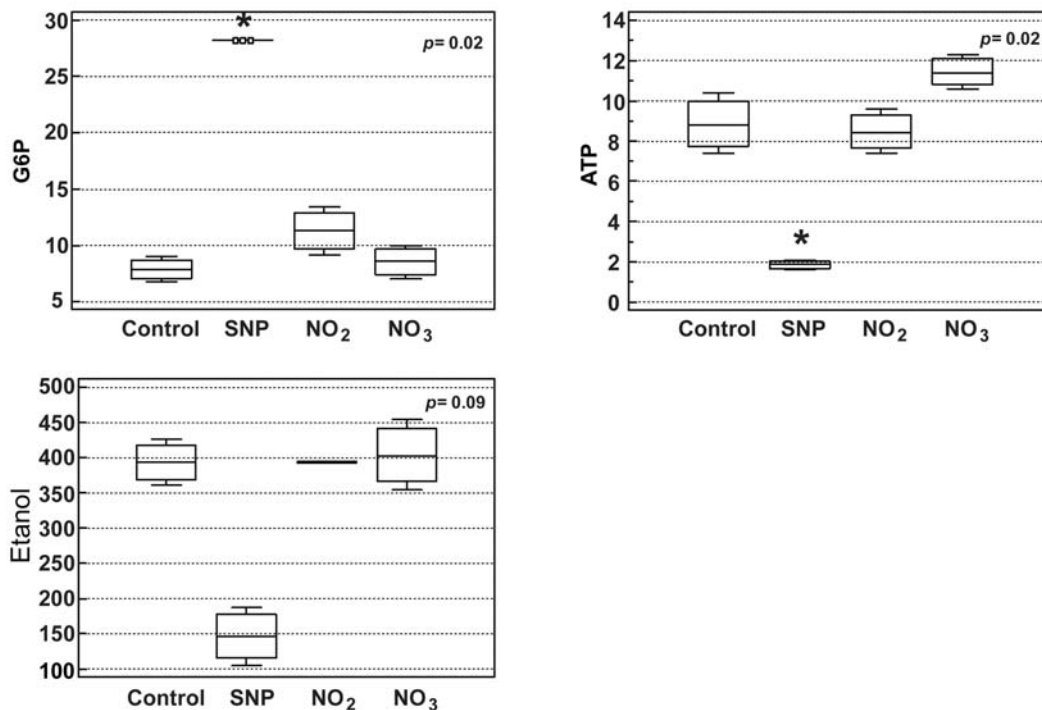


Figura 18. Metabolitos de la vía glucolítica de trofozoítos tratados con especies reactivas de nitrógeno, lavados e incubados con medio TYI-S-33. * Diferencia $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

El absceso hepático amibiano experimental en hámster (AHAEH), es un modelo comúnmente usado para evaluar la virulencia de *E. histolytica*, debido a sus similitudes con la lesión humana, ya que una vez que el parásito infecta el hígado, el daño tisular progresa hasta causar la muerte del hospedero (Tsutsumi y Shibayama, 2006). La amibiasis humana se caracteriza por extensas zonas de necrosis, fenómeno por el cual el parásito recibió su nombre (Brandt y Pérez-Tamayo, 1970). Frecuentemente, la destrucción del tejido se atribuye a componentes moleculares del parásito como amiboporos, proteasas de cisteína, adhesinas, fosfolipasas y colagenasas, conocidos como “factores de virulencia”, aunque los datos que apoyan esta propuesta son indirectos o controversiales (Stanley Jr y Reed, 2001; Pérez-Tamayo *et al.*, 2006; Ackers y Mirelman, 2006; Santi-Rocca, *et al.*, 2008). El papel de tales moléculas como factores de virulencia es cuestionable; pues aunque su inhibición o ausencia interfieren con la capacidad de trofozoítos de *E. histolytica* para causar AHAEH, su capacidad histolítica real no ha sido demostrada *in vivo*. Una explicación alterna para estos resultados podría ser que en ausencia de estas moléculas el parásito fuera incapaz de sobrevivir en las condiciones del hígado. Aunque también se ha mencionado que los “factores de virulencia” se requieren para algunas funciones amibianas *in vitro*, tales como la replicación, resistencia a complemento, citotóxicidad, eritrofagocitosis, actividad proteolítica y hemolítica, etc., en nuestros experimentos no se observó ninguna diferencia entre *Ehv* y *Ehnv*.

Sin embargo, los efectos observados en las amibas incubadas con especies moleculares derivadas del nitrógeno merecen especial atención, pues aunque ambos fenotipos amibianos eran igualmente resistentes a estas moléculas durante tiempos cortos, el efecto letal encontrado fue tardío (entre 18 y 24 horas), lo que sugirió una muerte celular por apoptosis, fenómeno que hasta la fecha no había sido descrito en este protozoario.

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo esencial para preservar la homeostasis en organismos superiores y es inducida en ciertas enfermedades. Recientemente, este proceso ha sido descrito en algunos protozoarios e incluso en bacterias (Häcker, 2000; Kerr, *et al.*, 1972). Los estímulos que inducen la apoptosis pueden ser intra o extracelulares y presentan características específicas intra e inter-especie. En algunos protozoarios este fenómeno ha sido inducido usando agentes químicos como etoposide, estaurosporina, doxorubicina (Chose, *et al.*, 2002) y especies reactivas de nitrógeno (SNP, nitrito de sodio) (Holzmuller *et al.*, 2002). En los experimentos *in vitro* de este trabajo, SNP, nitrito de sodio y nitrato de sodio fueron capaces de inducir apoptosis determinada por tres métodos diferentes en *E. histolytica* después de 1 hora de incubación. El nitrato de sodio, aunque no se considera especie reactiva de nitrógeno, tuvo un efecto tóxico sobre las amibas; este efecto puede explicarse por la actividad de una nitrato reductasa presente en el parásito (Cordova-Pérez *et al.*, 2006), la cual transforma nitratos en nitritos, especie más tóxica. El efecto citotóxico del SNP ha sido ampliamente documentado en diferentes líneas celulares, induciendo necrosis o apoptosis (Blackburn, *et al.*, 1997). Previamente se ha observado el efecto

citotóxico *in vitro* de NaNO₂ y SNP sobre *E. histolytica* (Lin y Chadee, 1992); aunque se sugiere que la toxicidad generada por el SNP es mayor en los hepatocitos que en *E. histolytica* (Kröncke, *et al.*, 1993); no se menciona la posibilidad de que el efecto inducido fuera mediante apoptosis.

En un estudio previo se demostró que la apoptosis en *Leishmania* puede inducirse con 5 mM de NaNO₂ (Holzmuller, *et al.*, 2002). En nuestros experimentos, la apoptosis en *E. histolytica* se indujo con una concentración dos órdenes de magnitud menor (50 µM) de SNP o NaNO₂. La diferencia en el hábitat natural (intra vs extra celular) de cada especie podría explicar la diferencia en concentración de especies reactivas, como ha sido sugerido para el caso de *Leishmania* vs células eucariontes (Holzmuller, *et al.*, 2002). En algunas células de mamífero, el NO induce apoptosis cuando se combina con ROS (Kim, *et al.*, 2005). Es posible que este mismo fenómeno ocurra en *E. histolytica*, ya que se ha demostrado que este protozooario es capaz de producir ROS, además de que se ha sugerido la posibilidad de que también produzca NO (Hernandez-Campos, *et al.*, 2003). En organismos superiores (Idziorek, *et al.*, 1995) y en algunos protozoarios (Watanabe, *et al.*, 2003), la apoptosis se caracteriza por la fragmentación del DNA, con formación de segmentos de bajo tamaño molecular ~200 pb (Perl, *et al.*, 2005; Oberhammer, *et al.*, 1993). Las endonucleasas responsables de los cortes en el DNA podrían tener similitudes, pues los fragmentos observados tienen un tamaño semejante a lo observado en otras líneas celulares, además que la detección de estas secuencias fue positiva usando las pruebas de TUNEL y de YOPRO-1. Por otra parte, se conoce que el NO en altas concentraciones induce apoptosis independiente de

caspasas en células humanas, ya que causa la nitroclilación del DNA (entre T-C), inhibiendo la actividad de las polimerasas (responsables de reparación y síntesis) (Wink *et al.*, 1991; Murphy, 1999) y como consecuencia, se inicia la actividad de las nucleasas dependientes de p53 (Levine, 1997). Es altamente probable que estos fenómenos se presenten en *E. histolytica*, ya que la presencia de p53 ha sido previamente demostrada (Mendoza, *et al.*, 1997; Mendoza, *et al.*, 2003).

En nuestros experimentos el compuesto Z-VAD-FMK, que bloquea la apoptosis dependiente de caspasas y la actividad de proteasas de cisteína en diferentes líneas celulares (Secchiero, *et al.*, 2001) y el E-64, un inhibidor específico de proteasas de cisteína, bloquearon efectivamente toda la actividad de proteasas de cisteína en condiciones *in vivo* (determinada por una técnica fluorescente) y alrededor de 90% en lisados amibianos (utilizando la técnica de la azocaseína); sin embargo, estos mismos tratamientos no inhibieron la inducción de apoptosis por SNP. Estos resultados sugieren que el SNP induce apoptosis en *E. histolytica* usando un mecanismo independiente a caspasas, probablemente usando la vía de la proteína p53 antes mencionada, aunque la presencia de enzimas similares a caspasas pero insensibles a la inhibición por Z-VAD-FMK no puede descartarse.

En los experimentos realizados *in vitro* con las amibas tratadas con las especies reactivas de nitrógeno se observó que algunas de sus funciones, como la eritrofagocitosis y la actividad proteolítica, permanecieron sin alteraciones, mientras la actividad hemolítica y la resistencia a complemento

disminuyeron considerablemente. Estos resultados sugieren que moléculas como las fosfolipasas y los amiboporos podrían estar afectados, ya que éstas son responsables de la lisis de eritrocitos en la amiba en condiciones *in vitro* (Long-Krug, *et al.*, 1985; Leippe, *et al.*, 1994). Por otra parte, se ha descrito que las células eucariontes en apoptosis se eliminan por acción del complemento, ya que se internalizan una serie de moléculas, entre ellas CD46 y CD59, las cuales evaden el ensamble del complejo de ataque del complemento (Cole, *et al.*, 2006). Es posible que la disminución en la resistencia a complemento en amibas tratadas con especies reactivas de nitrógeno se explique por ese mecanismo, pues se conoce la presencia de una secuencia similar a CD59 en *E. histolytica* y se ha relacionado con la resistencia a complemento (Braga, *et al.*, 1992). Es probable que al igual que en células eucariontes, la molécula CD59 amibiana se afecte durante la apoptosis. Las amibas en apoptosis inyectadas en el hígado de hámster desaparecen antes de las 6 horas, lo cual puede explicarse en parte por el incremento en la susceptibilidad al complemento, ya que la mayoría de los parásitos desaparecen, incluso antes de la llegada de los PMNs.

En diferentes líneas celulares, el ATP disminuye durante la apoptosis, debido a que es un sustrato para las enzimas responsables del apoptosoma y participa en la activación de las caspasas. Además, se ha documentado que las proteínas involucradas en los primeros pasos de la apoptosis son proteinasas dependientes de ATP. (Skulachev, 2006). Los bajos niveles de ATP observados durante el proceso de apoptosis sugieren una alta demanda energética similar a la que ocurre en otras células durante apoptosis. Sin

embargo, la disminución del contenido de ATP puede también ser causada por la inhibición en el flujo glucolítico, demostrado por la baja producción de etanol y la acumulación de hexosa y triosa fosfatos. Posiblemente algunas enzimas glucolíticas estén afectadas por el tratamiento con SNP. Sin embargo, el mecanismo completo por el que las especies reactivas de nitrógeno inducen apoptosis en *E. histolytica* no ha sido descrito por completo.

Por otra parte, se ha sugerido que la capacidad redox ambiental podría estar implicada en el fenómeno de la virulencia de *E. histolytica* (Bracha y Mirelman, 1984; Kumar *et al.*, 1992; Mirelman, 1987). Además, a este parásito se le considera un microorganismo micro-aerotolerante ya que crece en ambientes con baja concentración de oxígeno como el intestino grueso humano o el medio de cultivo TYI-S-33 y sólo tolera menos del 5% de oxígeno en su habitat (Band y Cirrito, 1979; Reeves, 1984). Cuando *E. histolytica* invade los tejidos humanos, se enfrenta a un cambio ambiental drástico, dependiendo del tejido, la concentración de oxígeno llega a ser ~0.24 mM (Nöth, *et al.*, 1999) y además se enfrenta a las ROS producidas durante la inflamación; sólo si el parásito es capaz de soportar estas agresiones puede sobrevivir y causar la destrucción ulterior de tejido. Esto sugiere que la resistencia a O₂ y las ROS inflamatorio podrían ser características importantes del fenotipo virulento de *E. histolytica*.

En este trabajo se determinó que la *Eh_{nv}* y la *Eh_v* tienen marcadas diferencia en su viabilidad cuando se exponen a altas concentraciones de O₂ (0.66 mM); siendo la *Eh_{nv}* la más susceptible a este reto (figura 5). Después de

la exposición a altas concentraciones de O_2 , sólo en la *Ehv* se incrementaron los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , mientras que los niveles de MDA no se incrementaron en ninguno de los dos fenotipos amibianos; esto sugiere un mecanismo de citotoxicidad independiente de la oxidación de lípidos (figura 9). El dihidroetidio (no fluorescente) usado en nuestros experimentos es oxidado a oxietidio (fluorescente) en forma específica por el superóxido (Zhao *et al.*, 2003). Por otra parte, aunque ya se ha descrito la presencia de FeSOD en el parásito (Bruchhaus y Tannich, 1994), aún no se ha determinado en forma específica si *E. histolytica* produce $O_2^{\cdot-}$. Para *E. histolytica* la reducción monovalente del O_2 y la reducción de $O_2^{\cdot-}$ por FeSOD no son vías eficientes de desintoxicación, ya que el O_2 es reciclado. Sin embargo, como en otras células aeróbicas, el $O_2^{\cdot-}$ y otras ROS podrían tener una función importante en varias vías de señalización, expresión de genes o proliferación celular (Sauer, *et al.*, 2001). Lo anterior podría explicar porqué en nuestros experimentos, los atrapadores de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $\cdot OH$ tuvieron un efecto citotóxico sobre *Ehv* y *Ehmv* durante el cultivo axénico. Por otra parte, se ha demostrado que la NADPH:flavin oxidoreductasa amibiana (*Ehp* 34) y la tioredoxin reductasa son atraparoras de oxígeno, ya que mediante una reducción divalente producen H_2O_2 , que posteriormente se reduce a H_2O por una peroxirredoxina (*Eh* 29) (Bruchhaus, *et al.*, 1997; Arias, *et al.*, 2008). En este trabajo, la alta producción de H_2O_2 en *Ehv*, posterior a la exposición a O_2 (figura 9), sugiere a la *Ehp* 34 y/o a la tioredoxin como moléculas responsables de la reducción del O_2 intracelular.

Las especies reactivas de oxígeno (O_2^- , $\cdot OH$, y H_2O_2) son necesarias para la sobrevivencia de células aerobias y son bien toleradas en concentraciones bajas; sin embargo, cuando están presentes en cantidades excesivas y no pueden ser neutralizadas, tienen un efecto letal (Kimura, *et al.*, 2005; Halliwell, 2007). Por el contrario, algunas de estas moléculas, incluyendo el O_2 son extremadamente tóxicas para los organismos anaeróbicos (Imlay, 2003); para evadir los efectos tóxicos, las ROS se reducen en forma divalente o tetravalente a agua, y las moléculas antioxidantes se sobre expresan. Frecuentemente, los microorganismos anaerobios expresan enzimas como superóxido reductasa y rubreritina, en lugar de SOD y catalasa, para evadir el reciclaje del oxígeno (Fournier, *et al.*, 2003; Jenney, *et al.*, 1999).

En organismos anaerobios, el principal blanco celular del oxígeno molecular son proteínas que contienen centros Fe-S y funcionan como donadores de electrones, por ejemplo la fumarato reductasa, la aconitasa y la PFOR (Pan e Imlay, 2001). El oxígeno es capaz de inactivar estas enzimas a través del O_2^- ó el H_2O_2 (en el caso de las primeras dos enzimas) o directamente reduciendo el átomo ferroso a su estado ferrico (en el caso de la PFOR) (Imlay, 2006). Por otra parte, se ha observado que la actividad de la PFOR de la bacteria anaerobia estricta *Bacteroides thetaiotaomicron* es inhibida *in vivo* por el oxígeno molecular; sin embargo, dicha actividad se recupera *in vivo* en la ausencia de síntesis de proteína e *in vitro* a través de la incubación con DTT y Fe^{++} (Pan e Imlay, 2001; Kennedy, *et al.*, 1983; Djaman, *et al.*, 2004).

En relación a la PFOR amibiana, se ha visto que en los lisados preparados bajo condiciones aeróbicas dicha actividad se pierde (Reeves, *et al.*, 1977). En nuestros experimentos, en los extractos de *Ehv* y *Ehmv* incubados con O₂ y preparados bajo condiciones anaeróbicas, la actividad de PFOR disminuyó en forma súbita (>80%) en comparación con la actividad mostrada por extractos amibianos no sometidos al tratamiento con O₂ (figura 11). Estos resultados coinciden con la acumulación de los intermediarios glucolíticos previos a la PFOR (G6P, F6P y pyr) y con la disminución en el contenido de etanol y ATP (productos finales de la glucólisis (figura 10). Sin embargo, la principal diferencia entre las enzimas de ambas amibas es que la *Ehmv*PFOR se inactiva en forma irreversible en condiciones *in vivo* e *in vitro*, mientras que la inactivación de la *Ehv*PFOR fue reversible mediante la adición de DTT y Fe⁺⁺. Debido a los altos niveles de proteínas carboniladas observadas en *Ehmv* después de la exposición a altas concentraciones de oxígeno, la inactivación irreversible de la PFOR podría deberse a la oxidación de esta proteína como resultado de la acumulación de H₂O₂ y Fe⁺⁺ procedente de los centros de Fe-S. Por lo anterior, la susceptibilidad de *Ehmv* al O₂ en condiciones *in vitro*, puede atribuirse a la acumulación de O₂ y H₂O₂ causada por la baja tasa de reducción del O₂ y la baja capacidad de desintoxicación del H₂O₂ (figura 9); Dicha acumulación afecta la vía glucolítica amibiana (figura 10) y da lugar a una falla metabólica que causa la muerte del parásito.

A partir de estos hallazgos, se plantea la siguiente pregunta: ¿Podría existir alguna relación entre la resistencia amibiana al O₂ y la capacidad antioxidante *in vitro*, y su virulencia?

Frecuentemente, la virulencia de *E. histolytica* se evalúa por su capacidad para ocasionar el AHAEH. Pocos minutos después de haber inyectado a *Ehv* en la vena porta de los hámsters, los trofozoítos pueden observarse en los sinusoides hepáticos, aún sin presencia de células inflamatorias y en medio del torrente sanguíneo. El ambiente de los sinusoides hepáticos contiene una concentración constante de 23.5 Torr de O₂ (Jiang, *et al.*, 1996) que es tóxico para las amibas. Después de 4 ó 5 horas, las células inflamatorias llegan al hígado (Tsutsumi, *et al.*, 1984) y crean un foco inflamatorio isquémico que permanece hasta la muerte del animal (Pérez-Tamayo, *et al.*, 1992). Por otra parte, se ha observado que cuando se inyectan *Ehv* por la vena porta una alta proporción de ellas muere antes de las 12 horas y los parásitos que permanecen viables son capaces de proliferar y continuar con el desarrollo del AHAEH (Rigothier, *et al.*, 2002). Las células polimorfonucleares (PMNs) han sido sugeridas como las principales causantes de la muerte de los parásitos durante las primeras etapas del AHAEH, ya que detritos de parásitos pueden observarse próximos o dentro de ellas. Sin embargo, la posibilidad de que los parásitos mueran por el efecto del O₂ (sin desintegración) y que los PMNs sólo retiren los restos no puede descartarse. La selección de una población de parásitos resistentes al O₂ durante esta exposición es poco probable, ya que: A) cuando se recuperan del AHAEH 1 semana después y se inyectan una vez más en la vena porta, un porcentaje similar de parásitos desaparece (datos no mostrados) y B) cuando se inyectan menos de 2×10^5 *Ehv* en la vena porta del hámster todas mueren alrededor de las 6 h, con mínimo o ningún infiltrado inflamatorio y sin daño tisular. Por otra parte, se ha observado que en ausencia de células inflamatorias, *Ehv*

desaparece del hígado de hámster antes de las 24 h, y que la ausencia de complemento no modifica este fenómeno (Olivos-García, *et al.*, 2004). Estos resultados, junto a los descritos en este trabajo, sugieren que el O₂ es el principal responsable de la eliminación masiva de *Ehv* durante las etapas iniciales del AHAEH (0-6 horas). Después de este período, la isquemia generada por la inflamación parece ser una condición necesaria para la sobrevida de *Ehv*.

Otro resultado que apoya esta propuesta, es que durante el desarrollo del AHAEH, los focos isquémicos son esenciales para evadir las altas concentraciones de O₂, ya que el tratamiento con O₂ hiperbárico en los animales (que incrementa la concentración del O₂ en los tejidos) (Peloso, 1982) no modificó la inflamación, la isquemia y la sobrevida de las *Ehv*. Por otro lado, el menadione (un productor cíclico de O₂⁻), no fue tóxico para *Ehv* en condiciones de microanaerobiosis *in vitro*; pero cuando se aplicó una concentración subletal de O₂, este compuesto fue altamente tóxico. El mismo resultado se observó cuando *Ehv* preincubada con menadione se inyectó en la vena porta de los hámsters; las amibas desaparecieron antes de las 4 horas en ausencia de reacción inflamatoria. Además, probablemente la microanaerobiosis presente en las zonas isquémicas durante el desarrollo del AHAEH evitó que la administración de altas dosis de menadione afectara a *Ehv*.

Por otra parte, a diferencia de *Ehv* incubada con H₂O₂, *Eh_{nv}* tuvo una baja viabilidad; lo que sugiere una limitada capacidad antioxidante, como lo

observaron previamente Gharidian, *et al.*, (1986). La enzima Eh29 podría tener un papel importante en la capacidad antioxidante, ya que podría abatir los niveles altos de H₂O₂ observados en *Ehv* después de la exposición a altas concentraciones de O₂. También se ha observado que el nivel basal de la expresión de Eh29 es mucho mayor en *Ehv* en comparación con una *Ehmv* cepa Rahman y la especie no patógena *E. dispar* (Choi, *et al.*, 2005; Davis, *et al.*, 2006; MacFarlane, *et al.*, 2006); de igual manera, se ha demostrado la sobre-expresión de esta molécula durante el desarrollo del AHAEH (Santi-Rocca, *et al.*, 2008). Recientemente, se ha demostrado la importancia de la Eh29 en la reducción del H₂O₂ a través de la inhibición de su expresión por RNA antisentido. (Sen, *et al.*, 2007). Sin embargo, es importante el estudio de la participación del resto de los sistemas antioxidantes enzimáticos (SOD, flavoproteínas, rubreritina) o no enzimáticos (triptanotina, cisteína, vitaminas) en la virulencia amibiana.

Nuestros resultados indican que la evasión del óxido nítrico (NO) es una condición necesaria para la virulencia de *E. histolytica* ya que este radical es capaz de eliminarla mediante apoptosis. Por otra parte, la mayor susceptibilidad hacia el oxígeno en *Ehmv* podría deberse a una falla metabólica y no al daño ocasionado por las ROS.

Finalmente, como conclusión podemos sugerir, que la virulencia amibiana en el modelo del AHAEH está asociada a la capacidad de adaptación del parásito a un ambiente alto en sustancias citotóxicas derivadas principalmente del O₂ y nitrógeno.

REFERENCIAS

- Ackers, J.P., Mirelman D., 2006. Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 367-373.
- Akbar, M.A., Chatterjee, S. P., Debnath, A., Pal, A., Bera, T., Das, P., 2004. Genes induce by a high-oxygen environment in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 133, 187-196.
- Andra, J., Berninghausen, O., Wulfken, J., Leippe, M., 1996. Shortened amoebapore analogs with enhanced antibacterial and cytolytic activity. *FEBS letters* 385, 96-100.
- 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 hámsters. *Inf. Immun.* 67, 421-422.
- 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/Gal Nac lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. *Mol. Microbiol.* 33, 327-337.
- Ankri, S., Stolarsky, T., Mirelman, D., 1998. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis, *Mol. Microbiol.* 28, 777-785.
- Arias, D.G., Carranza, P.G., Lujan, H.D., Iglesias, A.A., Guerrero, S.A., Immunolocalization and enzymatic functional characterization of the

thioredoxin system in *Entamoeba histolytica*. Free Radic Biol Med. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.008

- Band, R.N.A., Cirrito, H., 1979. Growth response of axenic *Entamoeba histolytica* to hydrogen, carbon dioxide, and oxygen. J. Protozool. 26, 282-286.
- Bergmeyer, H.U., 1983. Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie, Weinheim.
- Blackburn, R.V., Galoforo, S.S., Berns, C.M., Motwani, N.M., Corry, P.M., Lee, Y.J., 1997. Differential induction of cell death in human glioma cell lines by sodium nitroprusside. Cancer 82, 1137–1145.
- Bracha, R.; Mirelman, D., 1984. Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. J. Exp. Med. 160, 353-368.
- 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. 33, 463-472.
- Bracha, R., Nuchamowitz, Y., Mirelman, D., 2003. Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: Molecular analysis and effect on pathogenicity. Eukariot. Cell. 2, 294-305.
- Braga, L.L., Ninomiya, H., McCoy, J.J., Eacker, S., Wiedmer, T., Pham, C., Wood, S., Peter, T., Sims, J., Petri Jr, W.A., 1992. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Invest. 90, 1131-1137.

- Brandier, C., Boucher, F., Malfroy, B., de Leiris, J., 1997. Vasodilatory effects of a salen-manganese complex with potent oxyradical scavenger activities. *J. Vasc. Res.* 34, 49-57.
- Brandt, H., Pérez-Tamayo, R., 1970. Pathology of human amebiasis. *Hum. Pathol.* 1, 351–385.
- Bruchhaus, I., Roeder, T., Lotter, H., Schwerdtfeger, M., Tannich, E., 2002. Differential gene expression in *Entamoeba histolytica* isolated from amoebic liver abscess. *Mol. Microbiol.* 44, 1063-1072.
- Bruchhaus, I., Tannich, E., 1994. Induction of the iron-containing superoxide dismutase in *Entamoeba histolytica* by a superoxide anion-generating system or by iron chelation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67, 281-288.
- Bruchhaus, I., Jacobs, T., Leippe, M., Tannich, E., 1996. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol. Microbiol.* 22, 2255-263.
- Bruchhaus, I., Richter, S., Tannich, E., 1997. Removal of hydrogen peroxide by the 29 kDa protein of *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* 15, 785-789.
- Bruckner, D.A., 1992. Amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 356-369.
- Casadevall, A., Pirofski, L.A., 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Inf. Immun.* 67, 3703-3713.
- Cheng, B., Rhodus, N.L., Williams, B.A., Grin, R.J., 2004. Detection of apoptotic cells in whole saliva of patients with oral pre-malignant

and malignant lesions: a preliminary study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 97, 465–470.

- Choi, M.H., Sajed, D., Poole, L., Hirata, K., Herdman, S., Torian, B.E., Reed, S.L., 2005. An unusual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack. *Mol. Biochem. Parasitol.* 143, 80-89.
- Chose, O., Sarde, C.O., Noel, C., Gerbod, D., Jiménez, J.C., Brenner, C., Capron, M., Viscogliosi, E., Roseto, A., 2003. Cell death in protists without mitochondria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010, 121-125.
- Cole, D.C., Hughes, T.R., Gasque, P., Morgan, B.P., 2006. Complement regulator loss on apoptotic neuronal cells causes increased complement activation and promotes both phagocytosis and cell lysis. *Mol. Immunol.* 43, 1953-1964.
- Cordova-Pérez, N., Hernandez-Campos, M., Miliar-García, A., Mera-Jimenez, E., Iturbide-Roa, L., Valencia-Hernandez, I., Campos-Rodriguez, R., 2006. Nitrate reductase in *Entamoeba histolytica*. En: *Memorias XV Seminario Sobre Amibiasis*, Oaxaca, México.
- Davis, P.H., Zhang, X., Guo, J., Townsend, R.R., Stanley, S.L. Jr., 2006. Comparative proteomics analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. *Mol. Microbiol.* 61, 1523-1532.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnik, C.C., 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and the other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 431-432.

- Djaman, O., Outten, F.W., Imlay, J.A., 2004. Repair of oxidized iron-sulfur clusters in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 43, 44590-44599.
- El Hafidi, M., Baños, G., 1997. In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension.* 30, 624-628.
- Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A., 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: From molecules to disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 318-331.
- Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., Vandenabeele, P., 1999. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18, 7719–7730.
- Fournier, M., Zhang, Y., Wildschut, J.D., Dolla, A., Voordouw, J.K., Schriemer, D.C., Voordouw, G., 2003. Function of oxygen resistance proteins in the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* hildenborough. *J. Bacteriol.* 185, 71-79.
- Fraga, C.G., Leibovitz, B.E., Tappel, A.L., 1987. Halogenated compounds as inducers of lipid peroxidation in tissue slices. *Free. Radic. Biol. Med.* 3,119-123.
- Gadasi, H., Kessler, E., 1983. Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Inf. Immun.* 39, 528-531.
- Gariboldi, M.B., Rimoldi, V., Supino, R., Favini, E., Monti, E., 2000. The nitroxide tempol induces oxidative stress, p21(WAF1/CIP1), and cell death in HL60 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 633-641.
- Ghadirian, E., Somerfield, S.D., Kongshavn, P.A.L., 1986. Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to oxidants. *Inf. Immun.* 51, 263-267.

- Häcker, G., 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301, 5-17.
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1148-1150.
- Henderson, L.M., Chappell, J.B., 1993. Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur. J. Biochem.* 217, 773-980.
- Hernandez-Campos, M.E., Campos-Rodríguez, R., Tsutsumi, V., Shibayama, M., García-Latorre, E., Castillo-Henkel, C., Valencia-Hernandez, I., 2003. Nitric oxide synthase in *Entamoeba histolytica*: Its effect on rat aortic rings. *Exp. Parasitol.* 104, 87-95.
- Holzmüller, P., Sereno, D., Cavaleyra, M., Mangot, I., Daulouede, S., Vincendeau, P., Lemesre, J.L., 2002. Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Infect. Immun.* 70, 3727-3735.
- Houpt, E.R., Glembocki, D.J., Obrig, T.G., Moskaluk, C.A., Lockhart, L.A., Wright, R.L., Seaner, R.M., Keepers, T.R., Wilkins, T.D., Petri, W.A. Jr., 2002. The mouse model of amoebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4+ T cells. *J. Immunol.* 169, 4496-4503.
- Huston, C.D., Boettner, D.R., Miller-Sims, V., Petri Jr, W.A., 2003. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Inf. Immun.* 71, 964-972.

- Huston, C.D., Haque, R., Petri Jr, W.A., 1999. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. <http://www-ermm-cbcu.cam.ac.uk>
- Idziorek, T., Estaquier, J., De Bels, F., Ameisen, J.C., 1995. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Meth.* 185, 249-258.
- Imlay, J.A., 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395-418.
- Imlay, J.A., 2006. Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol. Microbiol.* 59, 1073-1082.
- Jenney Jr, F. E., Verhagen, F.J.M., Cui, X., Adams, M. W. W., 1999. Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase. *Science* 286, 306-308.
- Jiang, J., Nakashima, T., Liu, K.J., Goda. F., Shima, T., Swartz, H.M., 1996. Measurement of Po_2 in liver using EPR oximetry. *J. Appl. Physiol.* 80, 552-558.
- Kawai, H., Nakai, H., Suga, M., Yuki, S., Watanabe, T., Saito, K.I., 1997. Effects of a novel free radical scavenger, MCI-186, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281, 921-927.
- Keene, W.E., Petitt, M.G., Allen, S., McKerrow, J.H., 1986. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 163, 536-549.
- Keller, F., Walter, C., Löhden, U., Hanke, W., Bakker-Grunwald, T., Trissl, D., 1988. Pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba*: pore formation and hemolytic activity. *J. Protozool.* 35, 359-365.

- Kennedy, M.C., Emptage, M.H., Dreyer, J.L., Beinert, H., 1983. The role of iron in the activation-inactivation of aconitase. *J. Biol. Chem.* 8, 11098-11105.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: A basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26, 239-257.
- Kim, P.K.M., Vallabhaneni, R., Zuckerbraun, B.S., McCloskey, C., Vodovotz, Y., Billiar, T.R., 2005. Hypoxia renders hepatocytes susceptible to cell death by nitric oxide. *Cell. Mol. Biol.* 51, 329-335.
- Kimura, H., Sawada, T., Oshima, T., Kozawa, K., Ishioka, T., Kato, M., 2005. Toxicity and roles of reactive oxygen species. *Curr. Drug Targ. Inflamm. Allergy.* 4, 489-495.
- Kröncke, K.D., Brenner, H.H., Rodríguez, M.L., Etzkorn, K., Noak, E.A., Kolb, H., Kolb-Bachofen., 1993. Pancreatic islet cells are highly susceptible toward de cytotoxic effects of chemically generated nitric oxide. *Biochim. Biophys. ACTA* 1182, 221-229.
- Kumar, S., Tripathi, L.M., Sagar, P., 1992. Oxido-reductive functions of *Entamoeba histolytica* in relation to virulence. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86, 239-248.
- Laushbag, W.B., Hofbauer, A.F., Pittman, F.E., 1985. *Entamoeba histolytica*: purification of cathepsin B. *Exp. Parasitol.* 59, 328-336.
- Leippe, M., Andra, J., Muller-Eberhard, H.J., 1994. Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebopore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 2602–2606.

- Levine, A.J., 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464-478.
- Lin, J.Y., Chadee, K., 1992. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* 148, 3999-4005.
- Long, K., Fischer, K., Hysmith, R.M., Ravdin, J.I., 1985. Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. *J. Infect. Dis.* 152, 536-541.
- MacFarlane, R.C., Singh, U., 2006. Identification of differentially expressed genes in virulent and nonvirulent *Entamoeba* species: potential implications for amoebic pathogenesis. *Infect. Immun.* 74, 340-351.
- Masaki, H., Atsumi, T., Sakurai, H., 1995. Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2, 474-479.
- Mendoza, L., Orozco, E., Rodríguez, M.A., García-Rivera, G., Sánchez, T., García, E., Gariglio, P., 2003. Ehp53, an *Entamoeba histolytica* protein, ancestor of the mammalian tumour suppressor p53. *Microbiol.* 149, 885-893.
- Mendoza, L., Rangel, L.M., García, E., Sánchez, T., Gariglio, P., Orozco, E., 1997. Detection of a human p53-like protein in *E. histolytica*. *Archiv. Med. Res.* 28, S17-S18.

- Mirelman, D., 1987. Ameba-bacterium relationship in amebiasis. *Microbiol. Rev.* 51, 272-284.
- Montfort, I., Perez-Tamayo, R., Gonzalez-Canto, A., Garcia de Leon, M.C., Olivos, A., Tello, E., 1993. Role of cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* on the cytopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes in vitro. *J. Parasitol.* 79, 98-105.
- Murphy, M.P., 1999. Nitric oxide and cell death. *Biochim. Biophys. ACTA* 1411, 401-414.
- Murray, H.W., Aley, S.B., Scott, W.A., 1981. Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to oxygen intermediates. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3, 381-391.
- Nöth, U., Gröhn, P., Jork, A., Zimmermann, U., Haase, A., Lutz, J., 1999. ¹⁹F-MRI in vivo determination of the partial oxygen pressure in perfluorocarbon-loaded alginate capsules implanted into the peritoneal cavity and different tissues. *Magn. Reson. Med.* 42, 1039-1047.
- Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R., Sikorska, M., 1993. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *The EMBO Journal* 12, 3679-3689.
- Olivos, A., Ramos, E., Nequiz, M., Barba, C., Tello, E., Castañón, G., González, A., Martínez, R.D., Montfort, I., Pérez-Tamayo, R., 2005. *Entamoeba histolytica*: Mechanism of decrease virulence of axenic cultures maintained for prolonged periods. *Exp. Parasitol.* 110, 309-312.
- Olivos-García, A., Nequiz-Avendaño, M., Tello, E., Martínez, R.D., Gonzalez-Canto, A., López-Vancell, R., García de León, M.C., Montfort,

- I., Pérez-Tamayo, R., 2004. Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscess in hamsters. *Exp. Mol. Pathol.* 77, 66-71.
- Pan, N., Imlay, J.A., 2001. How does oxygen inhibit central metabolism in the obligate anaerobe *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Mol. Microbiol.* 39, 1562-1571.
 - Peloso, O.A., 1982. HBO treatment of intestinal obstruction and other related conditions. *Hyperbaric Oxygen. Rev.* 3, 103-119.
 - Pérez-Montfort, R., Ostoa-Saloma, P., Velázquez, M.L., Montfort I., Becker, I., 1987. Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 26, 87-98.
 - Pérez-Tamayo, R., Montfort, I., García, A.O., Ramos, E., Ostria, C.B., 2006. Pathogenesis of acute experimental liver amebiasis. *Arch. Med. Res.* 37, 203-209.
 - Pérez-Tamayo, R., 1986. Pathology of amebiasis. *In Amebiasis*, Martínez-Palomo A (ed.). Elsevier, Amsterdam. The Netherlands, 45-49.
 - Pérez-Tamayo, R., Montfort, I., Tello, E., Olivos, A., 1992. Ischemia in experimental acute amebic liver abscess in hamsters. *Int. J. Parasitol.* 22, 125-129.
 - Perl, M.D., Chun-Shiang, C., Ayala, A., 2005. Apoptosis. *Crit. Care Med.* 33, S526-S529.
 - Pillai, D.R., Kobayashi, S., Kain, K.C., 2001. *Entamoeba dispar*: molecular characterization of the galactose/N-acetyl-d-galactosamine lectin. *Exp. Parasitol.* 99, 226-234.

- Reed, S.L., Keene, W.E., McKerrow, J.H., Gigli, I., 1989. Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. J. Immunol. 143, 189-195.
- Reeves, R.E., Warren, L.G., Susskind, B., Lo, H.S., 1977. An energy-conserving pyruvate-to-acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. Pyruvate synthase and a new acetate thiokinase. J. Biol. Chem. 252, 726-731.
- Reeves, R. E., 1984. Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903. Adv. Parasitol. 23, 105-142.
- Rigotherier, M.C., 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. 70, 3208-3215.
- Saavedra, E., Marín-Hernández, A., Encalada, R., Olivos, A., Mendoza-Hernández, G., Moreno-Sánchez, R., 2007. Kinetic modeling can describe in vivo glycolysis in *Entamoeba histolytica*. FEBS J. 18, 4922-4940.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1990. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, second ed. CSH, USA.
- Santi-Rocca, J., Weber, C., Guigon, G., Sismeiro, O., Coppée, J.Y., Guillén, N., 2008. The lysine- and glutamic acid-rich protein KERP1 plays a role in *Entamoeba histolytica* liver abscess pathogenesis. Cell. Microbiol. 10, 202-217.

- Sauer, H., Wartenberg, M., Hescheler, J., 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.* 11, 173-186.
- Scholze, H., Tannich, E., 1994. Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica*. *Methods Enzymol.* 244, 512–523.
- Secchiero, P., Gonelli, A., Celeghini, C., Mirándola, P., Gidotti, L., Visan, G., Capitani, S., Zauli, G., 2001. Activation of the nitric oxide synthase pathway represents a key component of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated cytotoxicity on hematologic malignancies. *Neoplasia.* 98, 2220-2228.
- Sen, A., Chatterjee, N.S., Akbar, M.A., Nandi, N., Das, P., 2007. The 29-kilodalton thiol-dependent peroxidase of *Entamoeba histolytica* is a factor involved in pathogenesis and survival of the parasite during oxidative stress. *Eukaryot. Cell.* 6, 664-667.
- Skulachev, V.P., 2006. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitosis. *Apoptosis* 11, 473-485.
- Stanley Jr, S.L., Zhang, T., Rubin, D., Li, L., 1995. Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Inf. Immun.* 63, 1587-1590.
- Stanley, S.L. Jr., Reed, S.L., 2001. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. VI. *Entamoeba histolytica*: parasite-host interactions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280, 1049-1054.

- Tran, V.Q., Herdman, D.S., Torian, B.E., Reed, S.L., 1998. The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. J. Infect. Dis. 177, 508-511.
- Tsutsumi, V., Mena-López, R., Anaya, V. F., Martínez-Palomo, A., 1984. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. Am. J. Pathol. 117, 81-91.
- Tsutsumi, V., Shibayama, M., 2006. Experimental amebiasis: a selected review of some in vivo models. Arch. Med. Res. 37, 210-220.
- Walker, E.L., Sellards, A. W., 1913. Experimental entamoebic dysentery. Phillipine J. Scien. B. Trop. Med. 8, 253-330.
- Walsh, J.A., 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of the morbidity and mortality. Rev. Inf. Dis. 8, 228-238.
- Watanabe, M., Henmi, K., Ogawa, K., Suzuki, T., 2003. Cadmium-dependent generation of reactive oxygen species and mitochondrial DNA breaks in photosynthetic and non-photosynthetic strains of *Euglena gracilis*. Comp. Biochem. Physiol. 134, 227–234.
- Wink, D.A., Kazimierz, SK., Maragos, C.M., Elespuru, R.K., Misra, M., Dunamus, T.M., Cebula, T.A., Koch, W.H., Andrews, A.W., Allen, J.S., Keefer, L.K., 1991. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. Science 254, 1001-1003.
- World Health Organization, 1997. Amoebiasis Weekly Epidemiologic Record 72, 97-100.
- Zhao, H., Kalivendi, S., Zhang, H., Joseph, J., Nithipatikom, K., Vásquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., 2003. Superoxide reacts with hydroethidine

but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium:
potential implications in intracellular fluorescence detection of
superoxide. Free. Radic. Biol. Med. 34, 1359-1368.

Entamoeba histolytica: Apoptosis induced *in vitro* by nitric oxide species

Espiridión Ramos ^a, Alfonso Olivos-García ^{a,*}, Mario Nequiz ^a, Emma Saavedra ^c,
Eusebio Tello ^a, Andrés Saralegui ^b, Irmgard Montfort ^a, Ruy Pérez Tamayo ^a

^a Departamento de Medicina, Experimental, Facultad de Medicina; Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., CP 04510, Mexico

^b Unidad de Microscopia Confocal, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Mor., CP 62210, Mexico

^c Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México D.F., CP 14080, Mexico

Received 7 July 2006; received in revised form 8 January 2007; accepted 11 January 2007

Available online 26 January 2007

Abstract

Apoptosis has been described in some parasites like *Leishmania*, *Trypanosoma*, and *Trichomonas*. This phenomenon has not been observed yet in *Entamoeba histolytica*. This work analyzed the *in vitro* effect of sodium nitroprusside, sodium nitrite and sodium nitrate (NOs) on *E. histolytica* apoptosis. Parasites incubated for 1 h with NOs revealed apoptosis 6 h later (95% viability), demonstrated by YOPRO-1, TUNEL, DNA fragmentation and low ATP levels. The caspase inhibitor Z-VAD-FMK inhibited total intracellular cysteine protease activity (CPA) but had no effect on apoptosis. When treated with NOs some amebic functions like complement resistance and hemolytic activity decreased but CPA and erythrophagocytosis remained unchanged. After treatment *in vitro* with NOs, parasite death was almost complete at 24 h; but when injected into hamster livers they disappeared in less than 6 h. These results show that apoptosis is induced *in vitro* by NOs in *E. histolytica* and renders them incapable of surviving in hamster's livers.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Index Descriptors and Abbreviations: *Entamoeba histolytica*; Apoptosis; Sodium nitroprusside; Nitrite; Nitrate; Acute experimental amebic liver abscess; Hamster (*Mesocricetus auratus*)

1. Introduction

Entamoeba histolytica is the protozoan responsible for human amebiasis. Although since 1970 the deaths caused by *E. histolytica* have been considerably reduced by the use of metronidazole, currently this parasite is still responsible for approximately 100,000 deaths each year worldwide (WHO, 1997). Recently some cases of resistance against the drug have been reported, making necessary the discovery of new molecular mechanisms specifically lethal for the parasite (Hanna et al., 2000). Apoptosis (programmed cell death) is an active and energy-dependent process with well defined characteristics (unaltered cell membrane permeability, cytoplasmic contraction, chromatin condensation, low ATP levels and DNA fragmentation)

which causes an organized disarticulation of cellular structures (Perl et al., 2005). This mechanism has been preserved during evolution in most animal and plant species, and presents inter- and intra-species variations (Duque-Parra, 2005). Apoptosis has been described in some parasites like *Leishmania* (Holzmuller et al., 2002), *Trypanosoma* (De Souza et al., 2006), and *Giardia* (Chose et al., 2003), with some molecular differences with eukaryotic cells. Currently it is believed that these parasites share some apoptotic routes missing in mammals. It has also been suggested that such differences could become specific therapeutic targets against these parasites (Nguewa et al., 2006). Therefore it seemed convenient to determine if *E. histolytica* presents apoptosis, as well as the molecular mechanisms that trigger the process. The present work shows that sodium nitroprusside (SNP) a nitric oxide (NO) donator, sodium nitrite (NaNO₂) and sodium nitrate (NaNO₃) are all capable of inducing apoptosis in *E. histolytica*.

* Corresponding author. Fax: +52 55 57610249.

E-mail address: olivosa@yahoo.com (A. Olivos-García).

2. Materials and methods

2.1. Parasites

An axenic culture of virulent *E. histolytica* HM1-IMSS was initiated with a density of 7×10^5 trophozoites in 50 ml of TYI-S-33 medium (Diamond et al., 1978) in plastic bottles. After 72 h incubation at 36.5 °C, trophozoites were collected and their viability was determined by Trypan blue exclusion. Parasite virulence was determined by their ability to cause acute liver abscesses in hamsters, usually 4/4 (Olivos et al., 2005).

2.2. Amebic liver abscess in hamsters

Eight male hamsters (*Mesocricetus auratus*) with an average weight of 120 g were lightly anesthetized with sodium phenobarbital (6.3 mg/100 g), the abdominal cavity was entered and 1×10^6 trophozoites suspended in 0.2 ml phosphate-buffered saline, pH 7.2 (PBS) were injected into the portal vein (Pérez-Tamayo et al., 1992). Parallel experiments were performed injecting 1×10^6 trophozoites previously treated for 1 h with SNP 1 mM, washed in PBS and incubated for 6 h with TYI-S-33 medium (95% viability). The animals (four in each group) were sacrificed by ether overdose at 6 and 24 h after parasite injection and their livers removed, weighed and processed for histological examination by PAS staining.

2.3. Parasite treatment with SNP, NaNO₂ and NaNO₃

Five thousand trophozoites were incubated separately in 1 ml of TYI-S-33 medium with SNP (Na₂[Fe(CN)₅NO]), sodium nitrite (NaNO₂) or sodium nitrate (NaNO₃) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) at concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 and 5 mM. Cultures were maintained for 1 h at 36.5 °C, washed twice with PBS and incubated again with TYI-S-33 medium. Parasite viability was determined each 6 h during 24 h by Trypan blue exclusion.

2.4. Apoptosis assays

2.4.1. DNA fragmentation

DNA purification and electrophoresis analysis were performed following standard techniques (Sambrook et al., 1990). Briefly, pellets of 5×10^6 trophozoites, either control or treated for 1 h with SNP 1 mM, washed in PBS and further incubated for 6 h in TYI-S-33 medium (95% viability) were re-suspended in 3 ml of lysis buffer (Urea 8.0 M, Sarkosyl 2%, NaCl 0.15 M, EDTA 0.001 M and Tris–HCl 0.1 M, pH 7.5) and incubated 30 min at room temperature. Extractions with phenol–chloroform–isoamyl alcohol were made twice and then once with chloroform–isoamyl alcohol, and washed with ethanol 70%, centrifuged and dehydrated at 50 °C. The DNA was

suspended in 100 µl of TE buffer (Tris–HCl, 10 mM, pH 7.5 and EDTA, 1 mM). The qualitative analysis of the DNA samples was made by electrophoresis in 1.5% agarose gels using ethidium bromide staining (0.5 µg/ml) and visualized with UV light.

2.4.2. YOPRO-1

Amebic trophozoites (2×10^6 /ml) treated 1 h with SNP 1 mM and incubated for 6 h in TYI-S-33 medium as described above and untreated controls were collected, washed with PBS twice, incubated with a mixture of YOPRO-1 5 mM and propidium iodide (PI) 10 mg/ml (Molecular Probes, Phoenix, US), (Fiers et al., 1999) for 30 min at room temperature and 30 µl of the mixture were put on a slide and observed under confocal fluorescence microscopy. Confocal images were obtained on an inverted Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena, Germany) microscope using a 40× (NA 0.75 Plan Neofluar) objective. Five hundred and forty-three nanometers line of a He/Ne laser and 488 nm of an Ar laser were used for PI and YOPRO-1 excitation, respectively. PI and YOPRO-1 were detected with the emission filters BP 565–615 and BP 500–530, respectively, using a zoom factor of 2. Confocal sections of 1.7 µm thickness were taken every 1 µm, and each stack has 7–8 slices.

2.4.3. TUNEL

The TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling) method was carried out by using the APO-BrdU TUNEL assay kit (Molecular Probes, Phoenix, US) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 2×10^6 control and amebas treated with SNP were fixed in 5 ml of 1% paraformaldehyde for 15 min on ice, permeabilized for 30 min with ethanol 70% on ice and incubated overnight at room temperature in 50 µl DNA-labeling solution. The samples were then incubated for 30 min at room temperature with 100 µl of antibody-staining solution, followed by addition of propidium iodide 500 µl. Apoptotic cells were visualized under confocal fluorescent microscope (Cheng et al., 2004). Confocal images were registered as mentioned above except that zoom 1 was used.

2.5. Effect of Z-VAD-FMK and E-64 on SNP amebic cytotoxicity

Five thousand trophozoites in 1 ml of TYI-S-33 medium were cultured as follows (a) with the caspases inhibitor Z-VAD-FMK 5 µM (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO) (Holzmüller et al., 2002), (b) with the cysteine proteases inhibitor E64 (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO) 20 µM, and (c) without drugs (control). Cultures were maintained for 24 h at 36.5 °C. Afterwards, SNP 1 mM was added to the three cultures and incubated again for 24 h at 36.5 °C. The viability was determined by Trypan blue exclusion each 6 h during the following 24 h. The determinations were made in triplicates.

2.6. Detection of proteolytic activity in intact amebas and amebic lysates

For Intracellular proteolytic activity in intact amebas Arg-Arg-4-methoxy-2-naphthylamide peptide (AMNP), a substrate of CPs that yields a fluorescent insoluble adduct with 5-nitro-2-salicylaldehyde (NSA) after being enzymatically split was used. When added to a culture of amebic trophozoites, AMNP and NSA freely enter their cytoplasm and the presence of CP activity is detected as multiple fluorescent granules (Scholze and Tannich, 1994). The determinations were made in control amebas and in parasites incubated 24 h with Z-VAD-FMK or E-64 as mentioned above. Amebas (0.25×10^6) were washed twice with PBS and the pellet re-suspended in 0.1 ml of PBS containing AMNP 5 mM and NSA 2.5 mM, and incubated for 15 min at 36.5 °C. The observations were made under a fluorescent microscope (excitation 360–430 nm, emission 550–600 nm). Also, the proteolytic activity in the three groups was quantitated in triplicate as described by Pérez-Montfort et al. (1987). Briefly, 5×10^5 trophozoites were lysed by freezing in 0.2 ml of PBS and 0.4 ml azocasein (2.5 mg/ml). The mixture was incubated for 3 h at 36.5 °C and the reaction was stopped with 0.6 ml of 10% cold trichloroacetic acid. The mixture was centrifuged for 5 min at 4500g and absorbance was determined on the supernatant at 366 nm.

2.7. Erythrophagocytosis, complement resistance, proteolytic and hemolytic activities

Entamoeba histolytica ($10 \times 10^6/50$ ml) was incubated for 1 h in TYI-S-33 medium at 36.5 °C, in the presence of either SNP, NaNO₂ or NaNO₃, each 1 mM and then washed twice with PBS and incubated again in the same medium for 6 h. After incubation, erythrophagocytosis, resistance to complement and proteolytic and hemolytic activities were determined by triplicate in three-independent experiments as follows:

- Erythrophagocytosis was evaluated according to Keller et al. (1988). Briefly, 5×10^5 amebas were incubated with 5×10^7 hamster erythrocytes in 1 ml of PBS during 15 min at 36.5 °C. The samples were centrifuged at 500g for 3 min and the pellet recovered, resuspended in 0.4 ml of distilled water followed by 1.0 ml of PBS, centrifuged the same way and clarified with formic acid 0.5 ml, followed by PBS 0.5 ml; finally absorbance was determined at 397 nm.
- Hemolytic activity was measured by incubation of 5×10^5 trophozoites with 500×10^6 hamster erythrocytes in 1 ml of PBS at 36.5 °C during 1 h. The samples were centrifuged for 5 min at 4500g, the supernatant was recovered and absorbance determined at 570 nm, according to Ankri et al. (1998).
- Proteolytic activity in amebic lysates was determined as mentioned above.

- Complement resistance was determined by incubating trophozoites in fresh hamster serum ($5 \times 10^5/ml$) for 2 h at 36.5 °C. Amebic viability was determined by Trypan blue exclusion, according to Olivos-Garcia et al. (2004).

2.8. Metabolites determination

Amebas (20×10^6) were incubated separately in TYI-S-33 medium for 6 h in the presence of 1 mM each of SNP, sodium nitrite and sodium nitrate or without them (control). The cells were collected by centrifugation, washed twice with PBS and re-suspended in 1 ml of PBS. The cells samples were treated with 3% ice-cold perchloric acid in the presence of 1 mM EDTA until a white precipitate was visualized. Each sample was centrifuged at 12,000g for 5 min and the supernatant was separated and neutralized with different volumes of a 100 mM KOH 3 M-Tris solution and stored at –70 °C. Quantitative determinations of metabolites were performed by enzymatic assays with coupling enzymes (Roche, Mannheim, Germany) using standard techniques (Bergmeyer, 1983) and the neutralized samples as substrates. Reactions were started with the specific enzyme for each metabolite and the NADH oxidation or NAD(P)⁺ reduction was monitored at 340 nm.

2.9. Statistical analysis

We used the Kruskal–Wallis procedure for testing hypothesis with multiple group comparisons. We set a two tailed *p* value of <0.05 for statistical significance.

3. Results

3.1. Parasite treatment with SNP, NaNO₂ and NaNO₃

Incubation of amebas with several concentrations of SNP and NaNO₂ resulted in a cytotoxic effect, first observed at 50 μM concentration (but not at 10 μM) and rising proportionally to the increasing concentration of both molecules, up to 100%. In the case of NaNO₃, the cytotoxicity was lower at low concentrations but the effect was equally lethal at higher concentrations (2–5 mM)

Table 1
Amebic survival percentage after 24 h treatment with different concentrations of SNP, NaNO₂ and NaNO₃

Concentration (mM)	SNP	NaNO ₂	NaNO ₃
0.01	100	100	100
0.05	64 ± 8	68 ± 6	100
0.1	51 ± 6.1	75 ± 11	88 ± 9.3
0.5	54 ± 5.2	70 ± 8	92 ± 4.5
1.0	8.1 ± 6.9	8.3 ± 5.6	44 ± 8.9
2.0	0	0	0
5.0	0	0	0

Values shown are from three-independent experiments with duplicates.

(Table 1). Amebic cultures incubated with 1 mM nitrogen species showed similar cytotoxic effect during the first 18 h; however after 24 h, SNP and NaNO_2 caused near 100% loss of viability, whereas with sodium nitrate there was still 40% viability (Fig. 1).

3.2. Apoptosis assays

Electrophoretic DNA analysis of amebas treated for 1 h with SNP, washed and incubated for 6 h on TYI-S-33 medium (95% viability) showed both integral genomic DNA of high molecular size and small fragments, compatible with programmed cell death, which increased after 12 h, in contrast to untreated amebas in which only integral DNA was visualized (Fig. 2). Prior to the 6 h period of incubation of amebas with SNP no DNA fragments were visualized (data not shown). In the YOPRO-1 test (on live amebas), 6 h after 1 h incubation with SNP 1 mM, positive amebas were observed (Fig. 3A; b). The staining was nuclear since it overlapped with propidium iodide staining (Fig. 3A; d). The residual green dots observed in the overlapping were caused by a dominant proportion of green/red signals. In contrast permeability of control amebas was not modified since they did not show positive propidium iodide signal and apoptosis was absent because YOPRO-1 staining was negative (Fig. 3B). The same results were observed with the TUNEL test (on fixed and permeabilized amebas) (Fig. 4A), in which the majority of amebas displayed positive staining, whereas control amebas were uniformly negative (Fig. 4B).

3.3. Effect of Z-VAD-FMK and E-64 on SNP amebic cytotoxicity

Incubation of parasites with Z-VAD-FMK did not modify the cytotoxic effect of SNP during 24 h incubation, but caused almost total intracellular inhibition of amebic cysteine proteinase activity, same as the specific cysteine pro-

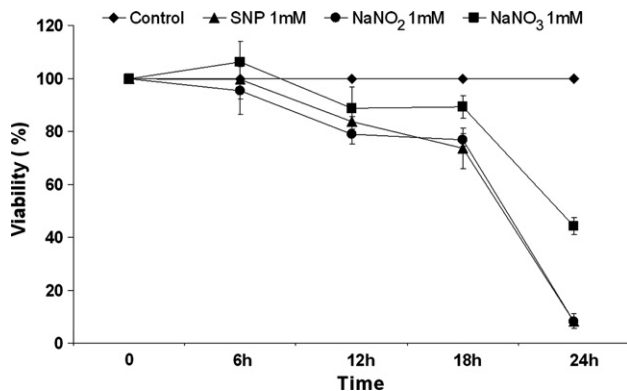


Fig. 1. Amebic cytotoxic effect of different nitrogen species (1 mM) at different time periods. All drugs decreased viability after 6 h and it was almost total at 24 h, with nitrate being relatively less toxic. The lines represent averages and SDs of three-independent experiments with duplicates.

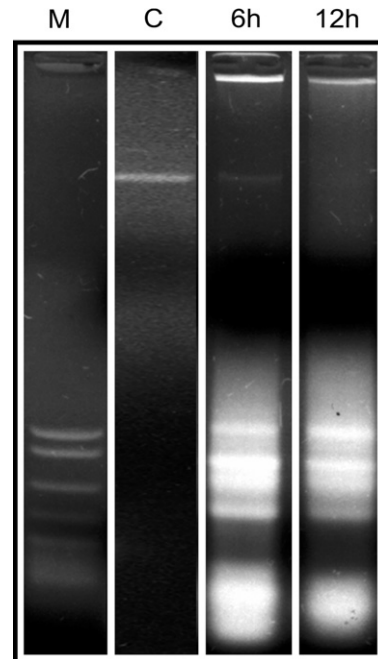


Fig. 2. Agarose electrophoresis of amebic DNA obtained from parasites after 1 h treatment with 1 mM SNP, washed and incubated 6 or 12 h in TYI-S-33 medium. M, DNA marker (pBR 322 digested with MspI); C, control untreated amebas; 6 h, amebas treated with SNP showing genomic DNA and fragments of low molecular size (~200 bp); 12 h, decreased genomic DNA.

teinase inhibitor E-64 after 24 h incubation, revealed by the absence of fluorescent dots (Fig. 5). Also, quantitative results of proteolytic activity in amebic lysates using the azocasein technique, showed inhibition of 90.7 ± 0.8 and $88.07 \pm 2\%$ for Z-VAD-FMK and E-64, respectively.

3.4. Erythrophagocytosis, complement resistance, proteolytic and hemolytic activities

Amebas survived 6 h after 1 h incubation with SNP, NO_2 and NO_3 but some amebic functions were affected as follows: (1) in parasites treated with NaNO_3 , SNP and NaNO_2 erythrophagocytosis was unaffected (although with NaNO_2 there was a minor drop not statistically significant) whereas (2) hemolytic capacity of trophozoites treated with SNP and NaNO_2 showed almost total inhibition ($p = 0.02$), in contrast with parasites treated with NaNO_3 which showed minimal inhibitory effect; (3) amebic proteolytic activity was not modified with all treatments; (4) finally, amebic complement resistance decreased around 40% with NaNO_3 treatment ($p = 0.01$), and it was almost total with SNP and NaNO_2 treatments (Fig. 6).

3.5. Amebic liver abscess in hamsters

Amebas were more susceptible to complement lysis and died after 18 h with SNP treatment in *in vitro* conditions, but when they were injected into the portal vein of ham-

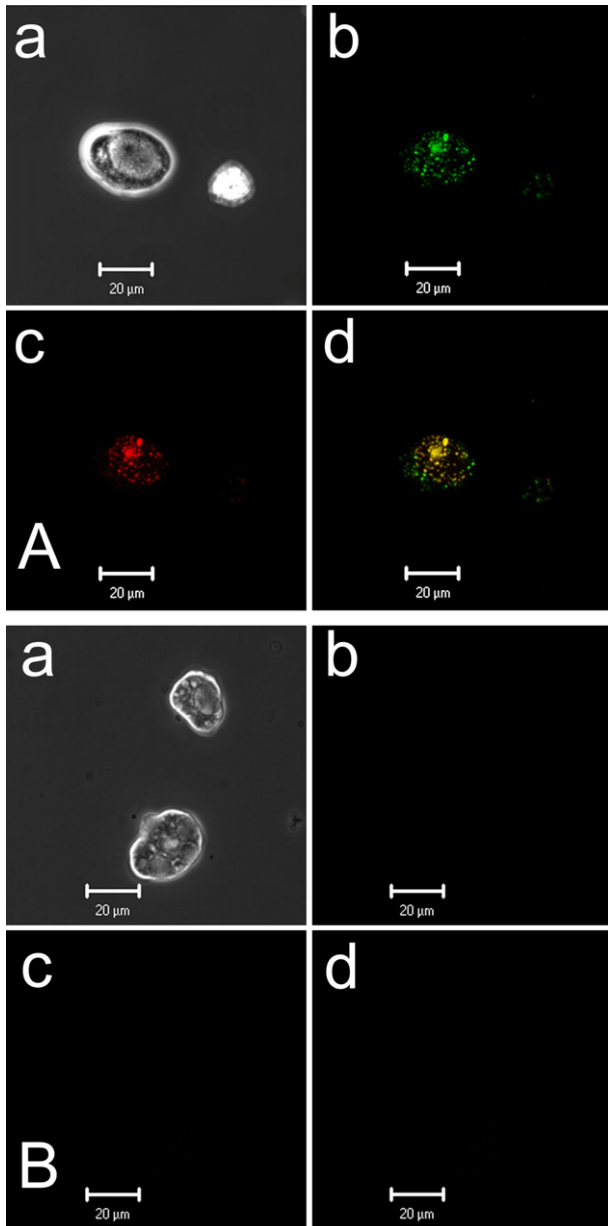


Fig. 3. Apoptosis detection in live amebas with YOPRO-1 stain. (A) Phase contrast aspect of trophozoites treated with SNP 1 mM, washed; (a) incubated 6 h in TYI-S-33 medium and (b) stained with YOPRO-1 show positive staining. (c) Nuclear stain with propidium iodide and (d) double staining showing nuclear overlapping. (B) (a) Untreated control amebas; (b) do not show any YOPRO-1 and (c) propidium iodide staining; d, therefore the double staining is negative. Images (b–d) correspond to maximum intensity projection of eight-slices stacks.

sters, they were eliminated from their livers before 6 h with minimal or no inflammatory infiltration (data not shown).

3.6. Metabolites determination

Since apoptosis is an ATP-dependent process and glycolysis in amebas is the only pathway that generates ATP for cellular work, ATP and glycolytic intermediary levels were determined in trophozoites treated with the three nitrogen species. There was a dramatic decrease

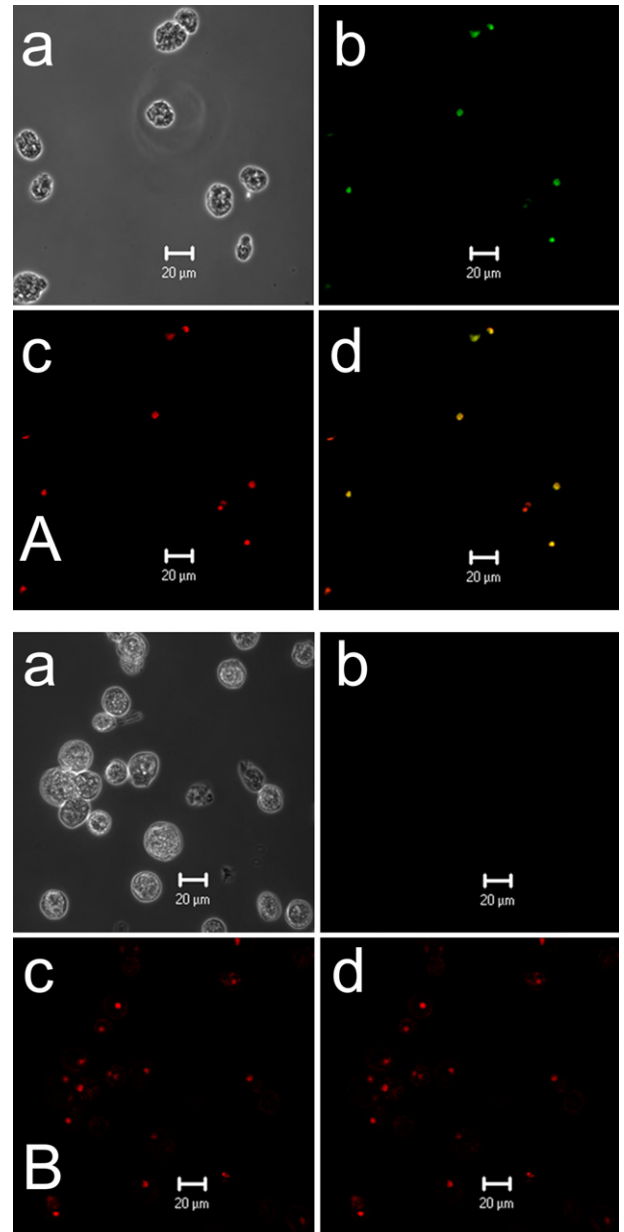


Fig. 4. Apoptosis detection on fixed and permeabilized amebas with TUNEL test by fluorescent microscopy. (A); (a) Phase contrast aspect of trophozoites treated with SNP 1 mM, washed and incubated 6 h in TYI-S-33 medium; (b) show positive staining. (c) Also, nuclei were stained with propidium iodide and (d) both signals overlapped in the majority of cells. (B); (a) Untreated control amebas showing; (b) no positive apoptotic staining; (c) positive nuclear staining; and (d) again only nuclear staining in double staining.

in ATP total levels ($p = 0.02$) and also in ethanol in the sample treated with 1 mM SNP, although the p value for the latter showed only a tendency towards a difference ($p = 0.09$). There was a huge accumulation of glucose-6-phosphate (G6P) in the parasites treated with this compound in comparison with the untreated control ($p = 0.02$) (Fig. 7). In addition, there was also accumulation of other molecules such as fructose-6-phosphate (4-fold F6P) and dihydroxyacetone phosphate (2-fold DHAP) (data not shown).

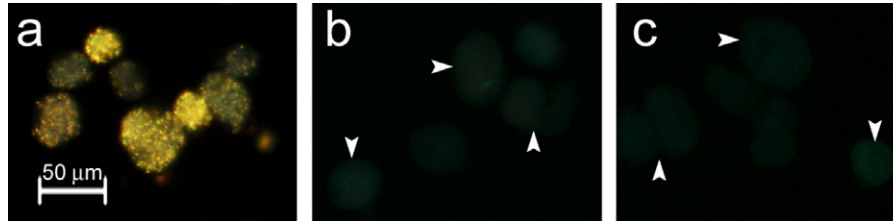


Fig. 5. Intracellular CP activity in trophozoites revealed by fluorescent AMNP technique. (a) control amebas; (b) trophozoites incubated 24 h with apoptosis inhibitor Z-VAD-FMK; (c) parasites incubated 24 h with specific CP inhibitor E-64. Both compounds inhibited almost all CP activity.

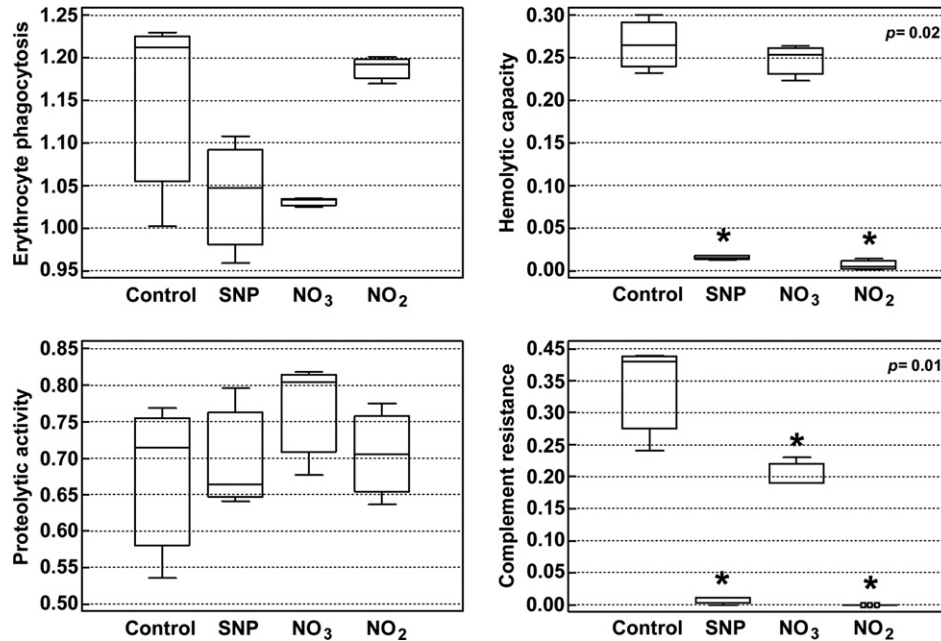


Fig. 6. Box plots figures of the effect of different nitrogen species on some *E. histolytica* functions *in vitro*. Only hemolytic capacity and complement resistance diminished considerably with all treatments, while NaNO₃ had a lower effect. *Different $p < 0.05$.

4. Discussion

Apoptosis is a programmed cell death essential for preserving homeostasis in higher organisms and is present in some diseases; this process has been recently observed in some protozoa and bacteria (Häcker, 2000; Kerr et al., 1972). Stimuli that induce apoptosis are intra- and extra-cellular and because of the differences in such mechanisms they can also be intra- and inter-species specific. Apoptosis in some protozoa has been induced using chemical reagents like etoposide, staurosporine, doxorubicin (Chose et al., 2002) and reactive nitrogen species (SNP, sodium nitrite) (Holzmuller et al., 2002). In our *in vitro* experiments SNP, sodium nitrite and sodium nitrate were capable of inducing apoptosis in *E. histolytica* after 1 h of incubation, as determined by three different methodologies (Figs. 2–4). Also, cytotoxicity on the parasites was greater for SNP and NO₂ but less for NO₃ (Table 1 and Fig. 1). Sodium nitrate is not considered an NO-reactive species but its amebic cytotoxicity could be explained by the presence of nitrate reductase activity in this parasite (Córdova-Pérez et al., 2006) which can transform nitrate to nitrite. The cytotoxic

effect of SNP has been widely documented in other different cell lines inducing either necrosis or apoptosis (Blackburn et al., 1997). It has been reported that NaNO₂ and SNP have an early cytotoxic effect in *E. histolytica* on *in vitro* conditions (Lin and Chadee, 1992); although the toxicity of SNP is greater in hepatocytes than in *E. histolytica* (Kröncke et al., 1993). However, in both previous studies, apoptosis was not determined. Apoptosis in *Leishmania* can be induced with 5 mM NaNO₂ (Holzmuller et al., 2002). In our experiments, apoptosis in *E. histolytica* was induced with concentrations two orders of magnitude lower (50 μM) of SNP or NaNO₂. The different natural habitat (intra- versus extra-cellular) of both parasite species could explain such differences, as suggested for *Leishmania* versus eukaryotic cells (Holzmuller et al., 2002). In some mammalian cells NO induces apoptosis when combined with reactive oxygen species (ROS) (Kim et al., 2005). Possibly the same phenomenon occurs with *E. histolytica* since amebas produce both NO (Hernandez-Campos et al., 2003) and ROS (Weinbach et al., 1980). In higher organisms (Idziorok et al., 1995) and some protozoa (Watanabe et al., 2003), apoptosis is characterized by DNA fragmentation with for-

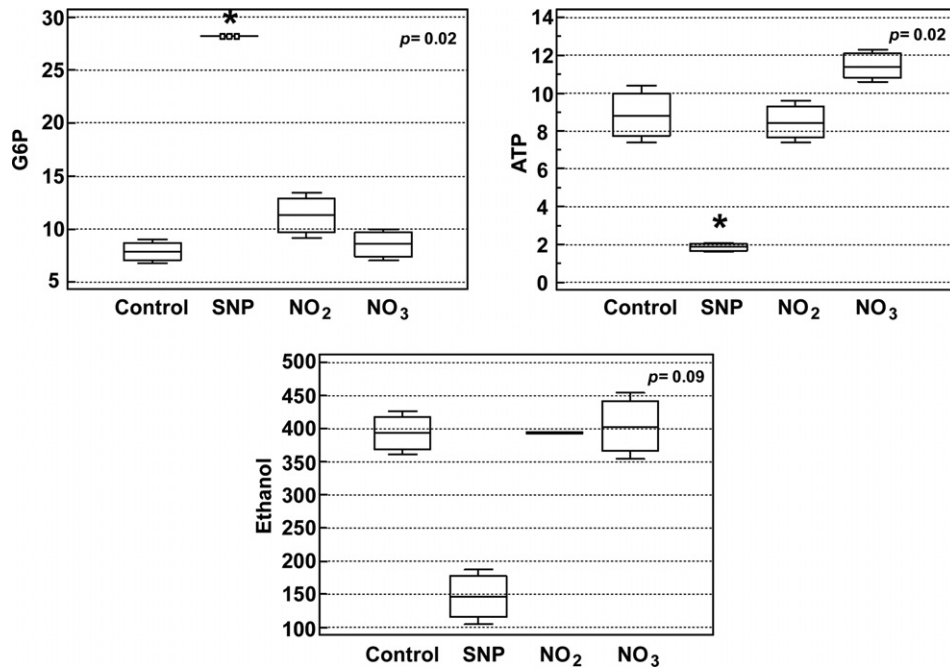


Fig. 7. Box plots figures of the various metabolites in trophozoites treated with different nitrogen species washed and incubated 6 h in TYI-S-33 without drugs. With SNP treatment, ATP and ethanol levels decreased whereas G6P increased. In contrast, NaNO₂ and NaNO₃ treatments caused minimal or no metabolite changes. *Different $p < 0.05$.

mation of fragments of molecular size ~ 200 bp (Perl et al., 2005; Oberhammer et al., 1993). Similarities between the endonucleases responsible for this fragmentation in *E. histolytica* could exist since fragments of similar size were observed (Fig. 2) and detection of the resulting sequences was positive using YOPRO-1 and TUNEL assays (Figs. 3 and 4). It is known that NO in high concentrations induces caspase-independent apoptosis in human cells, since it causes nitration of DNA (T-C), it inhibits polymerase activities (reparation and synthesis) (Wink et al., 1991; Murphy, 1999) and, as a consequence, it induces p53-dependent endonuclease activities (Levine, 1997). It has been shown that a p53-like protein is present in *E. histolytica* (Mendoza et al., 1997; Mendoza et al., 2003).

In our experiments the compounds Z-VAD-FMK (which blocks caspase-dependent apoptosis and cysteine proteinase activity in several cell types) (Secchiero et al., 2001), and E-64 (a specific cysteine proteases inhibitor), effectively blocked almost total amebic cysteine proteinase activity at the same rate (Fig. 5), but both failed to inhibit amebic apoptosis induced by SNP. These results suggest that SNP induces apoptosis in *E. histolytica* through a caspase-independent mechanism, probably using the p53-like protein, although the presence of caspase-like enzymes insensitive to Z-VAD-FMK inhibition cannot be discarded.

In the *in vitro* experiments with NO-species treatment, amebic cellular functions such as erythrophagocytosis and proteolytic activity remained almost unaltered, whereas hemolytic activity and complement resistance were almost totally inhibited by SNP and NO₂, and at a lesser rate by NO₃ (Fig. 6). These results suggest that molecules such as phospholipases and amebopores could be affected

since they are responsible for amebic erythrocyte lysis *in vitro* (Long-Krug et al., 1985; Leippe et al., 1994). It has been described that some eukaryotic cells in apoptosis are lysed by complement, since they lose CD46 and CD59 molecules which block the ensemble of the membrane attack complex of complement (Cole et al., 2006). A sequence similar to CD59 is present on the surface of *E. histolytica* which participates in complement resistance (Braga et al., 1992). Probably such molecule was affected in *E. histolytica* during apoptosis. Amebas treated with SNP died after 18 h in *in vitro* conditions but when they were injected into the portal vein of hamsters' livers they disappeared before 6 h, which could be explained at least in part by the increment in amebic complement susceptibility, since most of the parasites disappeared before the arrival of PMNs.

In different cell types, ATP diminishes during apoptosis because it is a substrate of enzymes responsible for apoptosome formation and it also participates during caspases activation. In addition, it is well known that proteins involved in the first steps of apoptosis are ATP-dependent protein-kinases (Skulachev, 2006). The lower levels of ATP observed in *E. histolytica* during the process of apoptosis induced by SNP suggest a high energetic demand of ATP, similar to what happens in other cells during apoptosis. However, the drop in ATP levels could also result from inhibition of the glycolytic flux, demonstrated by the lower ethanol production as well as a huge accumulation of hexose and triose phosphates (Fig. 7). Possibly some glycolytic enzymes could be affected by SNP treatment but not by NO₂ nor NO₃ treatment. The mechanism of apoptosis induced by NO species in *E. histolytica* is yet to be disclosed.

Acknowledgments

This work was supported by DGAPA Grants IN-205407 and 241402. We received statistical support from Dr. Jorge Rojas-Serrano and excellent technical help from Pedro Balderas, Luis H. Anaya and Marco Gudiño as well as the professional animal care of Ricardo Vargas and Daniel Sánchez. This work includes part of the doctoral dissertation of E.R.

References

- Ankri, S., Stolarsky, T., Mirelman, D., 1998. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Molecular Microbiology* 28, 777–785.
- Bergmeyer, H.U., 1983. *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Blackburn, R.V., Galoforo, S.S., Berns, C.M., Motwani, N.M., Corry, P.M., Lee, Y.J., 1997. Differential induction of cell death in human glioma cell lines by sodium nitroprusside. *Cancer* 82, 1137–1145.
- Braga, L.L., Ninomiya, H., McCoy, J.J., Eacker, S., Wiedmer, T., Pham, C., Wood, S., Peter, T., Sims, J., Petri Jr., W.A., 1992. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Clinical Investigation* 90, 1131–1137.
- Cheng, B., Rhodus, N.L., Williams, B.A., Griffin, R.J., 2004. Detection of apoptotic cells in whole saliva of patients with oral pre-malignant and malignant lesions: a preliminary study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 97, 465–470.
- Chose, O., Noe, C., Gerbod, D., Brenner, C., Viscogliosi, E., Roseto, A., 2002. A form of cell death with some features resembling apoptosis in the amitochondrial unicellular organism *Trichomonas vaginalis*. *Experimental Cell Research* 276, 32–39.
- Chose, O., Sarde, C.O., Noel, C., Gerbod, D., Jiménez, J.C., Brenner, C., Capron, M., Viscogliosi, E., Roseto, A., 2003. Cell death in protists without mitochondria. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1010, 121–125.
- Cole, D.C., Hughes, T.R., Gasque, P., Morgan, B.P., 2006. Complement regulator loss on apoptotic neuronal cells causes increased complement activation and promotes both phagocytosis and cell lysis. *Molecular Immunology* 43, 1953–1964.
- Córdova-Pérez, N., Hernandez-Campos, M., Miliar-García, A., Mera-Jimenez, E., Iturbide-Roa, L., Valencia-Hernandez, I., Campos-Rodríguez, R., 2006. Nitrate reductase in *Entamoeba histolytica*. In: *Memories XV Seminario Sobre Amibiasis*, Oaxaca, México.
- De Souza, E.M., Menna-Barreto, R., Arau, T.C., Kumar, A., Hu, Q., 2006. Antiparasitic activity of aromatic diamidines is related to apoptosis-like death in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 1, 1–5.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnick, C.C., 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72, 431–432.
- Duque-Parra, J.E., 2005. Note on origin and history of the term “apoptosis”. *The Anatomical Record* 283, 2–4.
- Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., Vandenabeele, P., 1999. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18, 7719–7730.
- Häcker, G., 2000. The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research* 301, 5–17.
- Hanna, R.M., Dahniya, M.H., Badr, S.S., El-Betagy, A., 2000. Percutaneous catheter drainage in drug-resistant amoebic liver abscess. *Tropical Medicine and International Health* 5, 578–581.
- Hernandez-Campos, M.E., Campos-Rodríguez, R., Tsutsumi, V., Shibayama, M., García-Latorre, E., Castillo-Henkel, C., Valencia-Hernandez, 2003. Nitric oxide synthase in *Entamoeba histolytica*: its effect on rat aortic rings. *Experimental Parasitology* 104, 87–95.
- Holzmueller, P., Sereno, D., Cavaleyra, M., Mangot, I., Daulouede, S., Vincendeau, P., Lemesre, J.L., 2002. Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Infection and Immunity* 70, 3727–3735.
- Idziorek, T., Estaquier, J., De Bels, F., Ameisen, J.C., 1995. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *Journal of Immunological Methods* 185, 249–258.
- Keller, F., Walter, C., Löhden, U., Hanke, W., Bakker-Grunwald, T., Trissl, D., 1988. Pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba*: pore formation and hemolytic activity. *Journal Protozoology* 35, 359–365.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: A basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239–257.
- Kim, P.K.M., Vallabhaneni, R., Zuckerbraun, B.S., McCloskey, C., Vodovotz, Y., Billiar, T.R., 2005. Hypoxia renders hepatocytes susceptible to cell death by nitric oxide. *Cellular and Molecular Biology* 51, 329–335.
- Kröncke, K.D., Brenner, H.H., Rodríguez, M.L., Eitzkorn, K., Noak, E.A., Kolb, H., Kolb-Bachofen, V., 1993. Pancreatic islet cells are highly susceptible toward de cytotoxic effects of chemically generated nitric oxide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1182, 221–229.
- Leippe, M., Andra, J., Muller-Eberhard, H.J., 1994. Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebopore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 2602–2606.
- Levine, A.J., 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331.
- Lin, J.Y., Chadee, K., 1992. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *The Journal of Immunology* 148, 3999–4005.
- Long-Krug, S.A., Fisher, K.J., Hygmith, R.M., Ravdin, J.I., 1985. Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. *Journal of Infectious Diseases* 152, 536–541.
- Mendoza, L., Rangel, L.M., García, E., Sánchez, T., Gariglio, P., Orozco, E., 1997. Detection of a human p53-like protein in *E. histolytica*. *Archives of Medical Research* 28, S17–S18.
- Mendoza, L., Orozco, E., Rodríguez, M.A., García-Rivera, G., Sánchez, T., García, E., Gariglio, P., 2003. Ehp53, an *Entamoeba histolytica* protein, ancestor of the mammalian tumour suppressor p53. *Microbiology* 149, 885–893.
- Murphy, M.P., 1999. Nitric oxide and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411, 401–414.
- Nguewa, P.A., Fuertes, M.A., Valladares, B., Alonso, C., Pérez, J.M., 2006. Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness?. *Trends in Parasitology* 8, 376–380.
- Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R., Sikorska, M., 1993. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *The EMBO Journal* 12, 3679–3689.
- Olivos-García, A., Tello, E., Nequiz-Avendaño, M., González-Canto, A., López-Vancell, R., García de León, M.C., Montfort, I., Pérez-Tamayo, R., 2004. Cysteine proteinase activity is required for survival of the parasite in experimental acute amoebic liver abscesses in hamsters. *Parasitology* 129, 19–25.
- Olivos, A., Ramos, E., Nequiz, M., Barba, C., Tello, E., Castañón, G., González, A., Martínez, R.D., Montfort, I., Pérez-Tamayo, R., 2005. *Entamoeba histolytica*: mechanism of decrease virulence of axenic cultures maintained for prolonged periods. *Experimental Parasitology* 110, 309–312.
- Pérez-Montfort, R., Ostoa-Saloma, P., Velázquez, M.L., Montfort, I., Becker, I., 1987. Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 26, 87–98.

- Pérez-Tamayo, R., Montfort, I., Tello, E., Olivos, A., 1992. Ischemia in experimental acute amebic liver abscess in hamsters. *International Journal for Parasitology* 22, 125–129.
- Perl, M.D., Chun-Shiang, C., Ayala, A., 2005. Apoptosis. *Critical Care Medicine* 33, S526–S529.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1990. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, second ed. CSH, USA.
- Scholze, H., Tannich, E., 1994. Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica*. *Methods in Enzymology* 244, 512–523.
- Secchiero, P., Gonelli, A., Celeghini, C., Mirándola, P., Gidotti, L., Visan, G., Capitani, S., Zauli, G., 2001. Activation of the nitric oxide synthase pathway represents a key component of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated cytotoxicity on hematologic malignancies. *Neoplasia* 98, 2220–2228.
- Skulachev, V.P., 2006. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitosis. *Apoptosis* 11, 473–485.
- Watanabe, M., Henmi, K., Ogawa, K., Suzuki, T., 2003. Cadmium-dependent generation of reactive oxygen species and mitochondrial DNA breaks in photosynthetic and non-photosynthetic strains of *Euglena gracilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 134, 227–234.
- Weinbach, E.C., Takeuchi, T., Clagget, C.E., Inohue, F., Kon, H., Diamond, L.S., 1980. Role of iron-sulfur proteins in the electron transport system of *Entamoeba histolytica*. *Archivos de Investigación Médica* 11, 75–80.
- Wink, D.A., Kazimierz, S.K., Maragos, C.M., Elespuru, R.K., Misra, M., Dunamus, T.M., Cebula, T.A., Koch, W.H., Andrews, A.W., Allen, J.S., Keefer, L.K., 1991. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254, 1001–1003.
- World Health Organization, 1997. Amoebiasis. *Weekly Epidemiologic Record* 72, 97–100.