



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Determinación del efecto amebicida de Lactoferricina-b,
Lactoferricina 17-30 y Lactoferrampina 265-284 en la
variante virulenta de *Entamoeba histolytica*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ITZEL LEYVA MEJIA



DIRECTOR DE TESIS:

Dr. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.,

2017



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.

Agradecimientos.

Agradezco a mi majestuosa universidad UNAM, por la gran oportunidad al integrarme a su comunidad de estudiantes en la Facultad de Ciencias y formarme como una profesionista para desarrollar todo el conocimiento con el que me forjaron mis profesores.

A mi tutor el Dr. Julio César Carrero Sánchez por brindarme un espacio para desarrollar este proyecto en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, por su enseñanza, apoyo, paciencia, consejos y amistad. Muchas gracias.

A los investigadores que me apoyaron en el proceso de mi proyecto, como el Dr. Juan Pedro Laclette, Dr. Raúl Bobes, Dra. Norma Moreno, M. en C. Tania Porras y a mis compañeros de Laboratorio.

Al programa Papiit No. IN206316, CONACyT CB-2011-167788, “Nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades infecciosas, NUATEI”.

Dedicatorias.

Dedico estas paginas a mi hermana y siempre compañera de vida Surasim Carina, a mi ejemplo como la mejor mujer, mi amada mamá Carmen y a mi guía y sostén en la vida mi amado papá Armando. Gracias por su apoyo, comprensión y aliento en todo momento.

También a mis padrinos Jeanette y Alejandro que siempre me han acompañado, mi querida tía Rosario, Cristina y Bertha, a mis tíos Apolinar y César, y a mis primas Anai, Carla, Rosario, Cinthia e Ingrid quienes me apoyaron y siempre se alegraron de mis logros, con amor para ustedes.

Principalmente a todas las personas que me brindaron su tiempo, ayuda y consejos. A todos sin excepción y con cariño muchas gracias!

ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1 Amibiasis.....	3
1.2 <i>Entamoeba histolytica</i>	5
1.3 Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i>	9
1.4 Fármacos anti-amibianos la resistencia y toxicidad.....	10
1.5 Inmunidad Innata del hospedero en la amibiasis.....	14
1.6 Lactoferrina.....	16
1.7 Lactoferricina.....	19
1.8 Lactoferrampina.....	22
1.9 Justificación.....	25
2. Hipótesis.....	26
3. Objetivo General.....	26
3.1 Objetivos Particulares.....	26
4. Materiales y Métodos.....	27
4.1 Mantenimiento de la cepa virulenta de <i>E. histolytica</i>	27
4.2 Conteo de trofozoítos.....	28
4.3 Ensayos del efecto de los péptidos sobre trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	29
4.4 Microscopía confocal.....	30
4.5 Microscopía electrónica de transmisión.....	31
4.6 Ensayo de Apoptosis.....	32
5. Resultados.....	33

5.1 Resultados con Lactoferricina-b.	33
5.2 Resultados con Lactoferricina 17-30.	33
5.3 Resultados con Lactoferrampina.	35
5.4 Resultados con Microscopía confocal.....	36
5.5 Resultados con Microscopía de Transmisión.	40
5.6 Resultados con Ensayo de Apoptosis.	45
6. Discusión y Conclusión.	49
Abreviaturas.	52
Apéndice.	54
Bibliografía.	56

RESUMEN

La amibiasis es una enfermedad causada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica* que reside en el colon humano, que en ocasiones migra a otros órganos, por ejemplo el hígado causando absceso hepático. Esta infección afecta más comúnmente a individuos de regiones en vía de desarrollo en América Latina, África y Asia. La OMS reporta anualmente 500 millones de individuos infectados en el mundo, lo que equivale a entre un 10 y 20 % de la población total, de los cuales se estima una mortalidad aproximada de 100.000 individuos anualmente. En México a partir del año 2014 hasta la actualidad el absceso hepático es la causa número uno de muerte por parasitosis y la amibiasis intestinal ocupa el quinto lugar de morbilidad en enfermedades parasitarias. Actualmente el tratamiento es la administración de metronidazol, lo que resulta agresivo y tóxico para el organismo, además de que existen reportes que sugieren la existencia de cepas resistentes. Una alternativa a esto es la identificación de sustancias con potencial amebicida no tóxicas, como los péptidos antimicrobianos derivados de lactoferrina. En este trabajo se evaluó la capacidad amebicida y el mecanismo de acción *in vitro* de los péptidos lactoferricina 17-30, lactoferricina b y lactoferrampina 265-284 sobre una variante virulenta de *E. histolytica*. Los resultados demostraron una potente actividad amebicida de los 3 péptidos desde tiempos muy tempranos (a partir de los 5 minutos) a bajas concentraciones (desde 5 μ M). Sin embargo, el péptido lactoferrampina mostró mayor efecto amebicida cuando se comparó con los otros dos. Cuando se evaluó el mecanismo de muerte inducido por los péptidos en la amiba, se observó que los dos péptidos lactoferricina b y 17-30 mataron a los trofozoítos virulentos principalmente por apoptosis, en un 85-90 % mientras que lactoferrampina lo hizo por apoptosis/necrosis (12 %) en la concentración más alta utilizada. Los tres péptidos causaron daño en la morfología del parásito en la mayoría de estos, alterando principalmente el endoplasma de los trofozoítos virulentos. Descartando una de las posibles vías de entrada de los péptidos al trofozoíto virulento. Los resultados

demuestran que estos péptidos son altamente amebicidas a bajas concentraciones en tiempos tempranos, tomando en cuenta que se ha descrito que son de uso seguro en mamíferos y forman parte de la dieta diaria de las personas al ser ingeridos en productos lácteos de origen natural. Éstos podrían ser propuestos como un tratamiento alternativo contra la amibiasis o en combinación con el metronidazol para disminuir la dosis empleada y por ende su toxicidad.

1. INTRODUCCION

1.1 Amibiasis

La amibiasis es causada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica* que reside en el colon humano. En ocasiones el trofozoíto invade el tejido lo que conduce a la amebiasis intestinal, con daño en epitelio intestinal, o extra-intestinal llegando al hígado y en contadas ocasiones a pulmón y cerebro. Es una enfermedad cosmopolita y es la tercera causa de muerte por un protozoo (Thibeaux *et al.*, 2013).

Esta ameba patógena es transmitida por fecalismo y afecta más comúnmente a individuos de regiones en vía de desarrollo en América Latina, África y Asia, donde el riesgo de fecalismo es elevado (Olivera, 2014). La amibiasis puede presentar varias formas clínicas, asintomáticas, intestinales y extra-intestinales. La amibiasis intestinal puede ser aguda como el caso de colitis amibiana fulminante o crónica, como la amibiasis apendicular y ameboma. Por su parte la amibiasis extra-intestinal puede ser hepática, cutánea, o invadir al pulmón, cerebro, riñón o páncreas. El portador asintomático excreta la forma infectiva (quiste) del parásito en las heces, sin sintomatología pero es probable que en algún momento desarrolle la enfermedad. En la amibiasis intestinal crónica se presenta estreñimiento que se alterna con cortos periodos de diarrea, leve dolor abdominal tipo cólico, meteorismo, flatulencia, y borborigmos. En la amibiasis intestinal aguda se presenta diarrea simple con 4 a 5 evacuaciones en 24 horas, diarrea con moco y sangre, dolor abdominal en flanco y fosa iliaca derecha, pujo y tenesmo rectal.

En la colitis fulminante se presenta síndrome disentérico grave (diarrea con moco y sangre), fiebre elevada, ataque al estado general, en el abdomen se siente dolor y una sensación de abultamiento, así como manifestaciones toxico-infecciosas; en apendicitis amibiana puede haber diarrea y la perforación.

En cuanto al ameboma este se localiza en ciego o rectosigmoides, y se presentan datos de tumoración colónica. Para los síntomas de la amibiasis hepática se presenta un ataque al estado general, fiebre, astenia, dolor en hipocondrio derecho, hepatomegalia dolorosa y sensación pesante en hipocondrio derecho, y en la biometría hemática existe leucocitosis moderada. En la amibiasis cutánea se desarrollan úlceras de bordes bien definidas, sangrantes, dolorosas y de crecimiento rápido, y una infección bacteriana agregada, con producción de material purulento que recubre a la lesión (Pérez *et al*, 2012).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta anualmente 500 millones de individuos infectados en el mundo, de las cuales se estima una mortalidad aproximada de 100.000 individuos por las formas invasivas anualmente (García *et al*, 2015). La amibiasis se ubica entre las primeras siete posiciones en la lista de enfermedades de notificación obligatoria y en segundo lugar después de la malaria (García *et al*, 2015). Alrededor de 10 a 20% de la población mundial se considera infectada y 10% de ésta sufre la enfermedad con una letalidad que oscila entre 0.1 y 0.25%. Las tasas de prevalencia son más altas en donde el saneamiento es deficiente (Mendoza Patiño, 2008).

En México, la amibiasis es una de las veinte principales causas de enfermedad; sin embargo el porcentaje de mortalidad debido a complicaciones severas de la amibiasis ha disminuido en los últimos cuarenta años, debido al acceso a drogas antiamibianas efectivas durante las últimas décadas. No obstante se reportó que el 8.41% de la población mexicana tenía anticuerpos circulantes antiamiba, indicando la exposición alta de la población al parásito (Salcedo *et al*, 1994).

Por otro lado, la incidencia de amibiasis intestinal de 1995 al año 2000 se encontraba entre 1000 y 5000 casos por cada 100,000 habitantes cada año, siendo los individuos menores de 15 años de edad los más frecuentemente afectados, con un marcado incremento en niños de entre 5 y 9 años de edad. Con

respecto a la incidencia del absceso hepático amibiano en México, en el periodo comprendido entre los años 1995 y 2000 fue de 10 casos por cada 100,000 habitantes. Durante ese año el porcentaje de incidencia fue de 3.8 casos por cada 100,000 habitantes (González *et al*, 2012). En México del año 2014 hasta la actualidad el absceso hepático es la causa número uno de muerte por parasitosis en reporte médico, afectando en su mayoría a la población de entre 25-44 años de edad, y la amibiasis intestinal ocupa el quinto lugar de morbilidad en enfermedades parasitarias por reporte médico afectando en su mayoría a la población entre 1-4 años de edad (DGE, 2016).

1.2 *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica fue descrita por primera vez por Fedor Lösch en 1875 en San Petersburgo, Rusia, quien describió la forma de trofozoíto y la amibiasis intestinal en detalle. Councilman y LaFleur en el año 1891 encontraron evidencia clínica y patológica de la asociación de *E. histolytica* con la disentería y el absceso hepático. Quincke y Ross, en 1893, describieron la forma de quiste, mientras que el nombre de la especie *Entamoeba histolytica* fue introducido por Fritz Schaudinn en 1903. Posteriormente, en 1925, Boeck y Drbohlav fueron los primeros en cultivar a *E. histolytica*. Sin embargo, el primer cultivo axénico fue realizado por Diamond en 1961. Actualmente los medios TYI-S-33 y YI-S son los más ampliamente usados para el cultivo axénico de *E. histolytica*. Los cultivos de *E. histolytica* pueden realizarse a partir de muestras fecales, biopsias rectales o aspirado de absceso hepático (González *et al*, 2012).

Este patógeno pertenece al Reino Protista

Phylum Amoebozoa

Subphylum Sarcodina

Clase Archamoebae

Orden Mastigamoebida

Familia Entamoebidae

Genero Entamoeba

Especie *E. histolytica*

Presenta dos fases de desarrollo bien establecidas, el quiste y trofozoíto, que constituyen la forma infectante e invasiva, respectivamente. El quiste es tetranucleado, presenta una pared rígida estratificada, y son resistentes a tratamientos con choques hipotónicos y detergentes. El quiste posee una densidad menor que el trofozoíto (Campos, 1996). Pueden observarse en la luz del colon, en las heces pastosas o formadas de la persona parasitada, son de forma oval o esferoidal y miden entre 10-15 μm . Son muy resistentes al jugo gástrico, a factores ambientales externos y a las concentraciones habituales de cloro en agua; logran tolerar hasta 5 minutos a una temperatura de 50 °C y en agua puede tolerar la temperatura de 0 °C por días. Se mantiene viable en alimentos líquidos hasta 15 días en temperatura de 4 °C, y resiste hasta 9 días en temperatura de 22 °C y 25 días a 5 °C.

Presenta, dependiendo su grado de madurez de 1-4 núcleos. Los vehículos principales de transmisión son el agua y alimentos contaminados con quistes.

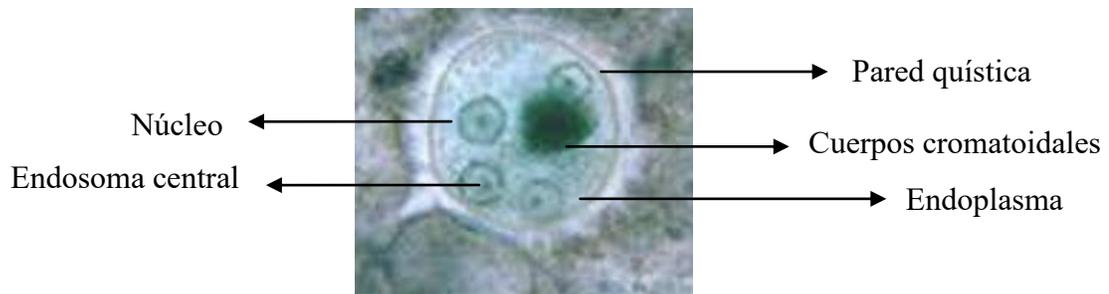


Figura 1. Quiste maduro de *Entamoeba histolytica*.

Tomado de CDC (Dr. George Healy)

El trofozoíto es la forma de vida libre e invasiva en tejido tisular. Presenta la forma ameboidea característica y es móvil a través de pseudópodos, características que son influidas por los cambios de pH, potencial de óxido-reducción, osmolaridad, temperatura, humedad y concentración de O₂ y CO₂. Se multiplica por fisión binaria y su tamaño oscila entre 15 y 35 µm, se nutre por fagocitosis de tejidos y glóbulos rojos, puede detectarse en diarreas acuosas de disentería amebiana. El cuerpo del trofozoíto en el citoplasma presenta dos regiones una externa hialina y una interna granular, en esta última se encuentran vacuolas alimenticias con gran actividad enzimática para la alimentación, y vacuolas contráctiles que regulan su balance hídrico, pues son células dinámicas y pleomórficas (Montoya, 2008). La membrana plasmática está compuesta por glicoproteínas y lipofosfoglicanos que al unirse con la lectina concanavalina A-presentes en la misma, provoca una rápida aglutinación de estos parásitos. Su superficie es totalmente de carga negativa (Ravdin, 2000).

Los trofozoítos crecen preferentemente adheridos al sustrato o aglutinados o en suspensión. Bajo condiciones adversas como las encontradas en cultivos viejos o a temperaturas menores a 36.5 °C, las amibas se redondean separándose de la superficie de cultivo o cesan de aglutinarse, mostrando poca actividad y movilidad interna (Campos, 1996). Los trofozoítos pueden ser infectantes en la práctica de

sexo anal, lesiones de continuidad en piel (a través de pañales contaminados, lesiones peri-genitales). Además deben considerarse también los fómites (monedas, billetes, juguetes, etcétera), y los artrópodos como vectores mecánicos (Makiuchia & Nozaki, 2014).

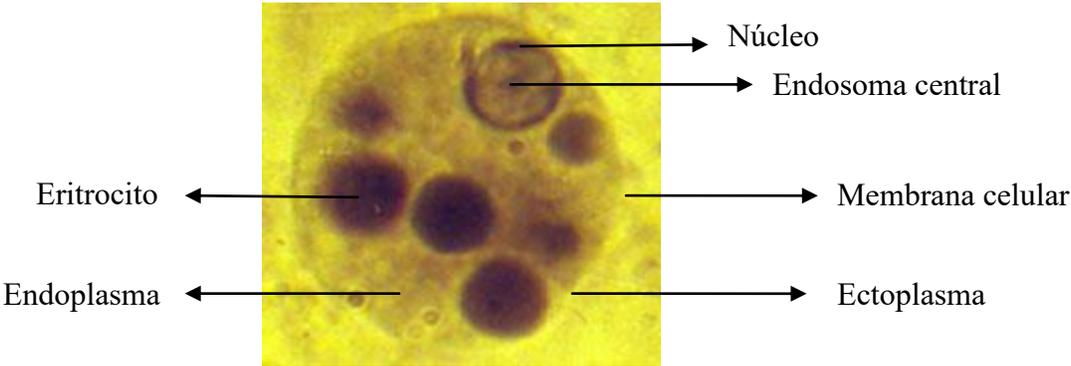


Figura 2. Trofozoíto de *E. histolytica* con núcleo y eritrocitos.

De Biól. J. Tay Zavala, Facultad de Medicina, UNAM.

1.3 Ciclo Biológico.

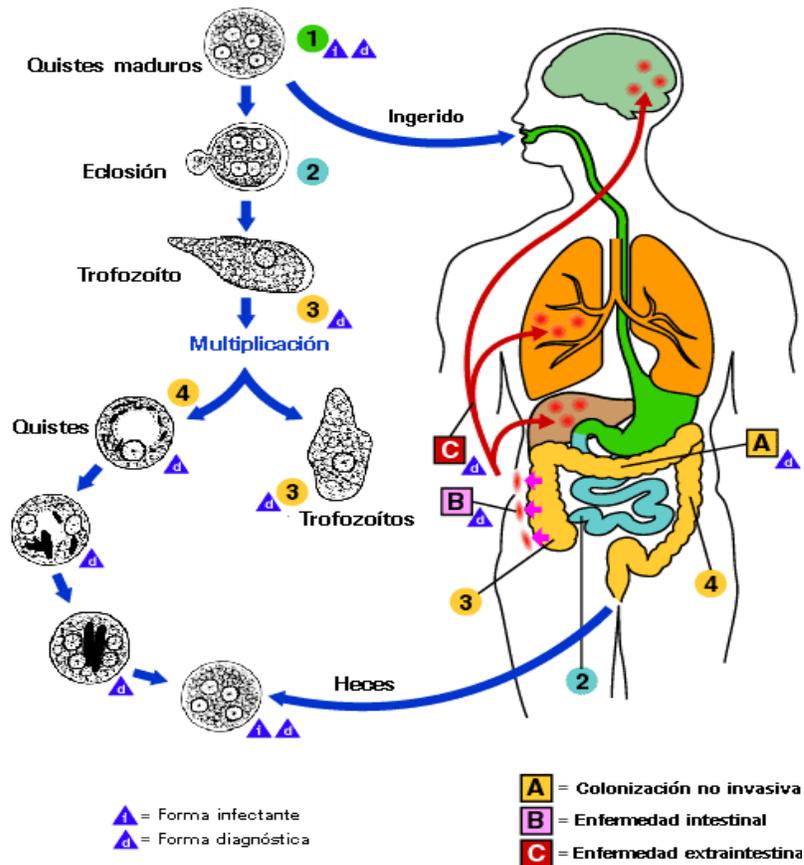


Figura 3. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*.

Tomado de CDC, 2016.

El ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* es directo e involucra dos formas, la infectante que es el quiste, el cual ingresa por la boca, al pasar al intestino se desenquista y deja libre a las amébulas metaquisticas, mismas que crecen hasta convertirse en trofozoítos: segunda forma, vegetativa, que se multiplican por fisión binaria e invaden parte del intestino grueso y colon, para nuevamente producir quistes y completar el ciclo biológico. Los trofozoítos en el intestino invaden los tejidos hasta romper la integridad de la superficie mucosa, produciendo lesiones ulcerosas, que con el lapso de tiempo crecen con profundidad y extensión, hacen uso de la circulación enterohepática para llegar al hígado y de allí a

cualquier sitio del cuerpo , ya sea por contigüidad o por vía hematógica. Esta lisis de células epiteliales ocurre a través de la acción del ameboporo, y de la degradación de la matriz por acción de cisteín proteasas y otras enzimas líticas (Carrero Sánchez, 2007).

En intestino grueso *Entamoeba histolytica* se adhiere a las células epiteliales mediante receptores químicos específicos, para desarrollar actividad citolítica mediada por la acción de toxinas y enzimas como citolisina, lipasa, colagenasa, proteasas, histolicina, proteína formadora de poros, hemolisina y enterotoxinas. Gracias a ello la amiba produce acortamiento y desaparición de microvellosidades, modificaciones en la permeabilidad de la membrana, formación de continuidades o canales, desaparición de uniones intercelulares, redondeamiento y desprendimiento de células epiteliales, aclaramiento del citoplasma de la célula huésped, edema de mitocondrias, dilatación de la membrana plasmática, dilatación del retículo endoplasmático rugoso y desaparición de la membrana plasmática, agresión en los factores de membrana de los lisosomas, colagenasa y amiboporo, y además en los factores solubles β -N-acetilglucosamina, inhibición de la quimiotaxis y citotoxinas (Pérez, *et al*, 2012).

1.4 Resistencia y toxicidad de Fármacos anti-amibianos.

A lo largo del tiempo, una gran cantidad de fármacos amebicidas han estado disponibles; sin embargo, algunos de ellos actúan solo en la luz intestinal, otros en los tejidos y otros se concentran en ciertos órganos, razón por la cual la amibiasis invasiva se trataba con una combinación de drogas. Por otro lado se tiene el problema de los efectos tóxicos de las drogas. Compuestos como las tetraciclinas constituyen una familia de productos naturales (cortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina) y semisintéticos (metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina) derivados de diferentes especies de *Streptomyces* spp, que actúan como agentes bacteriostáticos con actividad frente a gran variedad de

microorganismos, incluyendo las amibas. Son utilizados como antibióticos de uso habitual en seres humanos y animales, siendo la doxiciclina y tetraciclina las más consumidas formando parte de los medicamentos esenciales de la OMS (Vicente & Pérez, 2010).

Sin embargo las adversidades farmacológicas que se describen para las tetraciclinas tienen efectos secundarios durante la biotransformación e incluye las siguiente sintomatología: digestivos (náuseas, vómitos, dolores abdominales, diarreas, dolores esofágicos, el paciente debe tomar el fármaco de pie sin acostarse después), cutáneos (fotosensibilidad), neurosensoriales (hipertensión intracraneal, vértigo, síndrome vestibular reversible), anafilácticos (edema de Quincke, shock), biológicos (citopenia, hepatitis, elevación de la urea), inmunológicos y dentales (lupus farmacológico, pigmentaciones dentales) (Guyen & Baumard, 2013). Por lo anterior el uso de tetraciclinas se ha descontinuado.

Otro fármaco utilizado especialmente contra la amibiasis causada por *Entamoeba histolytica* aprobado por la OMS es el metronidazol (MTZ) y otros nitroimidazoles (tinidazol, ornidazol y secnidazol) de los cuales el primero ha dado los mejores resultados clínicos en la mayoría de los casos. Los efectos secundarios pueden ser moderados o severos e incluyen sabor metálico, dolor abdominal, náuseas, vómitos, cefalea, anorexia, vértigo, confusión, parestesia, ataxia y raramente convulsiones y encefalopatías; también puede haber leucopenia. Se ha demostrado que el MTZ a altas dosis durante tiempo prolongado es mutagénico en bacterias y carcinogénico en animales y en cultivos de sangre periférica de humanos, es decir, es genotóxico y citotóxico; también ocasiona daño a los espermatozoides (Chacín-Bonilla, 2012). Por otra parte, a pesar de ser un fármaco tolerado, puede producir varios efectos neurológicos adversos, incluyendo la neuropatía periférica, la encefalopatía y convulsiones (Wook Kim, *et al*, 2004).

Se describe al MTZ como un compuesto bactericida para los organismos anaeróbicos y microaerófilos, que actúa mediante la absorción por vía oral, intravenosa, tópica, vaginal y rectal, aunque la más

empleada clínicamente es la oral. Las dosis orales del fármaco (250 o 500 mg por lo general) son rápidamente absorbidas y distribuidas a la casi totalidad del organismo. El MTZ es ampliamente distribuido en los tejidos y fluidos del organismo debido en gran parte a que su unión a proteínas séricas o plasmáticas es relativamente baja (< 20%). Los volúmenes de distribución reportados varían de 0.53 a 0.96 L/kg, también logrando penetrar en el líquido cerebroespinal, alcanzando así el sistema nervioso central donde las concentraciones son aproximadamente del 43 al 100% de las encontradas en el plasma; la principal vía de biotransformación del MTZ es el metabolismo oxidante causando modificaciones en su estructura química sobre sus cadenas alifáticas, involucrando reacciones de las enzimas de fase I (oxidaciones e hidroxilaciones) y las de fase II (conjugaciones) que finalmente dan origen a las formas metabólicas hidroxilada, acetilada, así como a metabolitos conjugados con glucurónidos respectivamente. En el humano es el hígado el principal órgano encargado en llevar a cabo la mayoría de las reacciones de biotransformación del MTZ. En las reacciones de fase I participan los complejos enzimáticos de citocromos P450 (CYP450) con la participación de los complejos de las subfamilias 1A, 2B y 2C. Su principal vía de eliminación es por la orina tras 3-6 horas después de la ingesta, por heces y por gases como resultado de su biotransformación. El MTZ y su metabolito hidroxilado tienen la capacidad de inducir daño al ADN en linfocitos humanos -manifestados como rompimientos de cadena sencilla y aberraciones cromosómicas, aunque varía la respuesta según los individuos. Existen suficientes evidencias para aceptar la actividad carcinogénica del MTZ en animales experimentales, produciendo linfomas, cáncer pulmonar y fibroadenomas mamarios y adenocarcinomas (Bendesky & Menéndez, 2001) A pesar de sus efectos secundarios y eficacia para matar a diferentes protozoarios, algunos microorganismos, probablemente incluidas las amibas, han creado resistencia ante esta droga. La resistencia al metronidazol, podría deberse al uso indiscriminado de este fármaco desde edades muy tempranas y a la automedicación (Guerra Solis & Guerra Herbas, 2006). *E. histolytica* posee uno de los mecanismos que las células han desarrollado para sobrevivir en presencia de sustancias tóxicas el cual es llamado fenotipo de resistencia a múltiples drogas. Este fenotipo se caracteriza porque las células

presentan resistencia a diferentes fármacos con estructuras químicas y blancos de acción distintos y se descubrió su multiresistencia en células transformadas de mamífero, las cuales expresan una proteína de 170 kDa en su superficie, denominada Pgp. Posteriormente este mecanismo se ha descubierto en las amibas y otros parásitos protozoarios (Orozco *et al*, 2002). Para el caso de *E. histolytica* se han descrito al menos 4 genes que codifican para las proteínas Pgp y sus similares, siendo los genes EhPgp1 y EhPgp5 los más estudiados *in vitro*, y directamente relacionado con el fenotipo de multiresistencia y que tienen una mayor expresión. De ellos, es EhPgp5 el que aumenta su nivel de expresión conforme se aumenta la concentración del fármaco (Delgadillo, 2003). En estudios *in vitro* *E. histolytica* ha demostrado resistencia al MTZ a concentración de 200 μ M, esto debido a que el trofozoíto expresa las enzimas peroxiredoxin, reductasa de flavina, Fe-SOD, piruvato y ferredoxina RNA oxidoreductasa, las cuales provocan que la amiba sea resistente a este fármaco (Wassmann, *et al*, 1999). Debido a los efectos tóxicos, mutagénicos y los recientes fracasos en el tratamiento de algunos protozoos intestinales con el MTZ, es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos amebicidas y antiprotozoarios con alta actividad y eficacia que puedan sustituir al fármaco o funcionar como coadyuvantes de este para contrarrestar sus efectos negativos. Además, ningún fármaco, incluyendo al MTZ, tiene efecto citotóxico sobre los quistes del parásito, y el MTZ puede mermar la microbiota y generar un desequilibrio en la función intestinal, pues el intestino grueso mantiene un ambiente micro anaeróbico en el que prevalece el crecimiento de microorganismos microaerófilos (Olivos *et al*, 2011)

1.5 Inmunidad innata del hospedero en la amibiasis

La respuesta inmunológica se divide en innata y adaptativa. La inmunidad innata se compone de una serie de diferentes barreras como de la piel, el epitelio respiratorio y digestivo que inmunológicamente son importantes porque sintetizan péptidos antimicrobianos (AMP) y forman el primer componente de la inmunidad innata. Los AMP son péptidos compuestos de 29-34 aa secretados por todas las superficies y fluidos del cuerpo y algunas células inmunes como los macrófagos y los neutrófilos. Estos AMP poseen amplia capacidad antibiótica y antimicótica, aumentando sus concentraciones en presencia de IL-1 y TNF (Pertuz-Belloso & Flores-Romo, 2004). Los AMP se producen principalmente en tejidos expuestos al ataque microbiano, y se sintetizan hasta cien veces más rápido que una inmunoglobulina, con un menor costo metabólico y pueden almacenarse en altas concentraciones. Para que los AMP logren su función interfieren en la síntesis de enzimas metabólicas o DNA, o pueden actuar directamente a nivel de la membrana celular, ya sea alterando la permeabilidad o lisándola mediante la formación de canales o poros, como lo hacen los péptidos hélice- α (Nissen, Meyer & Nes, 1997; Shai, 1998). Otros péptidos eficaces y abundantes, son aquellos que son ricos en cisteína, a los cuales pertenecen las defensinas, las defensinas- α y las defensinas- β ; también los péptidos de hoja- β que se caracterizan por poseer uno o dos enlaces disulfuro, como la polyphemusina (Montaño & Vargas, 2002). La mayoría de los péptidos antimicrobianos descritos son codificados por genes y se sintetizan en los ribosomas, aunque existen otros que son el resultado de metabolitos secundarios, por ejemplo la lactoferricina (Tellez & Castaño, 2010).

Para que un agente biológico produzca infección debe traspasar estas barreras de defensa de superficie, la cual separa los tejidos intactos del cuerpo de agentes externos (Kruzel *et al*, 2007). En la infección por amibiasis, la principal protección contra la invasión por trofozoítos es la capa mucosa, formada por la mucina secretada por las células calciformes (Bergstrom *et al*, 2010). Sin embargo, la expresión del

gen MUC2 presente en mamíferos, induce la sobreexpresión en la membrana de la amiba de la cisteína proteasa 5 (CP5), el principal factor para que *E. histolytica* logre traspasar la barrera mucosa (Lidell *et al*, 2006). Un segundo componente de barrera que ayuda ante la colonización por amibas es el bioma natural del organismo, pues los microbios que colonizan la parte superior de la mucosa del epitelio intestinal pueden inhibir la adherencia de los patógenos y la competencia por los nutrientes (Bos, 1977). Una vez que *E. histolytica* logra traspasar la barrera de mucosa, el trofozoíto entra en contacto con las células epiteliales y comienza a disminuir la respuesta inflamatoria mediada por NF-kB en las células epiteliales a través de la inducción de la proteína de choque térmico 27 (Hsp27), que suprime la regulación transcripcional mediada por NF-kB de (Kammanadiminti & Chadee 2006). Como resultado de la disminución de la respuesta inflamatoria, existe una progresión de daño en el tejido del huésped causado por la invasión amibiana.

Los segundos componentes de la inmunidad innata son los neutrófilos, que son las células más abundantes en la sangre. Los neutrófilos alcanzan el sitio de infección en pocas horas y son la primera oleada celular en respuesta del huésped, la segunda oleada celular son los macrófagos, y los terceros son los NK que participan en la inmunidad frente a patógenos intracelulares reconociendo al MHC I presente en todas las células del cuerpo, y también pueden ser activadas por el sistema de citotoxicidad mediada por anticuerpos (generalmente IgG) en el cual las NK son activadas por estos anticuerpos en las membranas de los patógenos. La forma en que estas células actúan contra *E. histolytica* está mediada inicialmente por los macrófagos los cuales por medio de la producción de mediadores de oxígeno liberan especies reactivas del oxígeno (ERO's) como mecanismo de destrucción contra los trofozoítos. La importancia que tienen los macrófagos en la respuesta inmune contra *E. histolytica* es evidenciada por los mecanismos de adaptación que el parásito posee para evadir la respuesta inmune. Un ejemplo de esto es el factor de inhibición de la locomoción de monocitos (MLIF por sus siglas en inglés), es decir un péptido anti-inflamatorio que impide el reclutamiento de los macrófagos, evitando con esto la acción

destruktiva a los trofozoitos. En estudios *in vitro* los eosinófilos, neutrófilos y macrófagos son destruidos por *E. histolytica*, sin embargo si los eosinófilos se encuentran activados son amebicidas. Un factor más relacionado con la eliminación de la amibiasis es la inducción de citocinas e interleucinas. La producción de un determinado perfil de citocinas durante la respuesta parasitaria dirige la respuesta inmune, lo cual origina reclutamiento, activación y proliferación de macrófagos y/o neutrófilos contra la amibiasis. El efecto de TNF en la activación de macrófagos y neutrófilos se traduce en la inducción del gen que activa la sintetasa inducible del óxido nítrico (iNOS) y por ende en la producción de mediadores de oxígeno que son parte del mecanismo de destrucción de los trofozoitos de *E. histolytica* (Pertuz-Belloso & Flores-Romo, 2004).

Una proteína que dirige satisfactoriamente la respuesta inmune en el hospedero ante una infección parasitaria, como las moléculas antes descritas, es la Lactoferrina, que se secreta naturalmente en los mamíferos y se describe a continuación.

1.6 Lactoferrina bovina.

La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína monómerica no hémica de unión a hierro de 80 kD perteneciente a la familia de las transferrinas producida por diversas especies de mamíferos, incluido el humano. Fue aislada por primera vez en 1939 en leche bovina y en 1960 en leche humana. La Lf presenta una alta homología entre especies, se encuentra en secreciones mucosas como lágrimas, saliva y fluidos seminales y vaginales. El objetivo de la liberación de Lf es secuestrar el Fe disponible, que puede ser tomado por los patógenos para crecer y establecerse dentro de un organismo. Por tanto la Lf en su forma libre desempeña el papel principal contra patógenos al tomar todo átomo de Fe que queda

libre, secuestrándolo de los microorganismos, los cuales mueren por déficit de hierro. Por ello se considera que la Lf tiene acción microbioestática, al impedir el crecimiento de patógenos. Es en la leche y particularmente en su calostro donde se encuentra en mayor concentración (7 g/L en calostro humano); también se encuentra en neutrófilos y en pequeñas cantidades en el plasma sanguíneo (0.2 $\mu\text{g/L}$).

La molécula de Lf (Fig. 4) está integrada por una cadena polipeptídica simple, de 700 aa, plegada en dos lóbulos globulares simétricos (lóbulos N y C) conectados por una región bisagra. Cada lóbulo es capaz de unir un átomo de Fe^{2+} o Fe^{+3} , aunque también puede unirse a iones Cu^{+2} , Zn^{+2} y Mn^{+2} . Presenta una carga neta positiva con un punto isoeléctrico entre 8.0 y 8.5 y 4 sitios potenciales de N-glicosilación.

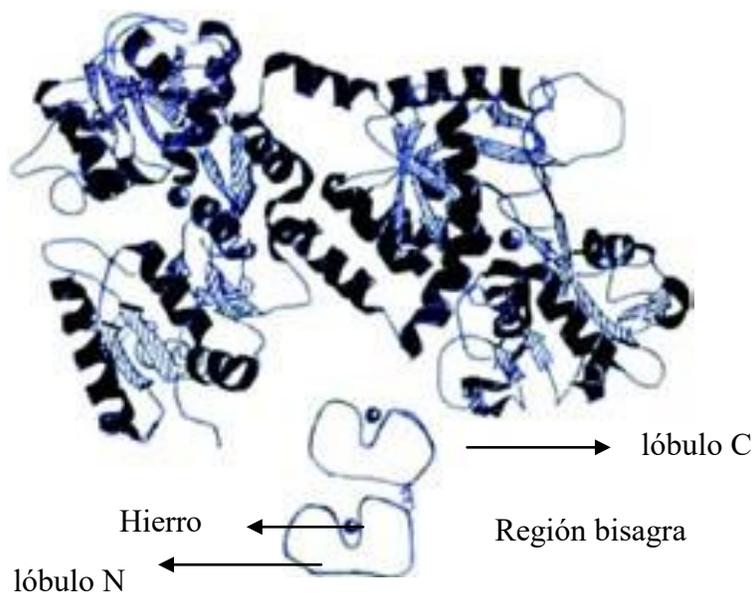


Figura 4. Molécula de Lf con representación de los lóbulos N y C encargados del transporte del hierro y la región bisagra que los une. Tomado de Bolscher, et al, 2012.

Esta molécula es un componente importante del sistema inmune innato, ya que exhibe propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes, antibacterianas y antivirales. Su forma de protección es mediante método directo e indirecto; el directo comprende actividad bacteriostática y bactericida, mientras que el indirecto se basa en la prevención de la adherencia de los patógenos a las células eucariotas (Rodríguez-Franco *et al*, 2005). Ensayos *in vitro* con *E. histolytica* demuestran su actividad amebicida uniéndose a la membrana de los trofozoítos y fragmentándolos, con daños drásticos durante los primeros 30 minutos, además de inhibir su crecimiento (Sicairos, López & De la Garza, 2006). Estudios *in vivo* demuestran que la Lf es capaz de eliminar la infección amibiana en un 63% evitando el daño epitelial y la inflamación en tejido del ciego. También es capaz de disminuir el número de trofozoítos y la mucosidad secretada al lumen (Sicairos *et al*, 2012).

Además de las actividades antimicrobianas antes mencionadas la Lf presenta actividad inmunomoduladora y antitumoral, las cuales dependen de la unión de la Lf a receptores de membrana y su capacidad de penetrar en células, translocar al núcleo y regular la transcripción de genes específicos. (Suzuki *et al.*, 2005) Debido a su capacidad de captar reversiblemente iones férricos la Lf presenta una forma saturada y no saturada con Fe^{3+} conocidas como holoLf y apoLf respectivamente. Su habilidad para secuestrar Fe^{3+} es necesaria para el crecimiento y expresión de actividad bacteriostática. La Lf potencia el efecto de antibióticos contra bacterias multi-resistentes, pues actúa como inhibidor de la actividad cistein proteasas de agentes patógenos.

La fuente natural por excelencia para obtención comercial de Lf bovina (bLF) son la leche y calostro bovino, aunque el contenido en ambos sea menor en comparación al de la leche humana, la disponibilidad de cantidades masivas de leche y calostro de origen bovino. Su carácter catiónico permite su extracción a gran escala por cromatografía de intercambio iónico o mediante filtración con

membranas de adsorción acídicas que inmovilizan la molécula. A pesar de todas las bondades de la bLf, ésta puede llegar a poseer algunas propiedades adversas como son agravar infecciones microbianas al estimular el crecimiento de algunos microorganismos patógenos capaces de utilizar la Lf como fuente de hierro, y aunque no es un alérgeno para los consumidores de productos lácteos en ciertos individuos intolerantes a la Lf puede generar alergia dependiente del grado de sensibilidad del usuario. Sin embargo, estos efectos son poco comunes (Drago, 2007).

1.7 Lactoferricina.

Derivado de la Lf se encuentra el dominio catiónico N-terminal que es responsable de su efecto bactericida: lo que se basa en sus propiedades antimicrobianas. De este se deriva el péptido bioactivo conocido como Lactoferricina (Lfcina). La Lactoferricina (Lfcina) proviene del primer dominio antimicrobiano de la Lactoferrina, fue descubierto como un péptido liberado por actividad proteolítica de la pepsina. Lfcina posee una mayor actividad antimicrobiana que la humana. Del mismo modo fragmentos pequeños sintetizados de bLfcina que componen la parte helicoidal de la molécula nativa son más potentes contra patógenos orales que los correspondientes a fragmentos derivados de la molécula humana. La Lfcina se sitúa en el dominio N1-cationico de la Lf, comprendiendo así los residuos 17-30, por lo cual se nombra Lfcina 17-30 (Bolscher *et al*, 2012).

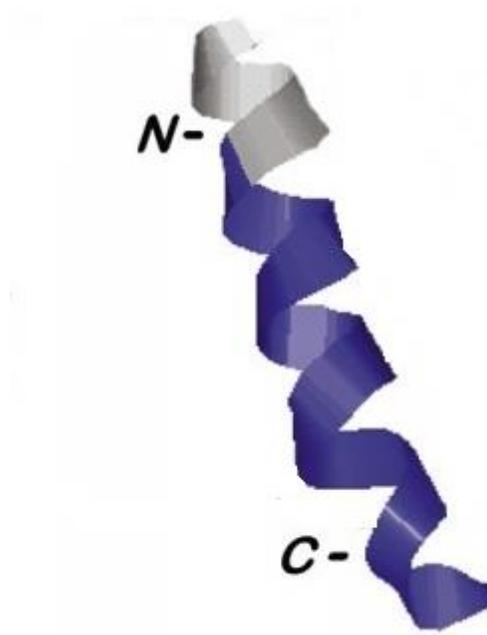


Figura 5. Diseño de la molécula de Lactoferricina 17-30, con el dominio N- terminal en color gris y C-terminal en color morado Tomado de Bolscher *et al*, 2012

Por sus propiedades y posición es la región funcionalmente más importante de la Lactoferrina. Es un péptido de 45 aminoácidos que se obtiene por hidrólisis ácida. Debido a esto existen dos formas de este péptido, la Lactoferricina H (LfcinaH) derivada de la lactoferrina humana, y la Lactoferricina B (LfcinaB) su homólogo bovino. Tanto LfcinaH como LfcinaB poseen actividades antimicrobianas, debido a su marcado carácter catiónico y su capacidad de adherirse a los lipopolisacáridos de las bacterias gram negativas y a los ácidos teicoicos de las gram positivas. Esta molécula es capaz de translocarse al interior de la bacteria e inhibir la síntesis de ADN, ARN o proteínas. Lactoferrina puede lograr la inhibición del crecimiento de hongos filamentosos, mohos, levaduras y dermatofitos, la activación de radicales libres del oxígeno como el ion superóxido y óxido nítrico, y además demostrar actividad antiparasitaria in vitro incluidos los protozoarios *Entamoeba histolytica* y *Toxoplasma gondii*

mediante la unión a la superficie celular de los trofozoitos (Garaizabal, 2012). Versiones cortas del péptido Lfcina conservan mayor actividad antimicrobiana que el péptido nativo, estas formas truncadas han revelado detalles sobre la estructura y función biofísica del péptido interactuando con las bicapas lipídicas en la membrana de la bacteria (Haney *et al*, 2012). Para Lfcina 17-30 se han reportado ensayos *in vitro* con una variante no virulenta de *E. histolytica* en la que se utilizó una concentración de 50 μ M del péptido y tuvo un efecto amebicida del 45-50 % a las 24 horas en contacto con el péptido, demostrando su capacidad de unión a los trofozoitos (López Soto *et al*, 2010).

Un fragmento más, denominado como Lactoferricina b (Lfcina b) homólogo a la Lfcina 17-30 es uno de los péptidos más efectivos derivados de la Lf. Su actividad cubre una gama notable de actividades antibacterianas contra gram positivas y gram negativas, actividad anti-fúngica, así como antiviral y las actividades antitumorales. Además puede unirse a la endotoxina y los nucleótidos metilados y por lo tanto se ha propuesto para ser capaz de inhibir el choque séptico (Chan, et al, 2006). Lfcina b 4-14 es un péptido creado por unión de un grupo disulfuro (color violeta) a dos cisteínas (color azul) que se agregaron en ambos extremos, con un centro activo del aa 4-14 (color verde) unido mediante un puente disulfuro, (como se observa en la figura 6). Este péptido muestra una estructura parecida a la versión lineal pero tiene una segregación más claramente definida de los residuos hidrófilos e hidrófobos, que es fundamental en el aumento de la actividad antimicrobiana del péptido (Chan, et al, 2006). Sin embargo no hay estudios *in vitro* ni *in vivo* que demuestren su capacidad antimicrobiana.

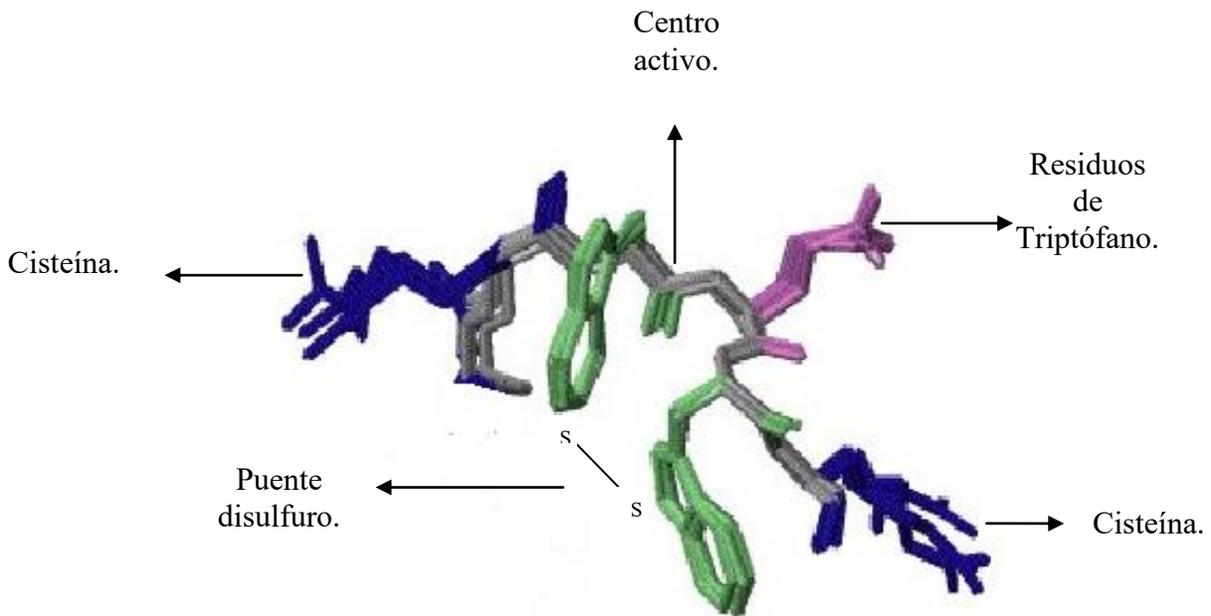


Figura 6. Representación de Lfcin b 4-14.

De Chan *et al*, 2006.

1.9 Lactoferrampina.

Lactoferrampina (LFampina) es otra secuencia de aa en la molécula original Lactoferrina que se encuentra en el dominio N1, identificándose a través de los residuos cargados positivamente y sin carga con el potencial de formar una α -hélice anfipática cargada positivamente, abarca la siguiente secuencia de aa 265-284 (LFampina) (Adão, *et al*, 2011). De esta secuencia original se deriva la Lactoferrampina bovina (LFampinaB) es un nuevo péptido antimicrobiano que tiene una secuencia de

17 aa (264-285). Esta cadena de residuos posee una amplia actividad antimicrobiana en la molécula de Lactoferrina. La LFampinaB tiene seis residuos de aa básicos y tiene una carga neta de 5 a pH neutro en solución, su estructura forma una α -hélice anfipática en la región N-terminal y termina en el residuo 11 seguido por la región C-terminal (Tsutsumi *et al*, 2012).

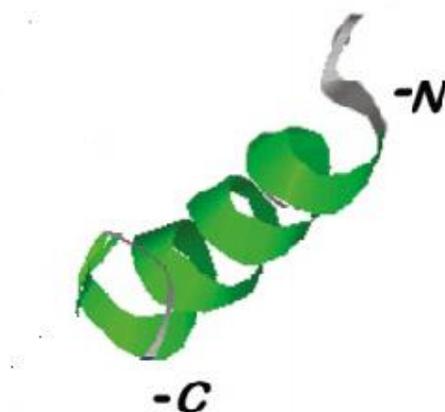


Figura 7. Diseño de la molécula de Lactoferrampina 256-284, señalando el extremo N- terminal en color gris y C- terminal en color verde. Tomado de Bolscher *et al*, 2012.

La actividad antimicrobiana de LFampin se cree, puede aparecer como resultado de efectos causados por la interacción del péptido con la membrana microbiana. Hay cuatro modelos principales para explicar su actividad antimicrobiana: “agregado”, “poros toroidal”, “duela de barril” y “alfombra”. En el modelo agregado los péptidos forman una estructura micélica con los lípidos y en consecuencia se traslocan a través de la bicapa; los péptidos se orientan a la dirección transmembrana con respecto a la superficie de ésta. En el modelo toroidal de poros los lípidos se enfrentan a sus grupos de cabeza para formar un poro en el núcleo celular, mientras que el modelo duela de barril se mantiene sin cambios en

la dirección de lípidos y forma poros. Por último, en el modelo de alfombra los péptidos se alinean en la superficie del plano de la bicapa lipídica, mostrando actividad detergente (Tsutsumi, et al, 2012).

Los residuos C-terminal de la Lactoferrampina son los más críticos para su actividad antimicrobiana. Debido a que el C-terminal se compone de varios residuos con cargas positivas que se agrupan juntos, la sustitución de estos residuos básicos contribuye a la disminución de su potencia antimicrobiana.

La Lactoferrampina 265-284 consta de tres residuos adicionales (Asp-Leu-Ile) que aumentan la tendencia de este péptido para asumir una conformación α -helicoidal. El modo de acción de este péptido sobre las bacterias es por vinculación con la membrana y ruptura de ésta. La LFampinB se internaliza en pocos minutos con la permeabilización de la membrana bacteriana seguida de daño celular. Este péptido ejerce actividad detergente como, perturbar la interfase hidrófoba de la bicapa lipídica. Se ha determinado que las cadenas laterales de Leu-Ile-Ala son responsables de la interacción entre el péptido y el núcleo hidrofóbico de una bicapa de fosfolípidos, y la α -hélice con los residuos Asp-Leu-Ile en el extremo N-terminal del péptido son necesarios para mediar en la profundidad de inserción del péptido en la membrana microbiana y mejorar la afinidad por vesículas cargadas negativamente. Este péptido tiene mayor afinidad por fosfolípidos ácidos que neutros (Sinha, et al, 2013). López-Soto, et al (2010) han reportado la capacidad antimicrobiana con diferentes microorganismos incluida *E. histolytica* en su variante no virulenta, con un porcentaje amebicida del 50% bajo la concentración de 50 μ M a las 24 horas en contacto con el péptido. Además otro estudio demostró con los microorganismos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con una concentración de 40 μ M durante 1.5 horas, obteniendo un porcentaje de inhibición del crecimiento del 76.8% para *E. coli* y 36.7% para *S. aureus*, demostrando por medio de microscopía confocal como es que produce daño en la membrana de las bacterias (Villaseñor et al, 2010).

1.10 Justificación.

La amibiasis es un grave problema de salud pública en México y en la gran mayoría de países en vías de desarrollo. A pesar de la eficacia del MTZ la enfermedad persiste, probablemente debido a las reacciones secundarias que evitan o impiden que las personas no cumplan con el tratamiento, o a la presencia de variantes virulentas resistentes. Por lo anterior se ha promovido el desarrollo de alternativas de tratamiento más seguras y eficaces contra la amiba, basadas en moléculas de la inmunidad innata.

La Lactoferrina bovina y sus péptidos derivados son de fácil acceso. Se ha descrito el uso de la Lf y algunos de sus péptidos como altamente microbicidas en múltiples estudios, incluyendo a la amiba. Sin embargo el efecto de estos AMP's sobre variantes virulentas de la amiba que pueden ser resistentes a fármacos no se ha evaluado, así como no se ha descrito su mecanismo de acción. Por otra parte el efecto amebicida de la Lfcina b no se ha descrito todavía.

Por lo tanto la finalidad del presente proyecto es evaluar el efecto *in vitro* de péptidos antimicrobianos derivados de la Lf bovina contra una variante virulenta de *Entamoeba histolytica*, así como dilucidar el mecanismo de acción, y proponerlo como un nuevo compuesto antimicrobiano coadyuvante del MTZ para disminuir sus efectos negativos. Es una investigación sustentada en el interés de evaluar la capacidad amebicida de estos péptidos ante *E. histolytica*.

2. Hipótesis.

- A. Ensayos *in vitro* con los péptidos derivados de Lactoferrina bovina: Lfcina-b, Lfcina 17-30 y LFampina despliegan un efecto amebicida desde tiempos tempranos y a bajas concentraciones sobre la variante virulenta de *E. histolytica* HM1: IMSS.

- B. El efecto amebicida de los péptidos es mediado principalmente por apoptosis.

3. Objetivo General.

Determinar el efecto amebicida y el mecanismo de acción de los péptidos derivados de Lactoferrina bovina sobre la variante virulenta de *E. histolytica*.

3.1 Objetivos Particulares.

- 1. Evaluar el efecto amebicida de diferentes concentraciones y periodos de tiempo de Lfcina-b, Lfcina 17-30 y LFampina 265-284 sobre la variante virulenta de *E. histolytica*.

- 2. Determinar el mecanismo de acción amebicida de los péptidos a través de estudios de apoptosis/necrosis y microscopía confocal.

- 3. Establecer el daño ultraestructural causado por los péptidos antimicrobianos sobre la amiba a través de microscopía electrónica de transmisión.

4. Materiales y Métodos.

4.1 Mantenimiento de la variante virulenta de *Entamoeba histolytica*.

Los trofozoítos de la variante virulenta de *Entamoeba histolytica* HM1: IMSS se mantuvieron de forma axénica in vitro con el medio de cultivo TYI-S-33 con el 16% adicional de suero bovino adulto inactivado, 3% de vitaminas y 5% de antibiótico. Se mantuvieron en cajas de cultivo celular de poliestireno transparentes con capacidad de 25cm², estériles antes de la inoculación para el crecimiento de los trofozoítos, y se guardaron para la proliferación en la estufa con una temperatura de 37°C.

La obtención de la variante virulenta de *E. histolytica* se obtuvo a partir de una inoculación de trofozoítos en hámster (*Mesocricetus aureatus*) de 6-8 semanas de edad, en la vena aorta, los cuales produjeron absceso hepático en los animales (Barrón González, 2002), para después ser extraídos y cultivados en medio de cultivo de Diamond y mantener un cepario estable con el parásito virulento (Cruz *et al*, 2010)

La patogenicidad de los trofozoítos virulentos de *E. histolytica* ha sido atribuida a diferentes factores de virulencia, tales como su capacidad fagocítica, resistencia al complemento, expresión de adhesinas (lectina inhibible por galactosa/N-acetil-D-galactosamina), cisteín proteasas, ameboporinas, colagenasas, fosfolipasas o actividad citolítica mediada por contacto (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000).

4.2 Conteo de trofozoítos.

El conteo de trofozoitos se realizó con la Cámara de Neubauer comercial, que consta de una retícula completa de 3mm x 3mm, subdividido a su vez en 9 cuadros de 1mm de lado cada uno. Con una capacidad neta de 10µl de suspensión celular para el conteo, bajo la siguiente fórmula matemática:

$$\text{Concentración: } \frac{\text{Número de células} \times 10,000}{\text{Número de cuadros}}$$

Para obtener un total de 10,000 trofozoitos en cada experimento in vitro individual en la evaluación de cada péptido.

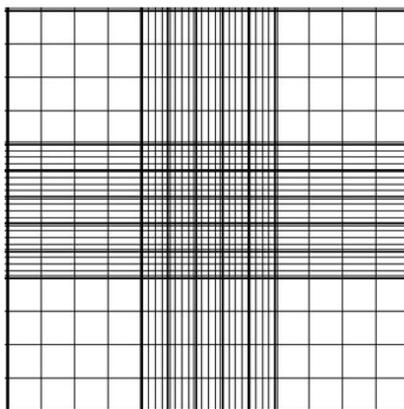


Figura 8. Representación de los cuadrantes para el conteo celular en la Camara de Neubauer, solo se toman en cuenta los 4 externos. (Tomado de Celoromics, por Oscar Bastidas).

Péptidos.

Los péptidos Lactoferricina-b, Lactoferricina 17-30 y Lactoferrampina fueron sintetizados en el laboratorio GenicBio Limited de la empresa ChemNet Global Chemical Network con sede en China.

4.3 Ensayos del efecto amebicida de los péptidos sobre trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

Para la evaluación de la capacidad amebicida de la Lactoferricina-b, Lactoferricina 17-30 y Lactoferrampina se realizaron ensayos de viabilidad celular, 3 veces por triplicado, utilizando las concentraciones de 5 μ M, 10 μ M y 25 μ M de cada uno de los péptidos, bajo los tiempos de exposición de 5, 15, 30, 60, 120 y 240 min, siguiendo la metodología a continuación descrita.

Se tomaron 10,000 trofozoítos de un cultivo de amibas de 72 h, los cuales fueron depositados en un microtubo con capacidad de 500 μ l, a los cuales se les añadió por separado, cada una de las concentraciones antes mencionadas bajo los tiempos antes descritos. Terminado el tiempo, se añadió azul de tripano a cada tubo con cada concentración para poder diferenciar a las amibas vivas de las muertas. Adicionalmente, se añadió un fijador, paraformaldehído al 4%, para detener el efecto del péptido sobre las amibas y poder determinar a tiempos posteriores la viabilidad de las células expuestas. Después de este procedimiento, se tomaron 10 μ l del concentrado celular y se depositaron en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de los trofozoítos vivos para cada uno de los ensayos y sus

repeticiones, y posteriormente obtener los resultados de mortalidad en los trofozoítos con cada uno de los péptidos.

4.4 Microscopía confocal.

Para determinar la localización subcelular de los péptidos en las amibas tratadas, se emplearon péptidos acoplados al fluorocromo FITC (los cuales fueron donados por la Dra. Nidia León Sicairos), y su colocalización con anticuerpos para endosoma temprano y tardío, por microscopía confocal. Para ello, se cosecharon amibas de 72 h de cultivo, se incubaron en hielo durante 5 min y centrifugación a 1500 rpm durante 10 min a 4°C. Para cada experimento se utilizaron 250,000 amibas, las cuales se incubaron en un microtubo de 1ml con los péptidos marcados con FITC a una concentración de 2 μ M por cada millón de trofozoítos durante 1 h. Una vez incubados, los trofozoítos se lavaron dos veces con PBS y enseguida se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min a temperatura ambiente. Después de dos lavados con PBS, los trofozoítos fijados se incubaron durante 10 min con Tritón 1% para permeabilizarlos, se lavaron con PBS y se añadió un anticuerpo primario anti-endosoma temprano (hecho en conejo) y/o tardío (hecho en ratón) a una dilución 1:100 por 60 min en cámara húmeda. Las células se lavaron con PBS y enseguida se adicionó el anticuerpo secundario (anti-conejo y/o anti-ratón) a una dilución 1:50 y se incubó durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Después de varios lavados con PBS, enseguida se incubaron los trofozoítos con TO-PRO 3, como contratinción nuclear, durante 5 min y se lavó con PBS. Al terminar, se agregó una gota de VECTASHIELD (Antifade Mounting Medium de Vector Laboratories) que permite mantener la fluorescencia hasta por 15 días. Aplicado el método antes descrito, se utilizó la técnica de microscopía Nomarski u Óptica de Contraste Interferencial, que es una técnica que usa filtros polarizantes y prismas para producir imágenes tridimensionales. Esta microscopía se caracteriza por su buena resolución y contraste, los cuales ayudan a discernir detalles superficiales como estructuras internas.

4.5 Microscopía de Transmisión.

Para evaluar las alteraciones a nivel morfológico en los trofozoítos tratados con los péptidos, se utilizó microscopía de transmisión. Para ello, se utilizaron 10,000 trofozoítos virulentos de 72 h de cultivo, que fueron sometidos al tratamiento con 10 μ M durante 60 min de Lactoferricina-b, o Lactoferricina 17-30 o Lactoferrampina 265-284, fijadas con Karnovsky por 60 min y tratadas con Buffer de cacodilato de sodio al 0.1 M durante toda una noche a 4°C. El Buffer se eliminó, y se añadió Osmio al 1% durante 1 h y los microtubos fueron cubiertos con papel aluminio. Después de la incubación, las muestras se lavaron con agua destilada a temperatura ambiente 2 veces y después se realizó una deshidratación con alcoholes a diferentes concentraciones (primero alcohol al 70 y 80 % durante 10 min cada uno y 90, 96 y 100% durante 15 min cada uno). Seguido a esto, se removió el alcohol al 100% y se añadió acetoniitrilo durante 20 min, dos veces, y se colocó una mezcla proporción 1:1 de epon: acetoniitrilo durante 1 h, seguido de una mezcla proporción 2:1 epon: acetoniitrilo durante 1 h, y después epon puro durante 24 h a temperatura ambiente. Al terminar este tiempo, las muestras se dejaron polimerizar a 37°C en la estufa por 24 h para eliminar la toxicidad del epon al contacto con la piel. Al finalizar el tratamiento con epon, los bloques obtenidos fueron sometidos a cortes finos de 1 μ de grosor con una navaja de vidrio en el micrótopo, para verificar el estado de los bloques y comprobar una buena práctica de la técnica, así como un buen estado de las células. Finalmente, los bloques fueron enviados al Instituto de Fisiología Celular para ser sometidos a cortes finos con la navaja de diamante para la MET.

4.6 Ensayo de Apoptosis.

Para evaluar el tipo de muerte que los péptidos derivados de la Lactoferrina desencadenan en los trofozoítos de *E. histolytica*, se utilizó un Kit de Apoptosis-Necrosis “Technical Data Sheet FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I” de la marca BD Pharmingen. La metodología marcada en el instructivo fue modificada para utilizar los volúmenes necesarios solo para 10,000 amibas (esta modificación a concentración y volúmenes se encuentra especificada en el apartado de Apéndice). La metodología se describe a continuación.

Las 10,000 amibas fueron tratadas con cada uno de los péptidos a dos concentraciones, 5 μ M y 25 μ M, más un blanco (amibas no tratadas) durante una h. Terminado el tiempo bajo el tratamiento con cada péptido, los trofozoítos fueron centrifugados a 1500 rpm y se decantó el sobrante, fueron lavados con PBS frío durante 5 min, se retiró el PBS y se añadieron 10 μ l de Buffer de unión, 5 μ l de Annexin V (que se identifica en color verde e indica apoptosis) y 5 μ l de Yoduro de Propidio (que se identifica en color rojo e indica necrosis) y se dejó reaccionar durante 15 min en total oscuridad a temperatura ambiente. Para poder observar la fluorescencia, se observaron los trofozoítos al microscopio de luz UV en un rango de tiempo no mayor a 1 h. Este ensayo se realizó 3 veces y los resultados son la media de estos ensayos.

5. Resultados.

5.1 Efecto amebicida con Lactoferricina-b.

En cada experimento con cada péptido se obtuvieron el promedio y la desviación estándar de tres experimentos por triplicado, que fueron sometidos a una prueba t de student.

En la figura 9 se observan las diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento de los trofozoítos virulentos de *E. histolytica* con el péptido Lfcina-b. A la concentración más baja usada de 5 μ M, el péptido mató al 71.78 % de los trofozoítos a sólo 5 min, mortalidad que se incrementó a 97.38 % a los 240 min. El efecto amebicida se incrementó de una manera dosis-dependiente, aunque sólo ligeramente, alcanzando una mortalidad, con la máxima concentración usada de 25 μ M, de 84.08 % a los 5 min y 99.27 % a los 240 min. Con estos resultados el efecto de los péptidos es dosis y tiempo dependiente

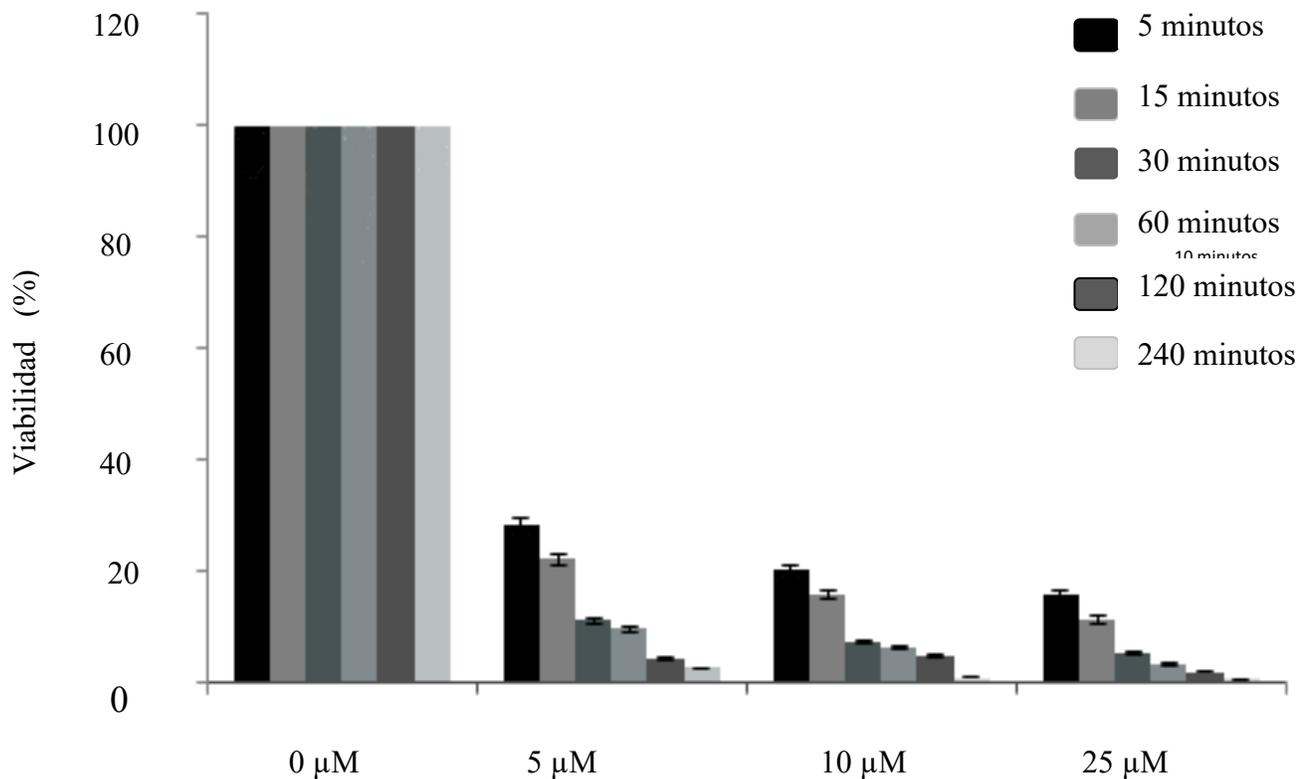


Figura 9. Resultados del efecto amebicida contra *E. histolytica* del péptido Lactoferricina b, con una

Para el valor del control (0 μM) vs los tiempos y concentraciones con una significancia de $p < 0.05$ hay diferencias significativas en los porcentajes de inhibición del crecimiento de los trofozoítos virulentos con el péptido Lfcina-b.

5.2 Efecto amebicida con Lactoferricina 17-30.

En la figura 10 se observan las diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento de los trofozoítos virulentos con el péptido. A la concentración de 5μM en los primeros 5 minutos se obtuvo una mortandad del 84.3 % y a los 240 minutos se observó una mortandad del 91.52 % en los trofozoítos. Con la concentración de 10μM en los primeros 5 minutos se observa una mortandad del 86.17 % y a los

240 minutos una mortalidad del 93.69% en los trofozoítos. Por ultimo con la concentración de 25 μ M en los primeros 5 minutos se observa una mortalidad del 84.2 % y a los 240 minutos una mortalidad del 99.38% en los trofozoítos.

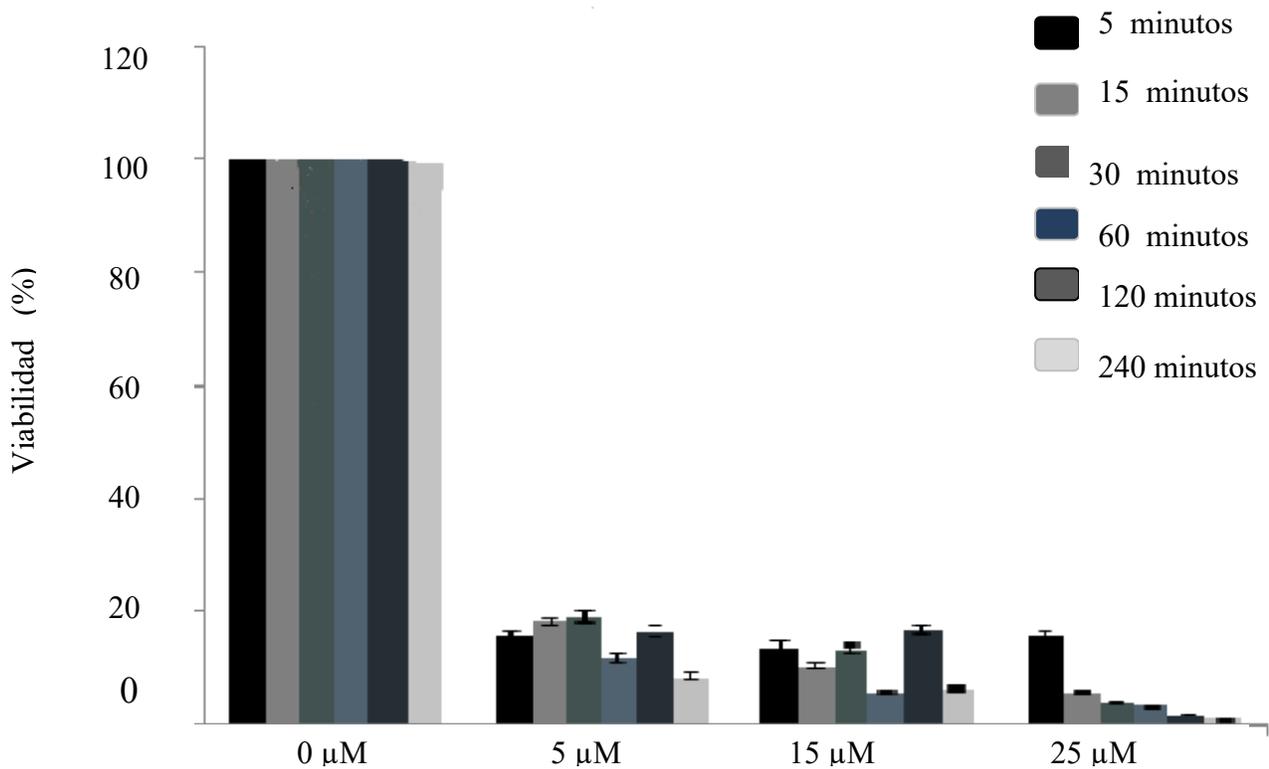


Figura 10. Resultados del efecto amebicida contra *E. histolytica* del péptido Lactoferricina 17-30,

Para el valor del control (0 μ M) vs los tiempos y concentraciones con una significancia de $p < 0.05$ hay diferencias significativas en los porcentajes de inhibición del crecimiento de los trofozoítos virulentos con el péptido Lfcina 17-30.

5.3 Efecto amebicida con Lactoferrampina.

En la figura 11 se observan las diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento de los trofozoítos virulentos con el péptido LFampina. A la concentración de 5 μ M en los primeros 5 min se observó una mortandad del 70.77 % y a los 240 min una mortandad del 96.57 % en los trofozoítos. Con la concentración de 10 μ M en los primeros 5 min se observa una mortandad del 89.95 % y a los 240 min una mortandad del 99.53 % en los trofozoítos. Por ultimo bajo la concentración de 25 μ M en los primeros 5 min se observa una mortandad del 89.13 % y a los 240 min una mortandad del 100% en los trofozoítos.

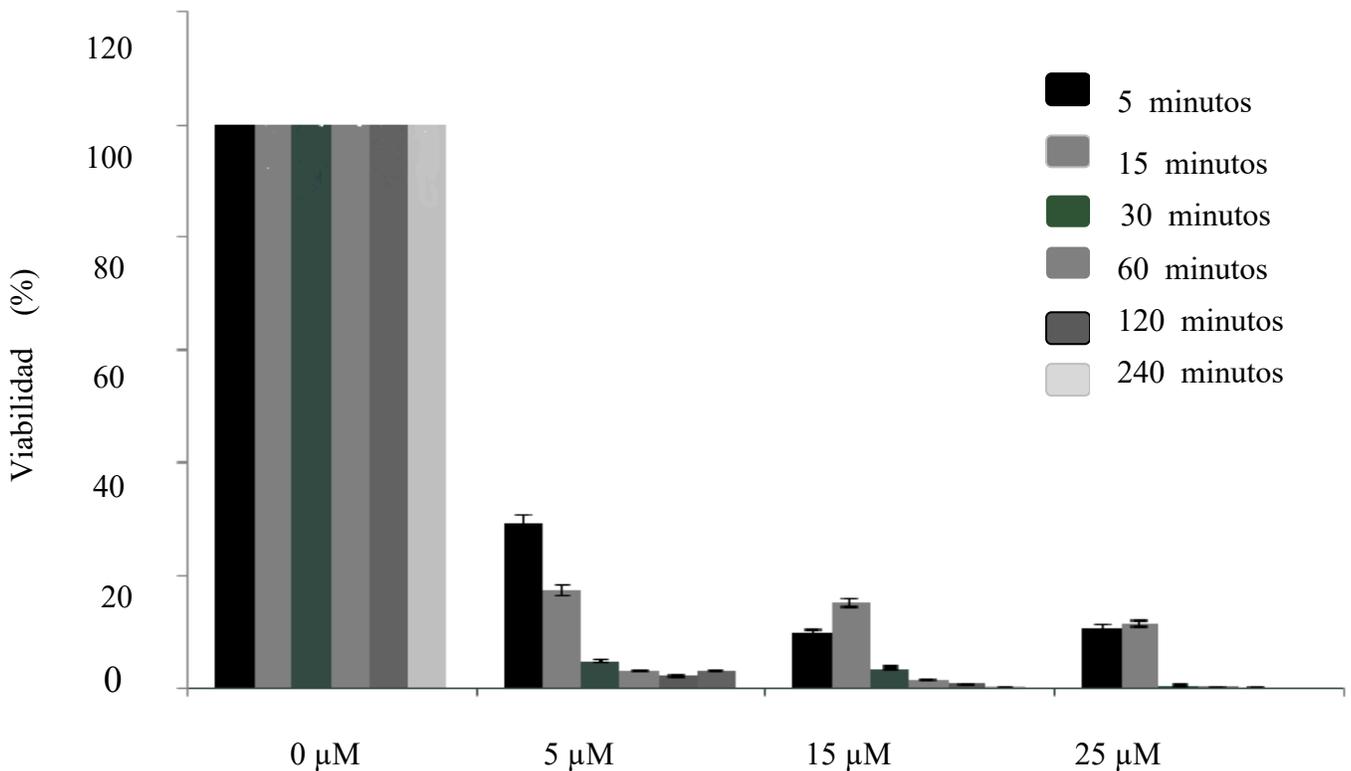


Figura 11. Resultados del efecto amebicida contra *E. histolytica* del péptido Lactoferrampina, con una

Para el valor del control (0 μ M) vs los tiempos y concentraciones con una significancia de $p < 0.05$ hay diferencias significativas en los porcentajes de inhibición del crecimiento de los trofozoítos virulentos con el péptido LFampina.

5.4 Análisis del efecto amebicida de los péptidos *in vitro* por Microscopía Confocal.

Para la determinación de la localización subcelular de los péptidos y su posible mecanismo amebicida *in vitro*, se utilizaron dos de los péptidos, Lfcina y LFampina, acoplados al fluorocromo FITC (verde). Ya que estudios previos sugieren que en el caso de la Lactoferrina, ésta parece entrar a la amiba a través de endosomas (León & De la Garza, 2006), en este trabajo se evaluó la co-localización de los dos péptidos con endosomas tempranos y tardíos a los 30 min, a través del uso de anticuerpos secundarios acoplados a TRITC (rojo). Los resultados mostraron que a los 5 minutos, el péptido Lfcina penetró en los trofozoítos y se localizó en el endoplasma (Figura 12 B); sin embargo, éste no co-localizó con los endosomas tempranos marcados con el anticuerpo EEA1 (figura 12 D) ni con endosomas tardíos marcados con el anticuerpo LAMP1 (Figura 12 E), lo que es evidente al observar el “merge” de B,D y E (Figura 12 F). lo que sugiere que el péptido Lfcina no utiliza esa vía para entrar a los trofozoítos de *E. histolytica* y que su mecanismo de acción no involucre la participación de los lisosomas en el efecto amebicida de la Lfcina.

En la figura 12 también se observan amibas no tratadas (blanco) bajo Nomarski con luz normal (A) y con luz UV (C), en la cual se observa la localización de los núcleos marcados con el fluorocromo Topro.

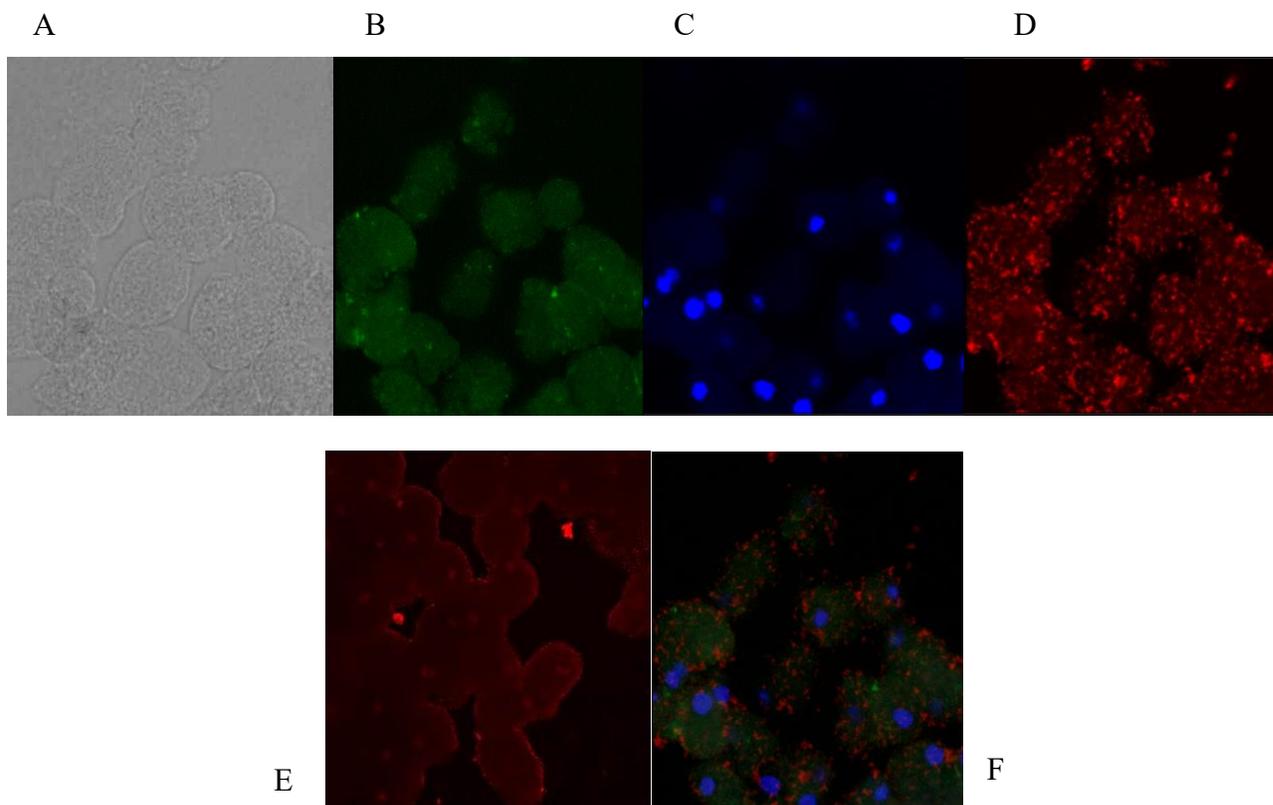


Figura 12. A) Amibas bajo Normaski. B) Amibas bajo Lfcina 17-30 asociado FITC. C) Núcleos con Topro. D) Amibas con EEA1 y MPR. E) Amibas con LAMPR. F) Amibas con EEA1 y LAMPR asociado con TRITC.

Ahora en cuanto a los resultados con LFampina, se realizó el mismo procedimiento que con Lfcina, y a los 5 minutos el péptido LFampina penetró en los trofozoítos y se localizó en el endoplasma (Figura 13 B); sin embargo, éste tampoco co-localizó con los endosomas tempranos marcados con el anticuerpo EEA1 (figura 13 D) ni con endosomas tardíos marcados con el anticuerpo LAMPR (Figura 13 E), lo que es evidente al observar el “merge” de B, D y E (Figura 13 F). Esto que sugiere que el péptido LFampina

no utiliza esa vía para entrar a los trofozoítos de *E. histolytica* y que su mecanismo de acción no involucre la participación de los lisosomas en el efecto amebicida de la Lfampina.

En la figura 13 también se observan amibas no tratadas (blanco) bajo Nomarski con luz normal (A) y con luz UV (C), en la cual se observa la localización de los núcleos marcados con el fluorocromo Topro.

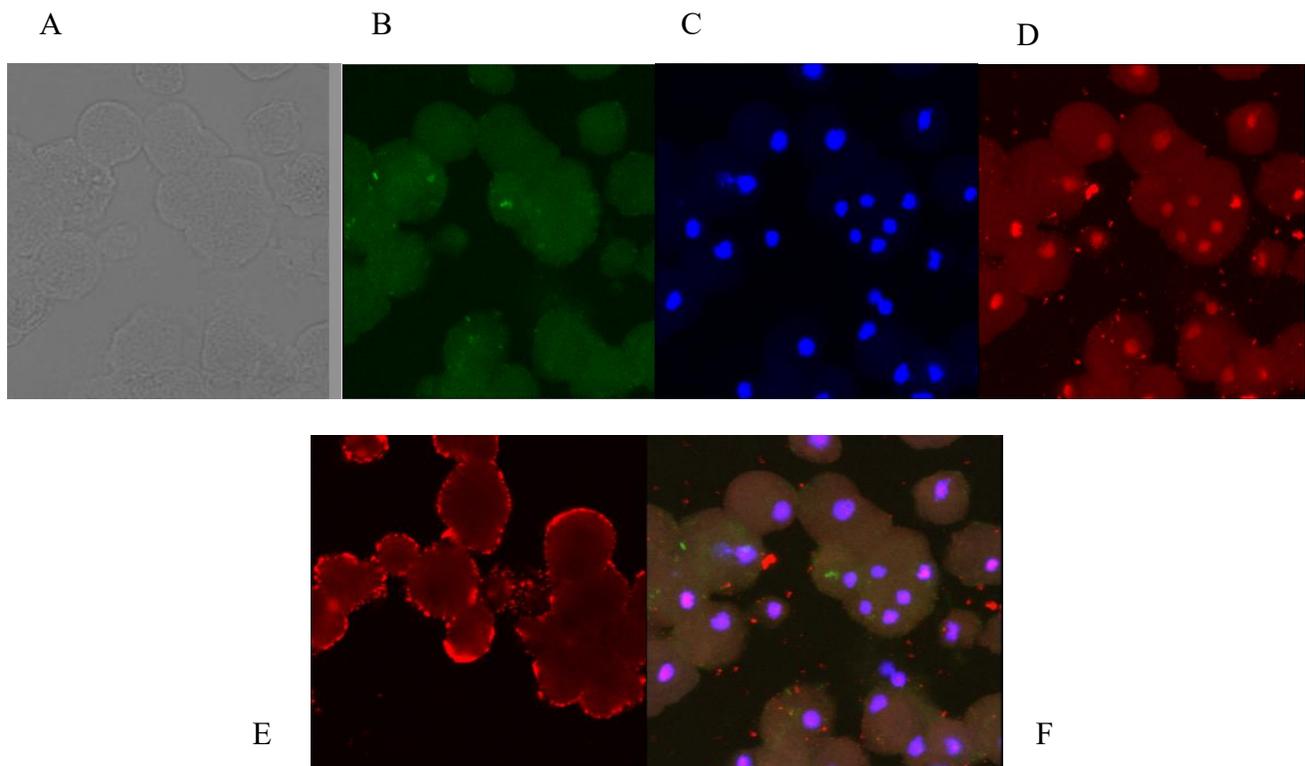


Figura 13. A) Amibas bajo Normaski. B) Amibas bajo Lfpina asociado con FITC. C) Amibas con Topro. D) Amibas con EEA1. E) Amibas con LAMPR asociado a FITC. F) Amibas con EEA1 y LAMPR asociado a FITC.

Un resultado contrastante obtenido con el péptido LFampina, fue que los trofozoítos presentaron fragmentación nuclear (Figura 14 B), con un número de hasta 5 núcleos por célula, cuando lo usual son

máximo tres núcleos por trofozoíto, y endosomas extracelulares (Figura 14 C), como se observa en el agrandamiento de las imágenes (Figura 14 A, B y C).

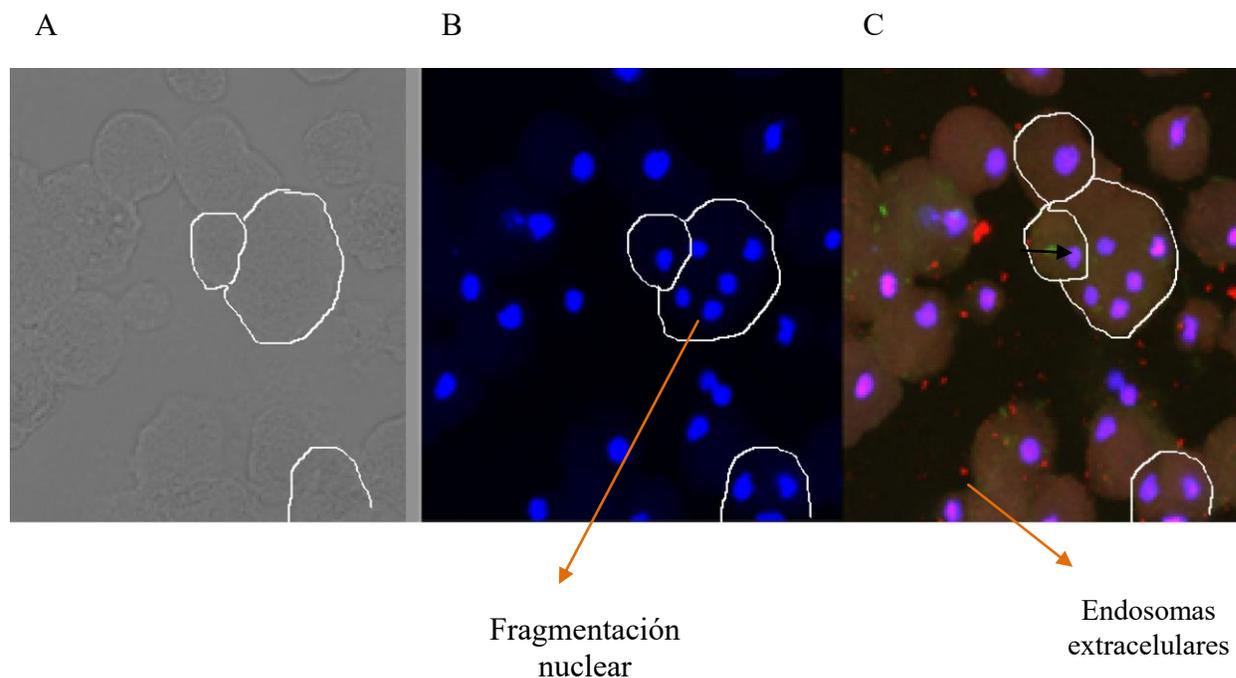


Figura 14. Trofozoítos de *E. histolytica* bajo el tratamiento con Lactoferrampina. A) Amibas bajo Normaski. B) Amibas con Topro. C) Amibas con Amibas con EEA1 y LAMPR asociado a FITC.

5.5 Análisis de los trofozoítos de *E. histolytica* por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

En la figura 15, se muestra la morfología de los trofozoítos virulentos sin tratamiento con algún péptido. Como se observa, las membranas de las amibas se encuentran intactas, el volumen celular no se encuentra alterado porque los trofozoítos miden alrededor de 15-40 μm , se observa los núcleos con la típica cromatina condensada en la cara interna de la membrana nuclear y su endoplasma contiene gran cantidad de vacuolas con poco contenido granular además de abundantes estructuras tipo cisternas entre las vacuolas.

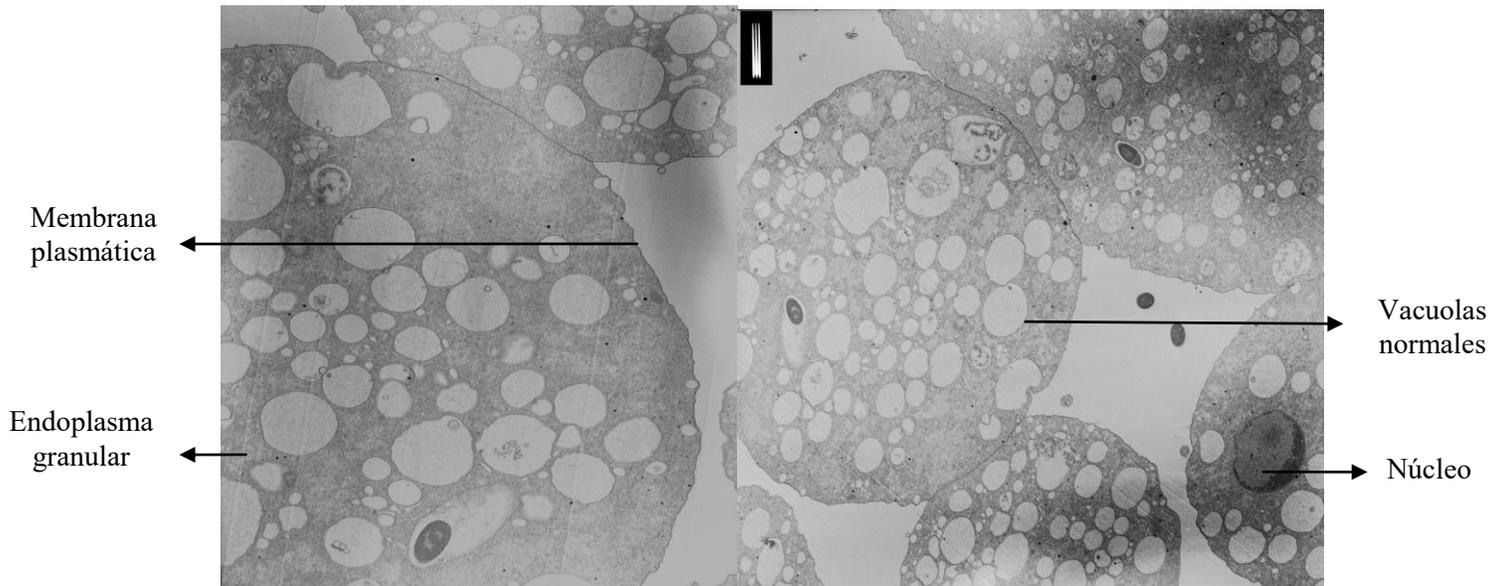


Figura 15. Trofozoítos de *E. histolytica* sin tratamiento con algún péptido observados por MET .

En comparación con las amibas sin tratamiento (Figura 16 A), las tratadas con Lfcina-b presentaron daños a nivel morfológico. El endoplasma se ve con un menor número de vacuolas, aunque tienen mayor cantidad de contenido granular, así como también hay una disminución clara de las estructuras tipo-cisternas (Figura 16 B, C y D). Por otra parte, el núcleo se ve agrandado y con menos condensación de cromatina. Interesantemente, se observó la formación de los cuerpos apoptóticos, que asociado a las vacuolas con partículas granulosas, representa un claro signo de muerte por apoptosis.

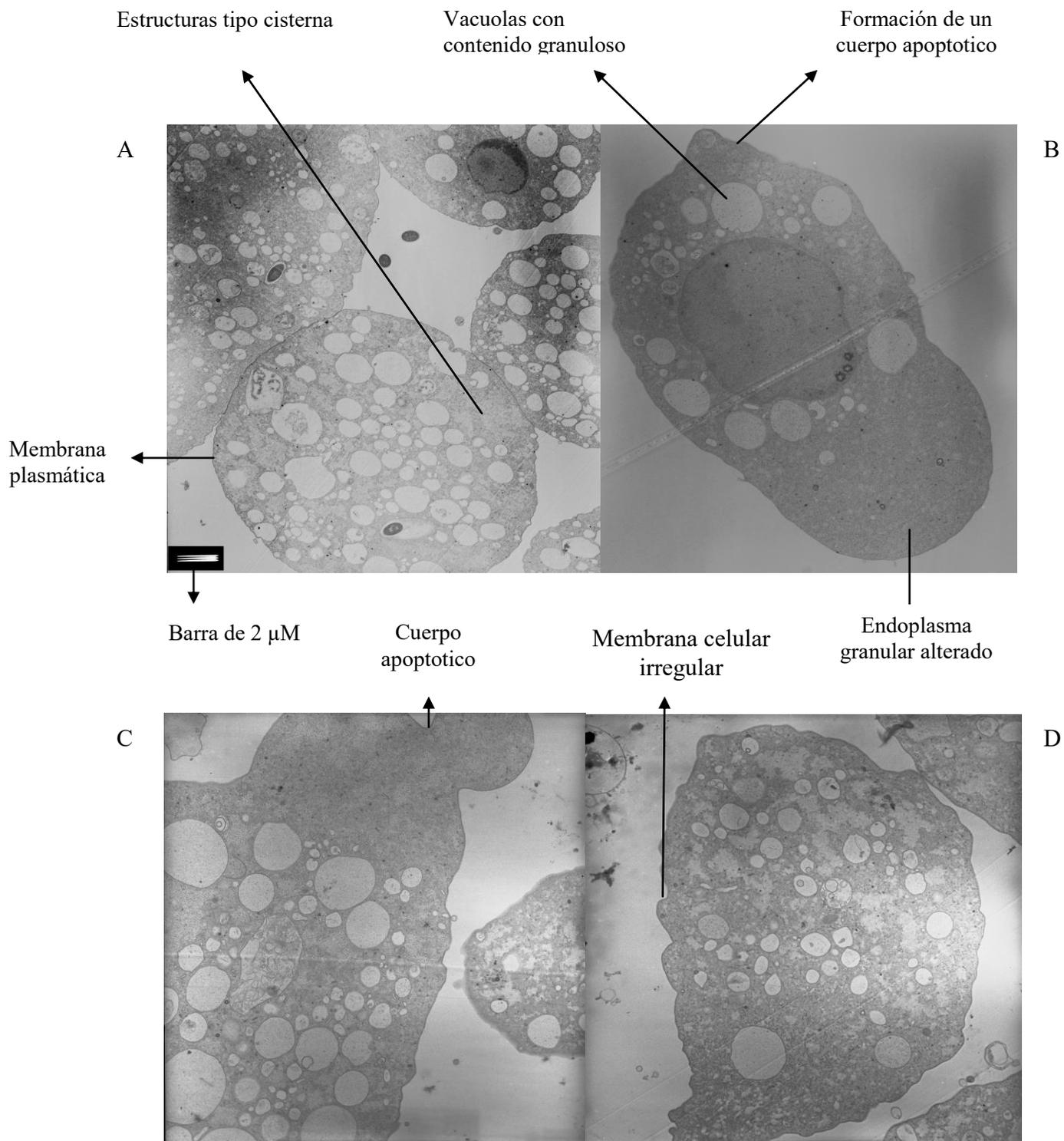


Figura 16. MET de trofozoítos de *E. histolytica* sin tratamiento (A) o tratados con 15 μM de Lfcina-b por 1h (B, C y D).

Por su parte, los trofozoítos tratados con Lfcina presentaron alteraciones en la membrana plasmática, como gran cantidad de ondulaciones tipo “bebling” (Figura 17 B y D). También se observan de mayor tamaño

las vacuolas y con gran cantidad de material granular de origen desconocido. Al igual que con LFcín-b, en este caso también se observa la formación de abundantes cuerpos apoptóticos (Figura 17 B y C), comparación con las amibas sin tratamiento (Figura 17 A).

Por último, los trofozoítos que estuvieron bajo el tratamiento con LFampina presentaron daños ligeros en la membrana (pequeños surcos) acompañados de la formación muy evidente de cuerpos apoptóticos (Figura 18 B y C). En el endoplasma, en este caso, el número de vacuolas se vio incrementado (alrededor de un 48%), con disminución en el volumen de éstas y gran cantidad de contenido granular en muchas de ellas (Figura 18 B, C y D). El gran contenido de vacuolas pequeñas, puede suponer un proceso de autofagia, el cual ocurre usualmente durante el proceso de apoptosis (Villalba M., et al, 2011). Además, se observaron restos celulares (Figura 18 B y C) esto en comparación con los trofozoítos sin tratamiento (Figura 18 A).

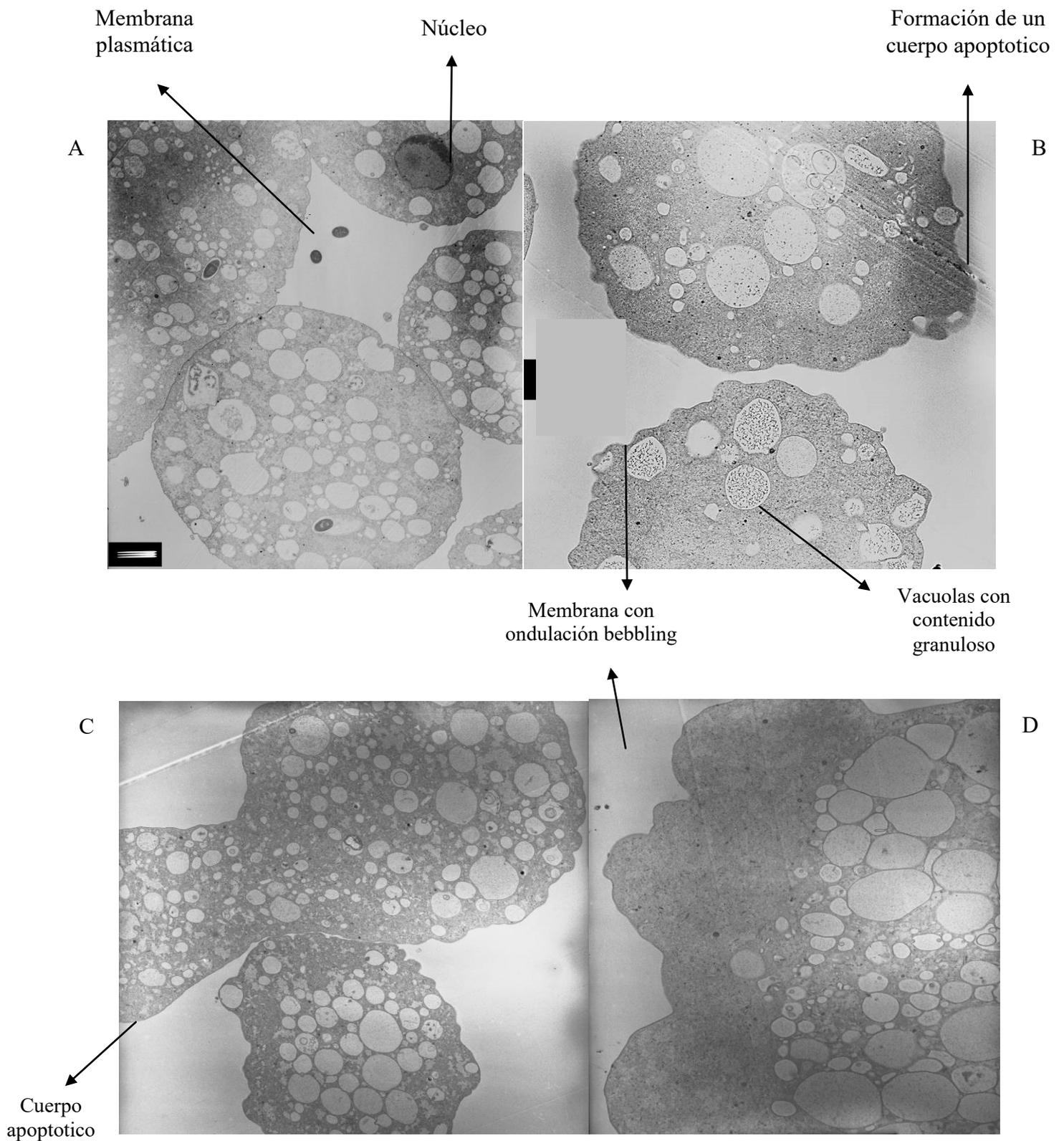


Figura 17. MET de trofozoítos de *E. histolytica* sin tratamiento (A) o tratados con 15 μ M de Lfcina por 1h (B, C y D)

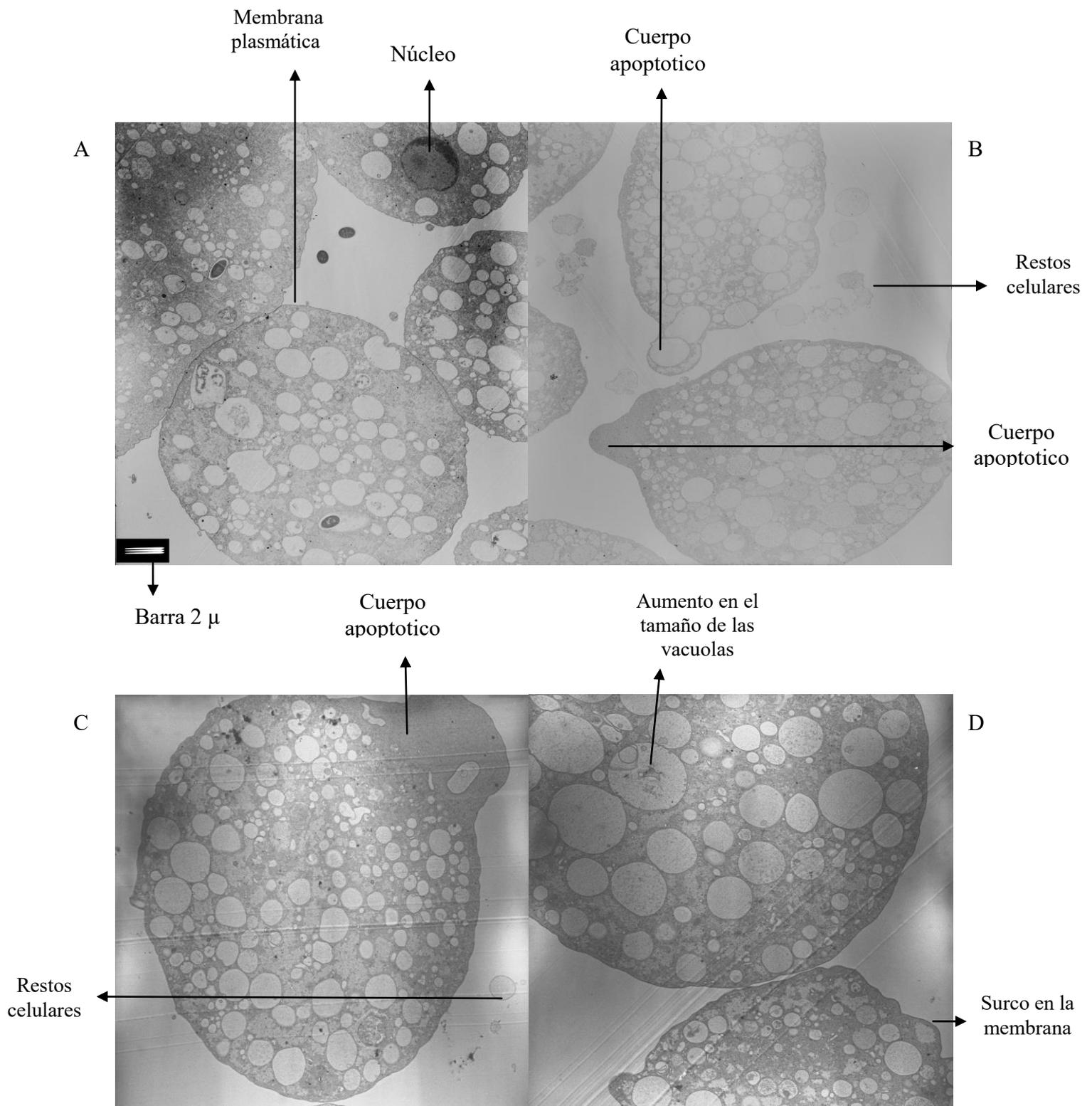


Figura 18. MET de trofozoítos de *E. histolytica* sin tratamiento (A) o tratados con 15 μ M de Lfampina por 1h (B).

5.6 Resultados de Ensayos de Apoptosis.

Para obtener el porcentaje de amibas que mueren por apoptosis, necrosis y apoptosis/necrosis, 10,000 amibas fueron tratadas con los tres péptidos por separado por 1h, se tiñeron con un kit de Anexina V/Yoduro de propidio y se contaron 100 de éstas bajo microscopía de luz UV. Las células teñidas en verdes indicaban apoptosis, rojas necrosis y verdes-rojas apoptosis/necrosis. Los resultados del tipo de muerte celular y porcentajes son mostrados en la tabla 1

Tabla 1. Resultados en (%) de los ensayos de apoptosis con cada uno de los péptidos y sus concentraciones.

Péptido	Nt	Lfcina-b		Lfcina		Lfampina	
Concentración μ M	0	5	25	5	25	5	25
Apoptosis	1	91	89	88	84	85	78
Necrosis	0	9	11	10	12	15	10
A/N	0	0	0	2	4	0	12

Nt: Amibas no tratadas.

A/N: Apoptosis/Necrosis.

Como se observa en la tabla 1, los tres péptidos inhiben el crecimiento de los trofozoítos virulentos por apoptosis entre un 85-90 %, por necrosis entre un 9-15 %, y de este estudio resalta el péptido LFampina a la concentración de 25 μ M que inhibe el crecimiento en un 12 % de los trofozoítos virulentos por apoptosis/necrosis.

En las imágenes de la figura 19 se observan los trofozoitos bajo la concentración 5 μ M con Lfcina-b (Figura 19 C y D) o Lfcina (Figura 19 E y F) o LFampina (Figura 19 G y H) en contraste con los trofozoitos sin tratamiento (Figura 19 A y B). En la columna con luz normal se muestra la presencia de los trofozoitos y en la columna con luz UV se muestran los trofozoitos bajo el tratamiento con cada uno de los tres péptidos más Annexin V que florecen en color verde e indica que murieron por apoptosis, y con Yoduro de propidio para detectar la fluorescencia en color rojo, lo que indica una muerte por necrosis, y en ambos colores una muerte por apoptosis/necrosis. En todas las fotos de la Figura 19 en la columna luz UV la intensidad de la fluorescencia es baja, esto puede deberse a la concentración de 5 μ M suministrada de cada uno de los péptidos.

En las imágenes de la figura 20 se observan los trofozoitos bajo la concentración 25 μ M con Lfcina-b (Figura 20 K y L) o Lfcina (Figura 20 M y N) o Lfampina (Figura 20 O y P) en contraste con los trofozoitos sin tratamiento (Figura 20 I e J). En la columna con luz normal se muestra la presencia de los trofozoitos y en la columna con luz UV se muestran los trofozoitos bajo el tratamiento con cada uno de los tres péptidos más Annexin V en color verde, indicando muerte por apoptosis, y con Yoduro de propidio en color rojo, indicando muerte por necrosis, o en ambos colores indicando muerte por apoptosis/necrosis. En la columna luz UV la fluorescencia de los trofozoitos virulentos se notó mas intensa, esto se puede deber a la concentración de 25 μ M de cada péptido.

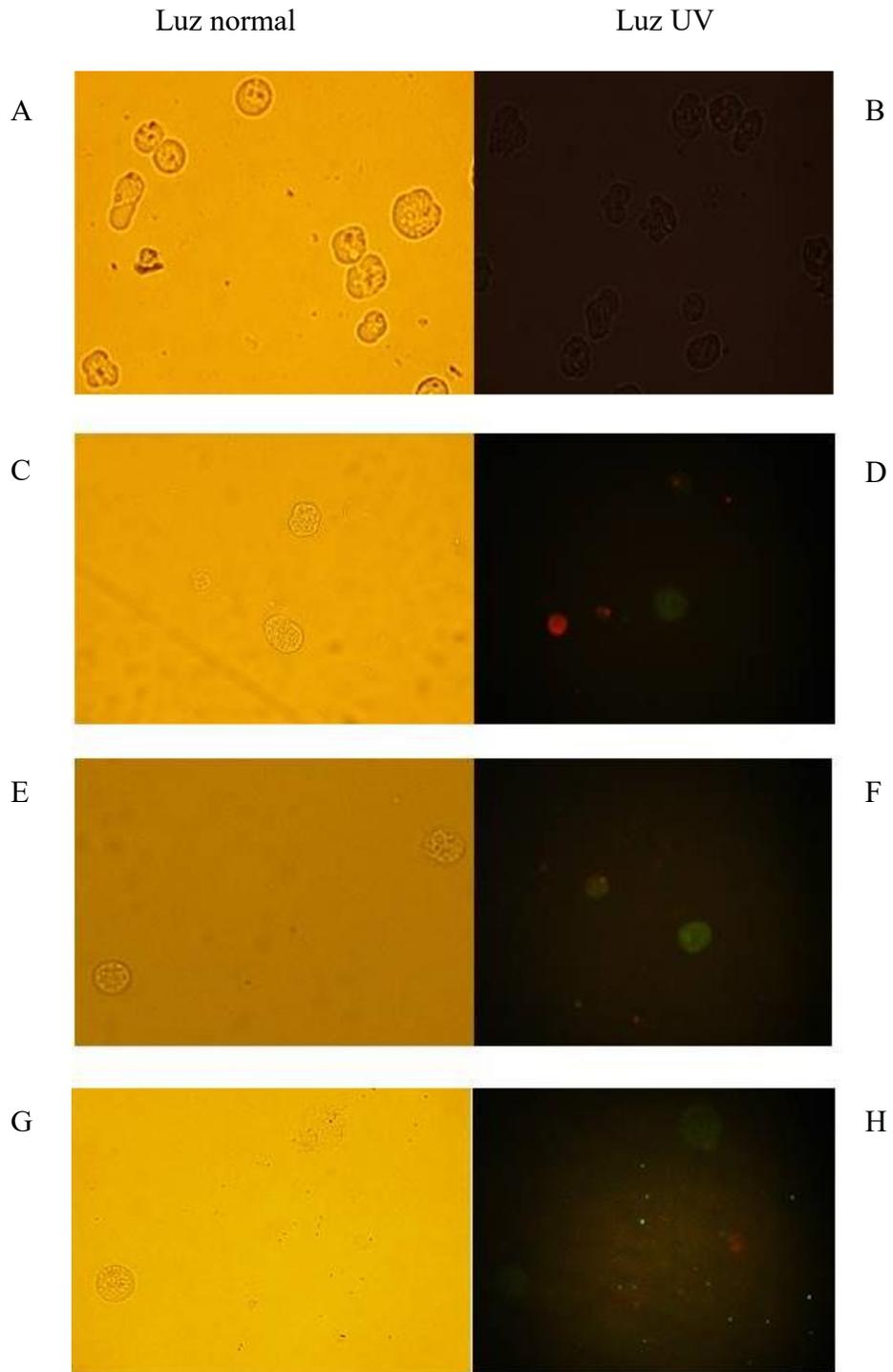


Figura 19. Trofozoítos de *E. histolytica* bajo el tratamiento de 5 μ M con cada uno de los péptidos y fluorocromo para detectar apoptosis (verde), necrosis (rojo) o apoptosis necrosis (verde y rojo)

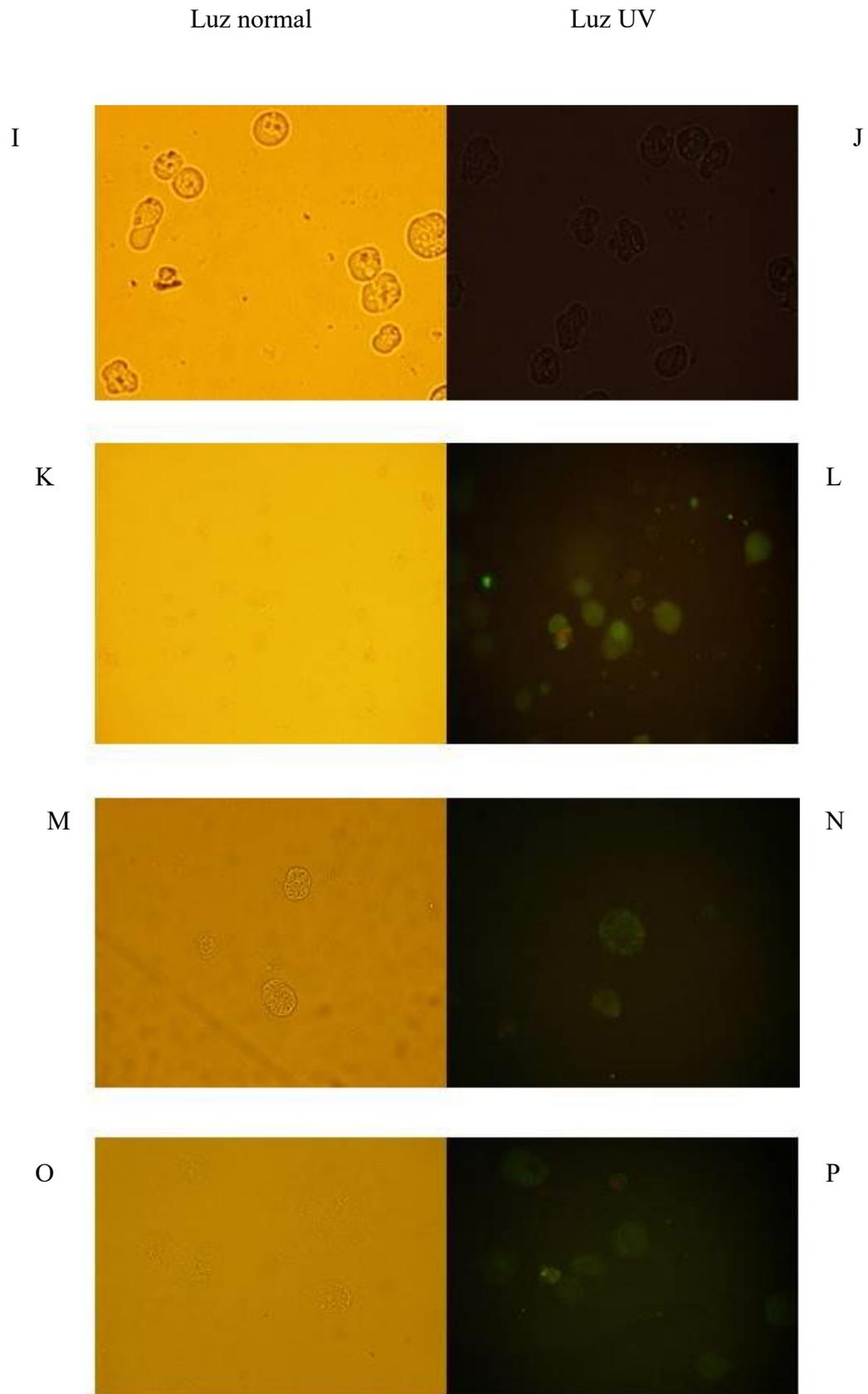


Figura 20. Trofozoítos de *E. histolytica* bajo el tratamiento de 25 μ M con cada uno de los péptidos y fluorocromo para detectar apoptosis (verde), necrosis (rojo) o apoptosis necrosis (verde y rojo)

6. Discusión y Conclusión.

Los péptidos derivados de la Lf, Lfcina, Lfcina-b y LFampina, mostraron una potente actividad amebicida en los ensayos *in vitro*, que dependen ligeramente de la concentración y exposición en tiempo. Su efectividad y rapidez para matar a las amibas es mediada por procesos de apoptosis y necrosis, que se evidencian en las fotografías con MET de los trofozoítos al observar la formación de cuerpos apóptoticos y cambios en la estructura de la membrana, en microscopía confocal por la fragmentación nuclear y por la fluorescencia de las células con anexinaV /Yoduro de propidio. Además, los resultados sugieren que la ruta que utilizan los péptidos para inducir la muerte celular en la amiba es independiente de la vía endocítica. La actividad amebicida de los péptidos, tuvo una ligera diferencia con el péptido LFampina, pues resultó más eficaz en disminuir la viabilidad y su mecanismo al inducir muerte fue más elevado por la vía de apoptosis/necrosis. Esto se puede deber a que la muerte se origina por una lesión aguda irreversible, causada por el péptido, lo que ocasiona en la amiba una situación no fisiológica incontrolable, como lo explica Domínguez-Fernández, 2012. De hecho, la muerte celular programada por apoptosis en *E. histolytica* ha sido reportada, pero utilizando compuestos amebicidas distintos, como lo es la gentamicina a través de la inducción de altos niveles de EROs (D'Artagnan-Villalba y cols, 2007) y el resveratrol a concentraciones de 72 a 220 μM en un periodo de 48 h de incubación en estudios *in vivo* e *in vitro*, en estos trabajos se analizaron también la morfología de los trofozoítos(Pais Morales y cols. 2016).

Los AMP's derivados de Lf, y ésta misma, han sido utilizados en diversos estudios *in vitro* con microorganismos patógenos, como lo son *S. aureus* y *E. coli* en sus versiones multiresistentes a fármacos, con los que se ha logrado inhibir su crecimiento utilizando las concentraciones de 10 y 40 μM (Flores-Villaseñor, et al, 2010). Además, se ha demostrado que estos AMP no son tóxicos en

animales, y forman parte de la dieta diaria de los humanos al ser ingeridos a través de productos lácteos, o sintetizados de forma natural dentro del organismo, como el caso de la Lfcina. Principalmente, la Lf ha sido propuesta como un posible tratamiento contra enfermedades parasitarias en humanos y como medicamento de uso veterinario (Bruni, *et al*, 2016). Ante lo anterior, propongo que los péptidos utilizados en esta investigación, sean evaluados en un modelo *in vivo* utilizando la misma variante virulenta de *E. histolytica* para comprobar su eficacia y toxicidad.

Los resultados obtenidos en esta investigación son parcialmente comparables con los obtenidos por López-Soto y cols., 2010. En su estudio, ellos observaron la muerte de amibas con Lfcina y LFampina a concentraciones mayores a 50 μM a partir de 60 min de incubación. En nuestro caso, nosotros observamos un efecto más contundente con los mismos péptidos, matando a las amibas en tan sólo 5 minutos a concentraciones 10 veces menores. La razón de esta discrepancia se desconoce, pero podría tener que ver con el hecho de que ellos usaron trofozoítos de la variante no virulenta de *E. histolytica*, mientras en este trabajo se usó una variante virulenta, recién aislada de abscesos hepáticos en hámsteres, lo que podría haberlas hecho más sensibles a los péptidos, aunque por la exposición al hospedero podría esperarse lo contrario. Es necesario llevar a cabo estudios de la susceptibilidad de amibas a los péptidos con diferente grado de virulencia al mismo tiempo para poder resolver esta interrogante. Por otra parte, en esta investigación se describe por primera vez la actividad de la Lfcina-b contra un patógeno, un nuevo péptido derivado de la Lfcina bovina, que resultó ser ligeramente mejor en su actividad anti-amiba que la Lfcina. Así, aunque los 3 péptidos fueron altamente eficientes en su actividad amebicida, podemos decir que el efecto fue más eficaz en el siguiente orden: LFamina>Lfcina-b>Lfcina. En este sentido, y debido a la alta actividad amebicida de los péptidos, sería interesante en un futuro estudio determinar la capacidad amebicida de la combinatoria de los 3 péptidos, lo que podría llevar al uso de concentraciones mucho más pequeñas en caso de efecto sinérgico. Además, sería interesante evaluar el efecto de la adición de los péptidos al tratamiento estándar con MTZ.

Con base en lo anterior, los péptidos Lfcina-b o Lfcina o Lfampina pueden ser propuestos como un tratamiento individual o en combinación para la amibiasis, o como adyuvantes en el uso de otros medicamentos, incluido el MTZ, para contrarrestar sus efectos secundarios y carcinogénicos, pues mostraron una potente actividad amebicida contra los trofozoíto virulentos de *E. histolytica* en tiempos tempranos y a bajas concentraciones.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

Asp: Ácido Aspártico.

ARN: Ácido Ribonucleico.

aa: Aminoácidos

bLf: Lactoferrina bovina.

bLfc: Lactoferricina bovina.

kDa: Kilo Dalton.

ERO's: Especies Reactivas del Oxígeno.

TNF: Factor de Necrosis Tumoral.

Ile: Isoleucina.

IL1: Interleucina 1.

IgA: Inmunoglobulina A.

IgE: Inmunoglobulina E.

IgG: Inmunoglobulina G.

IgM: Inmunoglobulina.

iNOS: Sintetasa inducible del óxido Nítrico.

Leu: Leucina.

Lf: Lactoferrina.

Lfchimera: Lactoferrampina quimera.

Lfc: Lactoferricina.

LFampin: Lactoferrampina.

LfcH: Lactoferricina Humana.

MHC I: Complejo Principal de Histocompatibilidad.

MTZ: Metronidazol.

MLIF: Inhibición de la locomoción de monocitos.

NK: Natural Killer.

PAM: Péptidos Antimicrobianos.

PAMP's: Patrones moleculares asociados a patógenos.

pH: Potencial de Hidrógeno.

TLR's: Toll Like Receptors.

TYI-S-33: Tripticasa levadura hierro suero

VAC: Vía alterna del Complemento.

μ M: Micro molar.

Apéndice.

Medio TYI-S-33 500ml.

Biosate	15g
Glucosa	5g
NaCl	1g
KH ₂ PO ₄	0.3g
K ₂ HPO ₄	0.5g
L-Cisteína	0.5g
A. Ascórbico	0.1g
Citrato Férrico	0.114g
Agua miliQ	410ml

Hidratado en agitación suave a pH= 6.8, ajustado con NaOH 1N.

Suplementado con 16% de suero adulto bovino (De Laboratorios Microlab México), Vitaminas 3% (Mezcla de vitaminas Diamond de Sigma-Aldrich) y Antibióticos 5%.

Buffer salino de fosfatos. PBS 100ml 1X

NaCl	8.006g
KCl	0.20 g
Na ₂ HPO ₄	0.612 g
KH ₂ PO ₄	0.19 g

Hidratado en agitación suave a pH=7.4, ajustando con NaOH 1N.

Anticuerpos utilizados para Microscopia confocal.

Los siguientes tres son utilizados para la sublocalización de endosomas tempranos y su fluorescencia es color rojo.

-Anticuerpo primario; antiEA1-Early endosomas/ (EEA1) 1:50Rabbit.

Antimarose 6-fosfato receptor (MPR) 1:50 Mouse monoclonal

Antilisosoma LAMP-2/ Anti LAMP 1:50 Rabbit

Los siguientes dos son para la sublocalización de endosomas tardíos y su fluorescencia es color rojo

-Anticuerpo secundario: Anti Mouse TR/TC 1:100

Anti Rabbit TRITC 1:100

-TOPRO^R-3 DILUCIÓN 1:100 EN PBS. Su color puede observarse azul, utilizado como contratinción de los núcleos.

Kit de Apoptosis-Necrosis “Technical Data Sheet FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I”

Volumen inicial de reactivos:

-Annexin V 1ml

-Buffer de Unión 50 ml concentrado al 10X.

-Yoduro de Propidio 2ml

Para cada ensayo se prepararon: 500µl de Buffer de unión

50µl de Annexin V

50µl de Yoduro de Propidio

Bibliografía.

Adão R., Nazmi K., Bolscher J.G.M. & Bastos M., (2011), C- and N-truncated antimicrobial peptides from LFampin 265–284: Biophysical versus microbiology results, *Journal Pharm Bioallied*; 3(1):60–69.

Arffa Robert C., (1999), *Enfermedades de la córnea*, 4ed., Grayson, Harcourt Brace de España, España.

Bastidas Oscar, Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting, Celoromics, consultado 24/01/2016, Disponible en: <http://celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>

Barrón González M. P., (2002), *Inducción in vitro de formas semejantes a quistes en cultivos axénicos de Entamoeba histolytica.*, Tesis de doctorado Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza Nuevo León, México. pp.9.

Bendesky A. & Menéndez D., (2001), Metronidazol: una visión general, *Medigraphic Revista Facultad de Medicina UNAM*, Vol. 44, No.6.

Bergstrom K.S.B., Kissoon-Singh V., Gibson D.L. *et al* (2010) Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog* 6(5):e1000902

Bolscher J., Nazmi K., Van't Hof W., Veerman E., (2012), Chimerization of lactoferricin and lactoferrampin peptides strongly potentiates the killing activity against *Candida albicans*, *Biochemistry and Cell Biology-NRC Research Press*, 90:378-388.

Bos H.J. & Van de Griend R.J., (1977) Virulence and toxicity of axenic *Entamoeba histolytica*. *Nature* 265(5592):341–343

Bruni N, *et al*, (2016), Antimicrobial activity of Lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine, *Molecules* 11, 21(6).

Caballero Salcedo A. *et al.*, (1994) Seroepidemiology of amebiasis in México. *Am J Trop Med Hyg.* 50(4):412-9. PubMed PMID: 8166347

Campos Góngora E., (1996), Incremento de la síntesis de quitina en quistes de *Entamoeba histolytica* por efecto de Mg, Mn y Co., Tesis de Maestria Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Cantellano Espinosa & Martínez-Palomo (2000). Recent development in amoebiasis research. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 13(5):451-456.

Carrero Sánchez J.C., *et al*, (1994), Human secretory immoglobulin A anti-*Entamoeba histolytica* antibodies inhibit adherence of amebae to MDCK cells, *Infection and Immunity* Vol.62 No.2 pp.764-767.

Carrero J.C., Aguilar-Díaz H. Díaz-Gallardo, Laclette J.P., & Morales-Montor J., (2007), The role of the secretory immune response in the infection by *Entamoeba histolytica*., *Parasite Immunol* 29(7): 331-338.

Córdoba Villalobos J. & De la Torre Bravo A., (2009), *Procedimientos Endoscópicos en Gastroenterología*, 2ed., Medica Panamericana, México, D.F., pp.242.

Chacín-Bonilla L., (2012), Farmacoterapia actual de la amibiasis, avances en nuevas drogas y diseño de una vacuna, *InvestClin* (3) pp.301-314.

Chan David I., *et al*, (2006), Tryptophan and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, Elsevier, Vol. 1758:9, pp. 1184, 1202.

Cruz B.C, Sarrazola S.M. & Laclette J.P., (2010), Análisis de la población de células T reguladoras Foxp3 en el modelo murino de amibiasis intestinal, (fecha de consulta: 17 de julio de 2016) Disponible en:http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portaIIIG/home_10/recursos/general/pag_contenido/publicaciones/bistua_revista_ciencias_basica/2008_1/15042010/art_02.pdf

D'Artagnan Villalba, *et al*, (2007), Programmed cell death in *Entamoeba histolytica* induced by the aminoglycoside G418, *Microbiology* Vol. 153 pp.3852-3863.

Drago Serrano M., (2007), Lactoferrina: producción industrial y aplicaciones, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(3), pp.30-38.

Delgadillo D. M., (en línea), (2003), Resistencia a múltiples drogas, un mecanismo de evasión celular ante los tratamientos quimioterapéuticos, (fecha de consulta: 26 de junio de 2016), Difusión UAM. Disponible en: < <http://www.uam.mx/difusion/revista/nov2003/delgadillo.pdf>>

Domínguez Fernández T., (2012), Análisis Proteómico de la Apoptosis en *Entamoeba histolytica*., Tesis de Maestría Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, México DF.

Flores-Villaseñor H., *et al*, (2010), Bactericidal effect of bovine Lactoferrin, LFcin, LFpin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*., Springer Science + Bussines Media, Biometals 23:569-578.

García M., González I., Henríquez M. & Jhon J., (2015), Evaluación del diagnóstico de amibiasis en laboratorios notificantes del estado Carabobo. Salus, vol. 19, núm. 1, abril, 2015, pp. 22-28, Universidad de Carabobo Bárbula, Venezuela.

González Vázquez M.C., *et al*, (2012), De amibas y amebiasis: *Entamoeba hitolytica*, Revista Elementos No. 87, pp. 13-18.

Guerra Solís I. A. & Guerra Herbas R. D., (2006), Respuesta al tratamiento antiamebiano y anti giardiásico en el Instituto de Gastroenterología boliviano japonés de Cochamba., Scielo Gaceta Medica Boliviana Vol. 29, No.1, Versión en línea: ISSN 1012-2966.

Guyen Y.N. & Baumard S., (2013), Tetraciclinas, Glicilciclinas, Elsevier Masson, 17, No.1, pp.3

Haney E.F., Nazmi K, Bolscher J.G. & Vogel H.J., (2012), Structural and biophysical characterization of an antimicrobial peptide chimera comprised of lactoferricin and lactoferrampin, *Biochimica et Biophysica Acta*, Elsevier, pp762-775.

Kammanadiminti S.J., Chadee K. (2006) Suppression of NF- κ B activation by *Entamoeba histolytica* in intestinal epithelial cells is mediated by heat shock protein 27. *J Biol Chem* 281(36):26112– 26120

Kruzel L.M., Jeffrey K.A., Istvan B., Michael Z., (2007), Lactoferrin in Health and Disease, *Postepy Hig Med Dosw*, 61:262-267

León Sicairos N. & De la Garza A., (2006), Papel amebicida de las proteínas de la leche humana, *Imbiomed* 1(3):19-23.

Lidell M.E., Moncada D.M., Chadee K. & Hansson G.C., (2006) *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(24):9298–9303

López-Soto F., León Sicarios N., Kamran N. & Bolscher G.J., (2010), Microbicidal effect of the Lactoferrin peptides Lactoferricin 17-30, Lactoferrampin 265-284, and Lactoferrin chimera on the parasite *Entamoeba histolytica*., Springer Science + Bussines Media, *Biometals* 23:563-568.

Makiuchia T, Nozaki T. Highly, (2014) Divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie*,100:3–17.

Martínez de Tejada de Garaizabal Guillermo, (2012), Diseño racional de péptidos derivados de lactoferricina humana con actividad permeabilizante mejorada y capacidad de producir permeabilidad asociada al efecto postantibiotico, Facultad de Ciencias-Universidad de Navarra, Pamplona España.

Mendoza Patiño N., (2008), Farmacología Médica, Médica Panamericana: Facultad de Medicina UNAM, México D.F. pp.675

Montaño Pérez K. & Vargas Albores F., (2002), Péptidos Antimicrobianos: un mecanismo de defensa central con mucho futuro., Interciencia Vol.27:1 pp.21-27.

Nissen-Meyer J., Nes I.F., (1997) Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: Their function, structure, biogenesis and mechanism of action. Arch. Microbiol. 167: 67-77.

Olivera Rivero M. (2014), Amebic Liver Abscess. Case Report, M.D., M.Sc Grupo Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C., Instituto de Investigaciones Clínicas, Universidad Nacional de Colombia.

Olivos García A., *et al*, (2011), Amibiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de Entamoeba histolytica, Revista de la Facultad de Medicina, UNAM, Vol.54:2, pp.10-20.

Orozco Esther, *et al*, (2002), La resistencia a múltiples drogas (MDR) en Entamoeba histolytica, Invest Clin 54(4): 349-356.

Pais Morales J., Betanos A., García Rivera G., Chavez Munguía B., Shibayana M., Orozco E., (2016), Resveratrol induces apoptosis-like death and prevents in vitro in vivo virulence of *Entamoeba histolytica*, Plos One 11(1).

Pérez T.E., Abdo F.J.M., Bernal S.F., Kershenovich S.D., (2012), Gastroenterología, Mc Graw Hill Companies, México, D.F.

Perez-Trallero D. V., (2010), Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol, Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica: Elsevier Doyma., No.28:2 pp. 122-130.

Pertuz Belloso S. & Flores-Romo L., (2004), Mini Revisión: Papel de la respuesta inmune celular en la resolución de la amibiasis., Medigraphic Bioquímica Vol. 29, No.3, pp.91-98.

Ravdin I. J., (2000), Amibiasis, Tropical Medicine Science and Practice Volume 2., G Pasvol and SL Hoffman Imperial College Press., pp.25

Rodríguez-Franco A., Vázquez M. L., & Ramos C.M., (2005), Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. Revista Latinoamericana de Microbiología, 47(3-4), pp.102-111

Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología (DGE), en línea: Anuarios de Morbilidad Información Epidemiológica 1984-2014. (Fecha de consulta: 14 de Mayo de 2016) Disponible desde internet:<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2014/morbilidad/nacional/distribucion_casos_nuevos_enfermedad_grupo_edad.pdf>

Sicarios León N., López Reyes M. & De la Garza M., (2006), Lactoferrina: Proteína de la leche con actividad emebicida en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HM1: IMSS. Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN,D.F., México.

Sicairos León N., *et al*, (2012), Oral lactoferrin treatment resolves amoebic intracecal infection in C3H/HeJ mice., *Biochemistry and Cell Biology* 90(3): 435-441.

Sinha M., Kaushik S., Kaur P., Sharma S., Singh T.P., (2013), Antimicrobial Lactoferrin Peptides: The Hidden Players in the Protective Function of a Multifunctional Protein, *International Journal of Peptides*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3608178/>

Shai Y. (1998) Mode of action of antibacterial peptides. In Hultmark PTBaD (ed), *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. Chapman & Hall. London. pp.111-131

Suzuki, Y. A., López, V. & Lonnerdal, B. (2005), Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell Mol.Life Sci.*, 62 2560-2575.

Tellez Alberto G. & Castaño Carlos J., (2010), Péptidos Antimicrobianos, *Infectio* 14(1) pp. 55-67

Tortora G. J., Berdell R. Funke & Case C., (2007), *Introducción a la Microbiología*, 9ed., Medica Panamericana, Buenos Aires.

Thibeaux R., Weber C., Chung-Chau H., Marie-Agnes D., Avé P., Coppeé Y., *et al*, (2013) Identification of the Virulence Landscape Essential for *Entamoeba histolytica* Invasion of the Human Colon. *PLoS Pathog* 9(12): e1003824.

Tsutsumi Atsushi† N, Javkhlantugs,† A. Kira,‡ M. Umeyama,† I. Kawamura,† K. Nishimura, K. Ueda,† A. Naito, (2012), Structure and Orientation of Bovine Lactoferrampin in the Mimetic Bacterial Membrane as Revealed by Solid-State NMR and Molecular Dynamics Simulation, Biophys Journal, Elsevier, 103(8), pp.1735-1743.

Vega Robledo B. G., (2008), Inmunología para el médico general, Medigraphic Revista Facultad de Medicina UNAM Vol. 51, No.3.

Villaba Magdaleno M.D., In vivo programmed cell death of *Entamoeba histolytica* trophozoites in a hamster model of amoebic liver abscess, Microbiology 157(5):1489-1499.

Villafañe Montoya H. H., (2008), Microbiología básica para el área de la salud y afines, 2ª ed., Universidad de Antioquia, Medellín Colombia.

Wassmann C., Helberg A., Taniche E. & Bruchhaus I., (1999), Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* Is Associated with increased expression of Iron-containing superoxide dismutase and piroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase., The Journal of Biological Chemistry Vol. 274No. 37, pp26051-26056.

Wook Kim D., *et al*, (2004), Metronidazole-induced encephalopathy, Journal of the Neurological Sciences Elsevier 224, pp.107-111. .

Figura 1. Tomada de InDRE (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica),(2016), Disponible en: http://www.indre.salud.gob.mx/interior/intd_index.html Laboratorio de Enteroparásitos y amibas de vida libre (Técnicas microscópicas).

Figura 2. Biól. J. Tay Zavala, Facultad de Medicina, UNAM, Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx> Depto. de Microbiología y Parasitología.

Figura 3. Tomada de Centers for Disease Control and Prevention (CDC), (2016), Disponible en: <http://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/pathogen.htm>