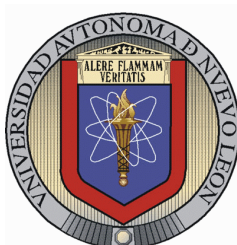


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y MEDICINA MOLECULAR**



**“Expresión de factores de virulencia de *Entamoeba histolytica* en un nuevo modelo experimental”**

**POR:**

**Q.B.P. MARÍA GUADALUPE SANTIAGO MAURICIO**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de Maestría en Ciencias con Orientación Terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

**MONTERREY, N.L.**

**ENERO DEL 2010**

**“Expresión de factores de virulencia de *Entamoeba histolytica* en un nuevo modelo experimental”**

**Aprobación de tesis:**

---

Dra. Rocío Ortiz López  
**(Directora de Tesis)**

---

Dra. María del Pilar Carranza Rosales  
**(Directora Externa)**

---

Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez  
**(Co- Directora de Tesis)**

---

Dr. Med. Dionicio A. Galarza Delgado  
**(Subdirector de Estudios de Posgrado)**

**“Expresión de factores de virulencia de *Entamoeba histolytica* en un nuevo modelo experimental”**

Presentado por:

Q.B.P. María Guadalupe Santiago Mauricio

Este trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo de la dirección interna de la Dra. Rocío Ortiz López y la co-dirección de la Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez, y en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste IMSS bajo la dirección externa de la Dra. María del Pilar Carranza Rosales.

## **AGRADECIMIENTOS**

**Quiero expresar mi mayor agradecimiento a:**

**Dra. Rocío Ortíz López.**

Por haber aceptado dirigir esta tesis, por la confianza brindada y por sus valiosas sugerencias para la realización de la misma.

**Dra. María del Pilar Carranza Rosales.**

Por creer en mí, por todo su apoyo, la paciencia, sus enseñanzas constantes, pero sobre todo por su amistad.

**Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez.**

Por su disponibilidad, apoyo en todo momento y por formar parte de mi comisión de tesis.

**Dra. Nancy Guzmán Delgado.**

Por sus apoyo constante, disponibilidad y por la amistad brindada.

**A mis compañeros y amigos.**

**Melisa, Karina, Clara, Gissela, Diana, Martha, Yenny, Edith, Consuelo, Coco Charly, Arturo, Rafael, Mauricio, Armando, Gerardo, Ezequiel, Samuel.**

Por estar siempre a mi lado, y no dejarme caer. Gracias por su apoyo en todo momento.

## **DEDICATORIA**

A mi Familia:

Gracias por todo el apoyo brindado a lo largo de mi vida, por su orientación, confianza, paciencia, el cariño que me han mostrado y la alegría que han dado a mi vida.

Principalmente dedico esta tesis a mis padres y abuelos:

**Domingo Santiago del Ángel y Ciria Mauricio Santiago.**

**Hermenegilda y Alfonso; Rufina y Cosme.**

| CAPITULO | ÍNDICE  | PAGINA |
|----------|---|--------|
|          | <b>LISTA DE FIGURAS</b>   | I      |
|          | <b>LISTA DE TABLAS</b>  | II     |
|          | <b>ABREVIATURAS</b>   | III    |
|          | <b>RESUMEN</b>  | V      |
| 1        | <b>INTRODUCCIÓN</b>   | 1      |
| 2        | <b>ANTECEDENTES</b>   | 3      |
|          | 2.1 ABSCESO HEPATICO AMIBIANO (AHA)                                   | 3      |
|          | 2.2 MODELOS PARA EL ESTUDIO DE AHA                                    | 4      |
|          | <b>2.2.1 Modelos <i>in vitro</i></b>                                  | 4      |
|          | <b>2.2.2 Modelos <i>in vivo</i></b>                                   | 5      |
|          | 2.2.2.1 Hámster   | 5      |
|          | 2.2.2.2 Gerbos  | 6      |
|          | 2.2.2.3 Ratones   | 6      |
|          | <b>2.2.3 Descripción del AHA en el modelo del hámster</b>             | 7      |
|          | 2.3 APOPTOSIS   | 9      |
|          | 2.4 FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Entamoeba histolytica</i>            | 10     |
|          | <b>2.4.1 Cistein-Proteinasas</b>                                      | 11     |
|          | <b>2.4.2 Amebaporo</b>  | 12     |
|          | 2.5 RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL ABSCESO HEPATICO AMIBIANO (AHA)      | 13     |
|          | 2.6 MODELOS ALTERNATIVOS EN INVESTIGACIÓN                             | 15     |
|          | <b>2.6.1 Modelo de Rebanadas de Tejidos</b>                           | 16     |
|          | 2.6.1.1 Aplicaciones de las Rebanadas de Hígado                       | 17     |
|          | <b>2.7 ANTECEDENTES PARTICULARES</b>                                  | 18     |
| 3        | <b>JUSTIFICACIÓN</b>  | 20     |
| 4        | <b>HIPÓTESIS</b>  | 21     |
| 5        | <b>OBJETIVOS</b>  | 22     |
|          | 5.1 OBJETIVO GENERAL  | 22     |
|          | 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS   | 22     |
| 6        | <b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>  | 23     |
| 7        | <b>ÁREA FISICA DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO</b>                     | 24     |
| 8        | <b>MATERIALES</b>   | 25     |
|          | 8.1 MATERIAL BIOLÓGICO  | 25     |
|          | 8.2 ORIGEN DEL MATERIAL DE USO GENERAL                                | 26     |
|          | 8.3 ORIGEN DE LOS REACTIVOS   | 26     |
|          | 8.4 EQUIPO  | 27     |
| 9        | <b>METODOLOGÍA</b>  | 28     |
|          | 9.1 OBTENCIÓN E INFECCIÓN DE REBANADAS DE HÍGADO DE HAMSTER           | 28     |
|          | 9.1.1 Obtención de hígado de hámster                                  | 28     |
|          | 9.1.2 Preparación de rebanadas de hígado de hámster                   | 28     |
|          | 9.2 INFECCIÓN DE LAS REBANADAS DE HÍGADO DE HÁMSTER                   | 29     |
|          | 9.3 ANÁLISIS MORFOLÓGICO  | 29     |
|          | 9.3.1 Técnica histológica   | 29     |
|          | 9.4 DETECCIÓN DE APOPTOSIS  | 30     |
|          | 9.4.1 Inmunohistoquímica para el análisis de apoptosis mediante TUNEL | 30     |

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | 9.4.2 Tinción del Acido Peryódico de Schiff   | 30 |
|    | 9.5 ANÁLISIS MOLECULAR  | 31 |
|    | 9.5.1 Extracción de RNA Total   | 31 |
|    | 9.5.2 Obtención de cDNA mediante la técnica de RT-PCR   | 32 |
|    | 9.5.3 Diseño de iniciadores para el análisis de expresión de genes amibianos  | 33 |
|    | 9.5.4 PCR punto final   | 35 |
|    | 9.5.5. PCR Cuantitativa en Tiempo Real (qPCR)   | 36 |
|    | 9.5.6 Análisis estadístico.   | 38 |
|    | 9.6 ANÁLISIS DE CITOCINAS   | 39 |
| 10 | <b>RESULTADOS</b>   | 40 |
|    | 10.1 OBTENCIÓN E INFECCIÓN DE REBANADAS DE HÍGADO DE HÁMSTER  | 40 |
|    | 10.2 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO   | 41 |
|    | 10.2.1 Secuencia de eventos morfológicos durante la infección del tejido hepático por trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> | 41 |
|    | 10.2.2. Eritrofagocitosis   | 47 |
|    | 10.2.3 Interacciones Trofozoíto-Hepatocito  | 48 |
|    | 10.2.4 Análisis histopatológico en los controles negativos  | 49 |
|    | 10.3 DETECCIÓN DE APOPTOSIS   | 50 |
|    | 10.3.1 Técnica de TUNEL   | 50 |
|    | 10.3.2. Tinción de PAS (Acido Peryódico de Schiff)  | 52 |
|    | 10.4 ANÁLISIS MOLECULAR   | 54 |
|    | 10.4.1 DETECCIÓN DE TRES FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>E. histolytica</i> POR PCR PUNTO FINAL.                                     | 54 |
|    | 10.4.2 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE qPCR.   | 55 |
|    | 10.4.2.1 Selección de concentración de la muestra.  | 55 |
|    | 10.4.2.2 Rango dinámico   | 57 |
|    | 10.4.2.3 Especificidad de amplificación   | 58 |
|    | 10.4.3 ANALISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE Ehcp1, Ehcp5 Y AMEBAPORO DE <i>E. histolytica</i> MEDIANTE qPCR           | 59 |
|    | 10.5 ANÁLISIS DE CITOCINAS  | 63 |
| 11 | DISCUSIÓN   | 65 |
| 12 | CONCLUSIONES  | 70 |
| 13 | PERSPECTIVAS  | 70 |
| 14 | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS  | 71 |
| 15 | APÉNDICE A  | 78 |
| 16 | APÉNDICE B  | 83 |

| FIGURA       | TÍTULO  | PÁGINA |
|--------------|---|--------|
| Figura No.1  | Difusión de moléculas amibianas hacia el endotelio hepático durante el desarrollo de AHA.....   | 8      |
| Figura No.2  | Fases importantes en el desarrollo de AHA.....  | 9      |
| Figura No.3  | Estrategia general .....  | 23     |
| Figura No.4  | Forma de alimentación de Hámster ( <i>Mesocricetus auratus</i> ).....   | 25     |
| Figura No.5  | Aspecto Macroscópico de rebanadas de hígado de hámster de 4 mm de diámetro.....   | 40     |
| Figura No.6  | Fotografías representativas de rebanadas control (sin amibas) incubadas durante 24 h.....   | 42     |
| Figura No.7  | Rebanadas de hígado de hámster a las 6 h de infección.....  | 43     |
| Figura No.8  | Rebanadas de hígado de hámster a las 12 h de infección.....   | 44     |
| Figura No.9  | Rebanadas de hígado de hámster 18 h de infección.....   | 45     |
| Figura No.10 | Rebanadas de hígado de hámster de 24 h de infección.....  | 46     |
| Figura No.11 | Eritrofagocitosis de <i>E. histolytica</i> en rebanadas infectadas.....   | 47     |
| Figura No.12 | Interacciones observadas entre los trofozoítos y los componentes hepáticos del hámster.....   | 48     |
| Figura No.13 | Análisis histopatológico de las rebanadas control incubadas durante los diferentes tiempos experimentales (6, 12,18 y 24 h).....  | 49     |
| Figura No.14 | Fotografía representativa de rebanadas de hígado de hámster del grupo control. Técnica de TUNEL .....   | 50     |
| Figura No.15 | Detección de apoptosis inducida por <i>E. histolytica</i> en rebanadas de hígado de hámster a distintos tiempos de infección. Técnica de TUNEL.....                               | 51     |
| Figura No.16 | Fotografías representativas utilizadas para la evaluación del índice apoptótico en rebanadas infectadas con trofozoítos de <i>E. histolytica</i> empleando la tinción de PAS..... | 52     |
| Figura No.17 | Determinación del índice de apoptosis en rebanadas infectadas con <i>E. histolytica</i> .....   | 53     |
| Figura No.18 | Identificación de los factores de virulencia de <i>E. histolytica</i> por PCR punto final   | 54     |
| Figura No.19 | Gráficas de correlación lineal para los genes de virulencia de <i>Entamoeba histolytica</i> (ehcp5, ehcp1 y amebaporo) y sus genes endógenos (18 s y actina).....                 | 56     |
| Figura No.20 | Gráficas de rango dinámico de los genes de virulencia estudiados en los ensayos de infección.....   | 57     |
| Figura No.21 | Curva de disociación de los genes ehcp1,ehcp5,amebaporo,actina y18S con picos específicos. ....   | 58     |
| Figura No.22 | Niveles de expresión de Amebaporo, Ehcp5 y Ehcp1 de <i>E. histolytica</i> en rebanadas infectadas.....  | 62     |
| Figura No.23 | Gráfica comparativa de los niveles de expresión de amebaporo, ehcp 1y ehcp5 en rebanadas infectadas con trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....                                | 63     |
| Figura No.24 | Detección de citocinas en sobrenadantes de rebanadas de hígado de hámster infectadas con trofozoítos de <i>E. histolytica</i> mediante la técnica de ELISA.....                   | 64     |



| TABLA       | TÍTULO  | PÁGINA |
|-------------|---|--------|
| TABLA No.1  | Iniciadores empleados para la detección de ehcp1, ehcp5, amebaporo y actina por PCR punto final.....                          | 34     |
| TABLA No.2  | Iniciadores empleados para la detección de actina, 18 S, ehcp1, ehcp5y amebaporo por PCR cuantitativa.....                    | 35     |
| TABLA No.3  | Medición del grosor de las rebanadas obtenidas al emplear el Rebanador Brendel -Vitron en la posición 240.....                | 40     |
| TABLA No.4  | Cuantificación relativa del gen ehcp1 usando el método comparativo Ct. * $p < 0.05$ , estadísticamente significativo.....     | 60     |
| TABLA No.5  | Cuantificación relativa del gen ehcp5 usando el método comparativo Ct. * $p < 0.05$ , estadísticamente significativo.....     | 60     |
| TABLA No.6  | Cuantificación relativa del gen amebaporo usando el método comparativo Ct. * $p < 0.05$ , estadísticamente significativo..... | 61     |
| TABLA NO. 7 | Composición del medio PEHPS.....  | 80     |

## ABREVIATURAS

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| AHA                             | Absceso hepático amibiano                   |
| HCl                             | Ácido clorhídrico                           |
| ARN                             | Ácido ribonucleico                          |
| PAS                             | Ácido Peryódico de Schiff                   |
| AP                              | Amebaporo                                   |
| PBS                             | Amortiguador salino de fosfatos             |
| KB                              | Amortiguador Krebs bicarbonato              |
| NaHCO <sub>3</sub>              | Bicarbonato de sodio                        |
| CP                              | Cistein-proteinasa                          |
| Ehcp                            | Cistein-proteinasa de <i>E. histolytica</i> |
| CaCl <sub>2</sub>               | Cloruro de calcio                           |
| MgCl <sub>2</sub>               | Cloruro de magnesio                         |
| KCl                             | Cloruro de potasio                          |
| NaCl                            | Cloruro de sodio                            |
| col                             | Colaboradores                               |
| DEPC                            | Dietilpirocarbonato                         |
| CO <sub>2</sub>                 | Dióxido de Carbono                          |
| EHP                             | Extracto de hígado y páncreas               |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Fosfato de potasio monobásico               |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Fosfato de potasio dibásico                 |
| °C                              | Grados centígrados                          |
| g                               | Gramos                                      |
| H                               | Hepatocito                                  |
| HyE                             | Hematoxilina y Eosina                       |
| NaOH                            | Hidróxido de sodio                          |
| h                               | Hora  |
| Ig                              | Inmunoglobulina                             |
| IMSS                            | Instituto Mexicano del Seguro Social        |
| lb                              | Libras                                      |
| l                               | Litros                                      |
| Kb                              | Kilobases                                   |
| UV                              | Luz ultravioleta                            |
| DMEM                            | Medio mínimo esencial de Eagle modificado   |
| μl                              | Microlitros                                 |
| μm                              | Micras                                      |
| μM                              | Micromolar                                  |
| μg                              | Microgramos                                 |
| mg                              | Miligramos                                  |

## ABREVIATURAS

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| ml                            | Mililitro   |
| mm                            | Milímetros  |
| mM                            | Milimolar   |
| min                           | Minuto  |
| ng                            | Nanogramos  |
| No.                           | Número  |
| O <sub>2</sub>                | Oxígeno   |
| pb                            | Pares de bases                                      |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrógeno                               |
| %                             | Porcentaje  |
| pH                            | Potencial de hidrógeno                              |
| PCR                           | Reacción en cadena de la polimerasa                 |
| qPCR                          | Reacción en cadena de la polimerasa<br>cuantitativa |
| rpm                           | Revoluciones por minuto                             |
| seg                           | Segundos  |
| MgSO <sub>4</sub>             | Sulfato de Magnesio                                 |
| RT                            | Transcripción Reversa                               |
| T                             | Trofozoíto  |
| U                             | Unidades  |
| UANL                          | Universidad Autónoma de Nuevo León                  |

## RESUMEN

**Q.B.P. María Guadalupe Santiago Mauricio**

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

Fecha de graduación: Enero del 2010

Área de estudios: Genética Molecular

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación Terminal en

Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de páginas: 86

### **Título del estudio: Expresión de factores de virulencia de *Entamoeba histolytica* en un nuevo modelo experimental.**

**Introducción.** El modelo de rebanadas de hígado se ha empleado principalmente para evaluar la toxicidad y metabolismo de distintos compuestos químicos, así como para estudiar mecanismos de daño y reparación del hígado. Sin embargo, su utilidad como modelo de infección no ha sido reportada. **Objetivo.** Estudiar la expresión de factores de virulencia (cisteín proteinasas y amebaporo) y la presencia de apoptosis en un nuevo modelo de estudio para absceso hepático amibiano. **Material y Métodos.** Se utilizaron 10 hámstermachos, a partir de los cuales se disecó el hígado, del cual se obtuvieron rebanadas empleando el rebanador Brendel-Vitron. Las rebanadas obtenidas se infectaron con un inóculo de 200,000 trofozoítos por rebanada de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS. Posteriormente se incubó la microplaca que contenía las rebanadas infectadas a 37°C en una atmósfera de 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> en agitación a 30 rpm y se tomaron muestras a las 0, 6, 12, 18 y 24 h. Como control se incluyeron rebanadas sin infectar. Se realizó un estudio morfológico para valorar el proceso de infección, se estudió la presencia de apoptosis por las técnicas de PAS y TUNEL, se realizó un estudio de la expresión de ehcp1, ehcp5 y amebaporo, considerados importantes factores en la virulencia de *E. histolytica* por qPCR y se estudió la expresión de 12 citocinas en el sobrenadante del cultivo de rebanadas para valorar en forma preliminar la respuesta de las rebanadas ante el proceso de infección. **Resultados.** Se obtuvieron rebanadas de hígado de 347 micras de grosor y 4 mm de diámetro. De acuerdo al análisis morfológico las rebanadas de hígado de hámster infectadas se mantienen viables por 24h al igual que las rebanadas control. Los trofozoítos de *E. histolytica* se mantuvieron viables al mismo tiempo mantuvieron una elevada actividad de eritrofagocitosis. En nuestro trabajo al igual que en el modelo animal se observaron amibas desde las primeras horas de infección (6h) y además detectamos la presencia de leucocitos polimorfonucleares que rodeaban a los trofozoítos localizados en los sinusoides hepáticos, progresando hacia la formación de microabscesos constituidos por infiltrados de polimorfonucleares, linfocitos y amibas. Los microabscesos se distribuyeron en la rebanada e incrementaron de tamaño conforme avanzó el tiempo de infección a las 18 h y posiblemente participaron en la eliminación de los trofozoítos, ya que a las 24 h post-infección no fue posible detectarlos. Empleando las técnicas de PAS y TUNEL, pudimos demostrar que las amibas que se encuentran infectando las rebanadas inducen apoptosis de los hepatocitos cercanos a estas. Al igual que en el modelo animal en este trabajo se refuerzan la importancia de ehcp5 en la virulencia presentada por *E. histolytica*. Por otro lado de las 12 citocinas estudiadas solamente IL-1A e IL-6 presentaron un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ). **Conclusión.** Las rebanadas de hígado de hámster representan un modelo alternativo para estudiar la amibiasis hepática ya que se logró montar una infección amibiana *in vitro*, similar a lo reportado en el modelo animal.

---

**Dra. Rocío Ortíz López**  
Directora de tesis

---

**Dra. María del Pilar Carranza Rosales**  
Directora Externa de tesis

## 1) INTRODUCCIÓN

La amibiasis es una infección cosmopolita en la que el ser humano es el único huésped, es endémica de países tropicales y es causada por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica* (Ravdin 1986, Stanley 2003). Algunos de los factores ambientales más importantes en la transmisión de la amibiasis son: la contaminación de los cuerpos de agua y las redes de agua potable por aguas negras, el uso de materia fecal como fertilizante y el manejo de alimentos por portadores asintomáticos, quienes eliminan quistes infectivos (Tay y col., 2002).

*E. histolytica* es responsable de 50 millones de casos de amibiasis intestinal y 100,000 muertes anualmente, lo cual la ubica como la segunda causa de muerte por protozoarios parásitos en todo el mundo, después de la malaria (WHO, 1997). En México, la amibiasis sigue siendo un problema de salud pública. En el 2005, la amibiasis intestinal ocupó el quinto lugar entre las 20 principales causas de enfermedad a nivel Nacional, entre los grupos más vulnerables se encuentran los hombres entre 30-50 años. Se estima que más de un millón de habitantes padecen la forma intestinal y entre un 3-9% padecen la forma extraintestinal siendo el sitio más frecuente de afección el hígado, donde se desarrolla el absceso hepático amibiano (AHA).

Por otro lado el empleo de modelos animales para el estudio de la amibiasis *in vivo* ha contribuido significativamente al entendimiento de esta enfermedad, aunque no existe un modelo animal en el que se presenten las formas intestinal y hepática simultáneamente. Experimentalmente, el AHA puede ser producido en hámster mediante la inoculación de trofozoítos virulentos de *E. histolytica* por distintas rutas (vía portal, peritoneal, o directamente en el hígado), lo anterior de acuerdo a resultados histológicos, radiológicos, ultraestructurales e inmunohistoquímicos (Tsutsumi y col., 1894, 2006; Rigother y col., 2002), en los cuales se han observado las lesiones características del AHA acompañadas de una extensa destrucción de tejido.

Los mecanismos por los cuales *E. histolytica* daña el tejido del huésped han sido sujetos de una intensa investigación. Entre los factores de virulencia que más se han estudiado se encuentran las moléculas de adhesión, las cistein-proteinasas (Bruchhaus y col., 2003; Que y col., 2000), la proteína amebaporo (Leippe 1997; Leippe y col, 2005) y las moléculas de lipofosfopeptidoglicano (Moody y col., 2000).

Sin embargo el empleo del modelo animal requiere de la inoculación de trofozoítos virulentos, para lo cual se requiere un proceso seguro de cirugía, lo que implica el uso de anestesia y sobre todo un número importante de animales (25 a 90) para representar los distintos grupos de experimentales (Tsutsumi y col., 1894, 2006; Rigotherier y col., 2002).

Por lo anterior, en este trabajo se propone el empleo del modelo de rebanadas de hígado de hámster como una alternativa para el estudio de las fases tempranas durante el desarrollo de AHA. En este modelo se mantiene la complejidad multicelular y las interacciones extracelulares propias del tejido, al mismo tiempo que se conserva su estructura histológica y funcional (Vickers, 2004).

## 2) ANTECEDENTES

La amibiasis es una infección causada por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica*. La transmisión de la amibiasis ocurre por la ingestión de agua o alimentos contaminados con quistes maduros de la amiba.

Esta enfermedad es cosmopolita y presenta una mayor prevalencia en países en vías de desarrollo como África, Asia, India, América del Sur y en México. En Nuestro país la amibiasis sigue siendo una enfermedad de importancia pública a pesar de que se han mejorado las condiciones de vida y el nivel de saneamiento ambiental.

*E. histolytica* presenta un ciclo biológico simple con dos fases; un quiste infectante y un trofozoíto invasor el cual, generalmente habita en el intestino grueso y su permanencia se presenta asintomática generando lo que se conoce como amibiasis intestinal. Pero aproximadamente en un 1% de los casos por razones no del todo conocidas los trofozoítos que habitan en el colon, penetran la mucosa intestinal y se diseminan hacia otros órganos tales como pulmones, cerebro, piel e hígado principalmente, ocasionando la amibiasis extraintestinal (Bernal 2001; WHO 1997; Stanley y col., 2003).

### 2.1) ABSCESO HEPATICO AMIBIANO (AHA)

El AHA es la forma más común de amibiasis extraintestinal, en donde las amibas degradan la pared del intestino e invaden por vía porta al hígado para producir los abscesos amibianos. La mayoría de los pacientes son hombres jóvenes adultos de 30 a 50 años y la relación hombre: mujer es igual a uno. La evolución de la enfermedad depende de la interacción entre los factores del hospedero y del parásito.

Entre los factores que favorecen el desarrollo de AHA se encuentran:

- Desnutrición y alcoholismo.
- Malos hábitos higiénicos.
- Bajo nivel socioeconómico y cultural.

Los signos clínicos más frecuentes son, fiebre de 38 a 39 °C con predominio vespertino, hepatomegalia y dolor en hipocondrio derecho (Urrea y col., 2004).

En cuanto a las características patológicas, se ha observado que dentro del hígado se desarrollan inicialmente abscesos microscópicos, los cuales se fusionan y forman el absceso hepático amibiano. El AHA está constituido por líquido en su interior, de color pardo rojizo denominado “pasta de anchoas” el cual es tejido hepático digerido y eritrocitos. La capa que sigue es la pared interna del absceso, mal definida y constituida por tejido necrótico además de trofozoítos viables. La última capa es una cápsula de tejido conectivo. Los abscesos se localizan con mayor frecuencia en el lóbulo derecho del hígado (70-90%) que en el izquierdo (13%), debido a que el flujo portal es mayor hacia el lóbulo derecho que hacia el izquierdo. En humanos, el 85 % de los abscesos hepáticos son únicos y superficiales. Su tamaño varía de menos de 1 cm hasta 25 cm (Urrea y col., 2004).

## 2.2) MODELOS PARA EL ESTUDIO DE AHA.

### **2.2.1 Modelos *in vitro***

En amibiasis, los modelos *in vitro* se han utilizado para elucidar aspectos especializados de la patogenicidad de *E. histolytica* y se basan en el empleo de distintas líneas celulares.

Por mencionar algunos ejemplos, Eckmann y colaboradores en 1995 utilizaron co-cultivos de células epiteliales y del estroma intestinal humanas para estudiar señales pro-inflamatorias en respuesta a la infección con *E. histolytica*.



López Vancell y colaboradores en el año 2000 estudiaron aspectos del mecanismo de citotoxicidad de *E. histolytica* mediante la ruptura de la resistencia transepitelial de monocapas de células MDCK. Otros autores han utilizado células BHK-21 para estudiar la relación entre actividad de cisteín proteinasas y citotoxicidad y para elucidar el mecanismo de muerte celular mediada por cisteín- proteinasas luego de la asociación de *Escherichia coli* con trofozoítos de *E. histolytica* (Singh y col., 2004). Recientemente, Lee y colaboradores en el 2008 utilizaron células CHO para estudiar la importancia del hierro en la capacidad de adherencia y actividad citotóxica de *E. histolytica*.

Es innegable que los experimentos *in vitro* en los que se utilizan moléculas amibianas purificadas y probadas contra diferentes líneas celulares han proporcionado resultados muy valiosos e interesantes. Sin embargo, debido a la complejidad morfológica *in vivo*, aunado a diferencias importantes en el pH, tensión de oxígeno, calidad de los reactivos, medios de cultivo y suplementos exógenos, así como las prácticas de trabajo propias de cada laboratorio, los resultados obtenidos *in vitro* no reflejan la situación *in vivo*.

### **2.2.2. Modelos *in vivo***

Los primeros estudios realizados por Councilman, Lafleur y Rogers (Pinilla, 2008) contribuyeron a demostrar que el “absceso hepático tropical” es una secuela de la disentería amibiana como resultado de la invasión del hígado por amibas y no por una infección bacteriana.

El conocimiento del desarrollo del AHA ha progresado a partir de estudios realizados en distintas especies de modelos de roedores, los cuales se mencionan a continuación.

### 2.2.2.1 Hámster

El primer animal de laboratorio que se utilizó exitosamente para estudiar la amibiasis hepática fue el hámster. En el primer reporte que se conoce al respecto, se inyectaron cultivos polixénicos de *E. histolytica* directamente en los lóbulos hepáticos o en la vena portal (Reinertson y col., 1951). Estudios posteriores en este mismo animal pero utilizando cultivos axénicos de amibas, confirmaron su elevada susceptibilidad y la uniformidad de las lesiones producidas (Tanimoto y col., 1971). Utilizando este modelo se han elucidado aspectos de la respuesta inmune implicados en la relación hospedero-parásito y que a su vez fueron el punto de partida para investigaciones subsecuentes en los que se estudió el papel de la respuesta inflamatoria en los mecanismos de destrucción tisular (Tsutsumi y Shibayama 2006).

### 2.2.2.2 Gerbos

Los gerbos son otro grupo de roedores susceptibles a desarrollar amibiasis hepática. Las lesiones que se producen en estos animales son similares a las ocasionadas en los hámster, sin embargo, los trofozoítos de *E. histolytica* muestran un comportamiento menos virulento en gerbos que en hámster (Shibayama y col., 1997). Los gerbos se han utilizado para estudiar la respuesta inmune del hospedero y el efecto de varios candidatos a vacunas purificados a partir de las amibas (Zhang, 1994) y en estudios de factores de virulencia de *E. histolytica* (Bruchhaus, 2003).

### 2.2.2.3 Ratones

En relación al empleo de ratones en el estudio de la amibiasis hepática, se han obtenido avances únicamente mediante el uso de cepas genéticamente modificadas, tales como ratones con inmunodeficiencias severas combinadas (ratones SCID, por sus siglas en inglés). Cieslak y colaboradores en 1992 utilizaron estos ratones para producir abscesos hepáticos amibianos, demostrando que representan una valiosa herramienta para estudiar los

posibles factores responsables de la inmunidad protectora en amibiasis invasiva

Velásquez y colaboradores en 1998 utilizaron este modelo para analizar el papel que juegan los neutrófilos y la apoptosis en los mecanismos de resistencia de los ratones y de daño tisular, respectivamente.

El modelo más empleado para estudiar el desarrollo del AHA ha sido el modelo del hámster ya que en él se producen lesiones similares al que se presentan en los humanos.

### **2.2.3. Descripción del AHA en el modelo del hámster.**

El modelo de hámster en amibiasis hepática ha sido utilizado en diversos estudios de biología molecular, inmunopatogénesis, farmacología, efecto de drogas antiamebianas y vacunas, por mencionar algunos. Estos roedores han sido muy importantes en la elucidación de la participación de los elementos celulares, así como en estudios morfológicos detallados en la formación del AHA. Por ejemplo, Ventura-Juárez y colaboradores en 1997 estudiaron el destino y la localización celular de proteínas amebianas durante las fases tempranas de la invasión por trofozoítos de *E. histolytica* en hígado de hámster, mostrando la presencia de moléculas antigénicas de las amibas dentro de los hepatocitos, células inflamatorias y células endoteliales.

Estos mismos autores estudiaron la interacción *in situ* de los trofozoítos con el parénquima hepático y con células inflamatorias en animales inoculados vía portal. Utilizando técnicas de inmunocitoquímica y microscopía electrónica, encontraron que existe un contacto muy estrecho entre los trofozoítos y las células endoteliales y que también ocurre difusión de moléculas amebianas hacia el endotelio y hepatocitos localizados más distantes (Ver figura No. 1), los cuales mueren por necrosis (Ventura Juárez 2002).

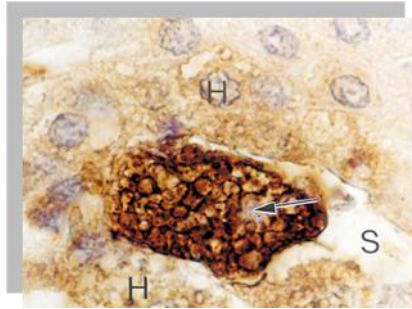


Figura No. 1. Difusión de moléculas amebianas hacia el endotelio hepático durante el desarrollo de AHA: Hepatocitos (H), Sinusoide (S), Amiba (Flecha). Tomado de Ventura Juárez, y col., 2002.

Según Shibayama, Espinosa-Cantellano y colaboradores en 1997, los trofozoítos de *E. histolytica* inoculados intraperitonealmente en hámster producen focos múltiples de reacción inflamatoria con daño inicial de la superficie del hígado entre las 6 y 24 h. En este tiempo, las amibas en el parénquima hepático son rodeadas por células inflamatorias. Entre las 48 y 96 h post-infección, los cambios inflamatorios aumentan y se observan además numerosos histiocitos formando granulomas de diferentes tamaños, organizados alrededor de material necrótico amorfo, rodeados de numerosos trofozoítos, células epitelioides y material fibrótico. Por su parte, Rigotherier y colaboradores en el 2002 estudiaron la fisiopatología de las lesiones hepáticas en hámster mediante la inoculación de trofozoítos de *E. histolytica* vía vena portal. Encontraron que la respuesta inmune celular es muy importante en la eliminación de los trofozoítos durante las primeras 6 y 12 h. La formación de AHA después de la inoculación intraportal de trofozoítos virulentos de *E. histolytica* en hámster implica 3 fases consecutivas: inflamación aguda, formación de granuloma y necrosis (Ver Figura No. 2). La necrosis puede ser extensiva y eventualmente fatal del hígado, similar a los abscesos hepáticos amebianos en humanos (Tsutsumi y col., 1984).

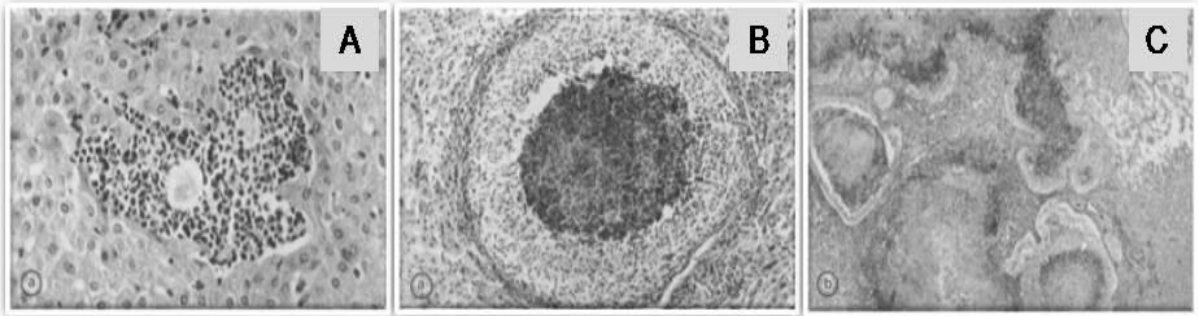


Figura No. 2.- Fases morfológicas durante el desarrollo de AHA: **A)** Inflamación aguda, **B)** Granuloma y **C)** Progresión avanzadas de necrosis. Tomado de Tsutsumi y cols., 1984.

Espinosa y colaboradores en 1997 compararon la patogénesis *in vivo* de *E. histolytica* con una cepa no virulenta como *E. dispar* utilizando el modelo de hámster para la inducción de absceso hepático amibiano, mostrando que los trofozoítos de *E. dispar* no son patogénicos en este modelo y que inducen solo una respuesta inflamatoria local, siendo incapaces de producir lesiones necróticas y abscesos hepáticos, a menos que sea inoculado en muy altas concentraciones.

### 2.3 APOPTOSIS

La muerte por apoptosis y subsecuente fagocitosis por parte de *E. histolytica*, de las células del hospedero, es un fenómeno que se ha estudiado recientemente. Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que esta amiba induce apoptosis de células humanas, incluyendo neutrófilos, linfocitos T y macrófagos (Houston y col., 2003; Boettner y col., 2005; Pelosof, 2006).

La participación del proceso de apoptosis durante el desarrollo de AHA en el modelo de ratones y hámster fue estudiada por Blazquez y colaboradores en 2007. Por su parte Pelosof y colaboradores en 2006, encontraron que la muerte de los hepatocitos y las células del sistema inmune durante la invasión

de *E. histolytica* no solo es debida a la actividad citolítica de los trofozoítos, sino también a un proceso apoptótico.

Por otro lado, la apoptosis involucra una serie de eventos celulares que pueden ser observados mediante microscopia de luz, microscopia electrónica de transmisión y detectadas mediante métodos inmunohistoquímicos y bioquímicos. Entre los métodos inmunohistoquímicos se encuentra la técnica de TUNEL (Tdt-mediated dUTP-biotin Nick-End Labeling), la cual permite detectar las zonas de fragmentación de la cromatina producto de las endonucleasas activadas, las cuales generan una multitud de fragmentos de DNA con los extremos 3' OH libres, los cuales pueden ser detectados por la adición de deoxinucleótidos en una reacción catalizada por una enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TDT), observándose una señal de positividad en el núcleo por medio de un marcador, el cual generalmente es diaminobencidina en muestras de tejidos incluidos en parafina.

#### 2.4 FACTORES DE VIRULENCIA DE *Entamoeba histolytica*

La virulencia de *E. histolytica* es muy compleja e intervienen factores relacionados con el huésped, el microambiente y el parásito (Cook, 1990).

La habilidad del trofozoíto para destruir el tejido del huésped y sobrevivir en el hígado es acompañada por una fuerte respuesta adaptativa, la cual requiere de la regulación de diversas proteínas amibianas (Bruchhaus, 2002). Los factores de virulencia que más se han estudiado en *E. histolytica* son cuatro: las moléculas de adhesión, especialmente la lectina-Gal/Gal NAC (Gilchrist y Petri, 1999), las cisteín proteinasas (Que, 2000; Bruchhaus y col., 2003), la proteína amebaporo (Leippe 1997; Leippe y col., 2005) y las moléculas de lipofosfopeptidoglicano (Moody-Haupt y col., 2000).

En este trabajo nos enfocamos al estudio de las cisteín-proteinasa 1 y 5 (EhCP1 y EhCP5) y amebaporo de *E. histolytica*, por lo que a continuación se describen con más detalle.

### 2.4.1 Cisteín-Proteinasas

Las cisteín proteinasas (CP) están presentes en diversos organismos, incluyendo bacterias, plantas, animales invertebrados y vertebrados. En mamíferos las cisteín proteinasas extracelulares han sido implicadas en varios procesos fisiológicos y patofisiológicos, incluidos la invasión tumoral y metástasis (Bruchhaus y col., 2003; Sloane 1987).

Estas proteínas has sido aisladas de cultivos axénicos de *E. histolytica* y son capaces de degradar colágeno, fibrinógeno, elastina y laminina, elementos de la matriz extracelular que los trofozoítos deben atravesar para ocasionar enfermedad invasiva (Keene y col, 1986; Luaces y Barrett, 1988). Estas proteinasas son también responsables de la ruptura de monocapas celulares, el cual es el ensayo más utilizado para evaluar toxinas amibianas y otros factores de virulencia (Keen y col., 1990; Lauwaet, 2004).

El efecto citopático sobre cultivos de fibroblastos inducido por sobrenadantes de aislamientos clínicos de cepas de *E. histolytica* puede ser inhibido completamente por Z-Phe-Arg-CH<sub>2</sub>F, un inhibidor específico e irreversible de CP (Reed y col., 1993). Por otra parte, la inhibición con codones antisentido de CP de trofozoítos de *E. histolytica* da como resultado disminución de la actividad fagocítica, de la inflamación del intestino y de la formación de absceso hepático (Ankri y col, 1998; 1999). También las cisteín proteinasas de *E. histolytica* podrían participar en la evasión de la respuesta inmune del huésped, mediante la proteólisis de las moléculas IgA , IgG y el componente C3a del complemento, las cuales actúan como quimioatrayentes de neutrófilos, macrófagos y polimorfonucleares.

Cabe mencionar que se ha encontrado que la actividad de las CP no es necesaria para el crecimiento en condiciones *in vitro*, pero sí son necesarias para la sobrevivencia del trofozoíto en condiciones *in vivo* ya que de acuerdo a estudios en los que se inocularon trofozoítos axénicos de *E. histolytica* cultivados *in vitro* en presencia de E-64 (inhibidor potencial de CP) dentro de la



vena porta de hámster y con el mantenimiento de la dosis de E-64 no se observó daño en el tejido y fueron rápidamente eliminados.

Estos datos sugieren que las CP participan en el desarrollo del absceso hepático ya que contribuyen a crear el ambiente anaeróbico que el trofozoíto requiere para crecer *in vivo* y con lo cual se protege de algunos factores presentes en el suero, como los componentes del complemento (Olivos y col., 2004; Pérez Tamayo y col., 2006).

La secuenciación del genoma de *E. histolytica* ha revelado la presencia de al menos 40 genes que codifican para CP (Loftus y col., 2005). De todos estos genes, solamente *ehcp1* y *ehcp5* son exclusivos de *E. histolytica*, puesto que sus genes ortólogos en *E. dispar* son no funcionales (*ehcp5*) o ausentes (*ehcp1*) (Bruchhaus y col., 1996; Willhoeft y col., 1999; Bruchhaus y col., 2003). Sorprendentemente, solo un pequeño número de estos genes se expresan *in vitro* y solamente 3 de ellos (*ehcp1*, *ehcp2* y *ehcp5*) son responsables de más del 90% de transcritos específicos de CP en cultivos axénicos (Bruchhaus y col., 1996; Bruchhaus y col., 2003).

De ellos *Ehcp5* se ha encontrado asociado con la membrana de los trofozoítos y se ha sugerido que tiene un potencial en la destrucción del tejido del huésped (Ankri y col., 1999, Jacobs y col., 1998). Con los resultados anteriores se ha sugerido que las amibas secretan proteasas al medio de cultivo, algunas de las cuales pueden ser responsables, en parte, de la extensa destrucción tisular que caracteriza esta enfermedad que en conjunto con la inflamación pueden favorecer la sobrevivencia de la amiba en el parénquima hepático.

#### 2.4.2. Amebaporo

La proteína amebaporo es producida por trofozoítos de *E. histolytica* y tiene un importante rol en la formación del AHA de acuerdo a estudios realizados en modelos animales tales como el hámster (Bracha y col., 2003) y ratones SCID (Zhang y col, 2004).



Esta proteína pertenece a una familia de pequeños péptidos anfipáticos conocidos como amebaporo A (AP-A), amebaporo B (AP-B) y amebaporo C (AP-C), los cuales contienen 77 residuos de aminoácidos, han sido aislados y caracterizados bioquímicamente (Leippe, 1997) y tienen la propiedad de insertarse en la membrana de bacterias y células eucariotas causando su lisis. La AP-A es la más abundante de las tres isoformas (Leippe, 2005).

En estudios *in vitro* se ha demostrado su capacidad citolítica sobre las líneas celulares de leucemia humana (HL-60 y Jurkat) y sobre leucocitos polimorfonucleares humanos, así como membranas citoplásmicas de diferentes bacterias y se ha relacionado también con la inducción de apoptosis (Andra y col, 2003; Berninghausen 1997).

En estudios *in vivo* se ha encontrado que al inocular hámster con trofozoítos de *E. histolytica* que expresan niveles bajos de AP-A (por inhibición con codones antisentido), la virulencia se encuentra disminuida. Con estos experimentos se reafirma su importancia en la formación del AHA en este modelo animal (Bracha y col., 2003).

Por lo mencionado anteriormente el impacto de las amebaporo sobre la patogenicidad de las amibas ha sido confirmado en modelos *in vitro* y en modelos *in vivo*.

## 2.5. RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL AHA.

La respuesta inflamatoria es un proceso fisiopatológico complejo y bien organizado. El AHA es una lesión inflamatoria del hígado. El ciclo completo de vida de *E. histolytica* no ha sido producido en animales de laboratorio, pero experimentalmente el AHA producido en hámster y gerbos se asemeja al presentado en humanos, y los animales no tratados mueren como consecuencia del daño tisular (Tsutsumi, 2006).

En hámster, se ha observado en las fases tempranas del desarrollo del absceso, una intensa reacción inflamatoria aguda, caracterizada por la presencia de trofozoítos de *E. histolytica* y abundantes células polimorfonucleares (PMN) con algunos eosinófilos (Tsutsumi y col., 1984; Ventura-Juárez y col., 2002). Al igual que otros parásitos, esta amiba puede inducir una respuesta del tipo celular y presentar una capacidad invasora en individuos predispuestos (Murray 1998).

Se han encontrado elevados niveles de expresión de IL4, IL-10 y TGF- $\beta$  en pacientes que presentan síntomas de AHA en comparación con pacientes control. Interesantemente, pacientes con síntomas de amibiasis pero infectados con otra especie de *Entamoeba* no muestran diferencias en los niveles de citocinas comparados con pacientes control (García, 2007).

Por otra parte, se ha observado que en infecciones con protozoarios parásitos una de las reacciones tempranas del huésped es la secreción de productos del metabolismo de fosfolípidos (ácido araquidónico) y varias citocinas entre las que destacan el factor de necrosis tumoral (TNF), las interleucinas 1 y 6, y el factor activador de plaquetas, y que la acción combinada de estas citocinas ocasionan fiebre y leucocitosis además de la producción de proteínas de fase aguda como la proteína C-Reactiva, por lo cual se ven involucrados en la generación de la sintomatología de la infección.

Entre las interleucinas, la IL-6 es un mediador importante en la síntesis de proteínas de fase aguda en el hepatocito. Es una proteína multifuncional producida por células linfoides y no linfoides y por células normales y transformadas; células T, monocitos/macrófagos, fibroblastos, hepatocitos, células endoteliales, células de mieloma y carcinomas (Tilg y col., 1992, 1994).

Durante la inducción experimental del absceso hepático en ratones deficientes en IL-6, éstos desarrollaron AHA con una marcada respuesta inflamatoria mediada principalmente por eosinófilos, mientras que los ratones control no lo hicieron. Estos resultados sugieren que la IL-6 podría desempeñar un papel importante en la resistencia contra el desarrollo de AHA.

En un estudio del suero de pacientes con absceso hepático amibiano en fase aguda, la IL-6 se encontró con mayor elevación entre otras citocinas estudiadas tales como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Lo anterior también sugiere que la IL-6 tiene un papel importante en la síntesis alterada de las proteínas de fase aguda durante la infección (Cordero, 1999).

Por otra parte, se ha identificado a la IL-6 como uno de los factores involucrados en el cambio de inmunidad innata a inmunidad adquirida, y ejerce un control diferencial en el reclutamiento y activación de leucocitos y de apoptosis durante procesos de infección con *E. histolytica* (Berninghausen y Leippe, 1997).

## 2.6 MODELOS ALTERNATIVOS EN INVESTIGACIÓN

El empleo de modelos animales en el área de investigación ha sido de gran utilidad, sin embargo, en la época actual existen numerosos grupos que están exigiendo que se supriman o que se limiten los experimentos con animales. Existe una fuerte presión a nivel mundial para que no se utilicen o bien para que se disminuyan al menor número posible los animales de experimentación, lo anterior, debido principalmente a aspectos éticos, pero también por los costos que implica mantener bioterios que cumplan los requisitos nacionales e internacionales acerca de las condiciones físicas necesarias para el cuidado y manejo de animales destinados a experimentación.

Con respecto a la disminución de los animales con fines experimentales, ya desde 1959, en su libro principios de la técnica experimental, Russell y Burch propusieron el principio de las 3 R's que sugieren lo siguiente:

- REEMPLAZO de los procedimientos que emplean animales por otros que no los precisen.
- REDUCCION en el número de animales utilizados.
- REFINAMIENTO de los métodos usados para mejorar su eficacia o disminuir el dolor o sufrimiento infligido.

Actualmente estos principios siguen siendo promovidos por las asociaciones que están en contra de la experimentación desmedida con animales de laboratorio.

### 2.6.1 Modelo de Rebanadas de Tejidos

Una alternativa práctica para sustituir los modelos animales y que ha resurgido en los últimos años es el modelo de rebanadas de tejidos (Parrish y col., 1995) el cual se puede definir como un sistema basado en cortes mecánicos de alta precisión con dimensiones similares entre cada rebanada y su posterior cultivo en condiciones controladas (Brendel y col., 1993).

Es importante mencionar que en las rebanadas de tejidos, al contrario de lo que ocurre en los cultivos celulares se mantienen todas las poblaciones celulares del tejido del que proviene además de que poseen las características de conservar la organización espacial tridimensional y las interacciones extracelulares (célula-célula y célula-matriz extracelular) al mismo tiempo de conservar su estructura histológica y funcional (Moronvalle- Halley, 2005).

Al principio, las rebanadas de tejidos se obtenían de forma manual, utilizando bisturíes, lo que hacía difícil y poco reproducible el método (Campbell y Hales, 1971). Posteriormente se utilizaron rebanadores sencillos como el microtomo de Staddie-Rigs en 1944 y el rebanador de McIlwan en 1953, con lo que se logró mejorar la calidad pero no la reproducibilidad, agregando el inconveniente de que se comprimían y dañaban los tejidos (Bach y col., 1996). Pero los que realmente introdujeron mejoras a la técnica de rebanadas de tejidos fueron los rebanadores de precisión diseñados por Carlos Krumdieck y Klaus Brendel, ambos en la década de los 80's, con los cuales se lograron obtener rebanadas posicionales con diámetro, grosor precisos y mínimo daño celular (De Kanter y col., 2002).

Con lo anterior, se propiciaron condiciones más favorables para el intercambio de gases y de nutrientes permitiendo mantener el tejido viable por más tiempo *in vitro*. Los avances en el desarrollo de sistemas de incubación adecuados han permitido la viabilidad de las rebanadas de tejidos tanto de animales como de humanos hasta por 10 días, con base a estudios histológicos y monitoreando con biomarcadores químicos (Brendel y col, 1987; Behrsing y col, 2003).

Esta técnica ha sido empleada con diferentes órganos tales como el hígado, riñón, pulmón, corazón y bazo (Parrish y col., 1995), en ocasiones provenientes del mismo animal, por lo que este modelo permite realizar experimentos utilizando solamente un tercio de los animales que normalmente se utilizarían en un proyecto determinado que los requiera. Esto evidentemente disminuye no solamente el número de animales por experimento, sino también los costos y los tiempos de trabajo.

### **2.6.1.1 Aplicaciones de las Rebanadas de Hígado**

Debido a que en este trabajo utilizamos rebanadas de hígado de hámster, a continuación se mencionan algunas aplicaciones representativas de este órgano en particular.

Las rebanadas de hígado se han empleado para estudiar el metabolismo de sustratos endógenos y exógenos, la cual quizás sea la aplicación más dominante de este sistema *in vitro*, además es una valiosa herramienta para estudiar eventos tempranos durante la hepatocarcinogénesis inducida por agentes químicos (Parrish y col., 1995). También pueden ser usadas para predecir efectos secundarios crónicos ocurridos después el tratamiento a largo plazo *in vivo* (Pfaller y col., 2001).

Van de Bovenkamp y colaboradores en el 2005 y Verril y colaboradores en el 2002 mostraron que las rebanadas de hígado de hámster y rata pueden ser usadas para estudiar la activación temprana de células esteladas del hígado dentro de un medio fisiológico.

Por su parte, Edwards y colaboradores en el año 2002 estudiaron la utilidad del cultivo de rebanadas de tejidos valorando los efectos químicos para el estudio de la inducción de citocromo P450. Moronvalle-Halle y colaboradores (2005) demostraron el potencial del cultivo de rebanadas de hígado como una alternativa de sistema *in vitro* para estudiar los efectos de xenobióticos en la inducción de apoptosis, mientras que Plazar y colaboradores (2007) estudiaron los efectos genotóxicos inducidos por varios pro-carcinógenos mediante el ensayo “cometa” en rebanadas de hígado de rata. Vickers y colaboradores (2004) utilizaron rebanadas de hígado para estudiar los mecanismos de daño y reparación en la fibrosis hepática. Más recientemente, Catania y colaboradores (2007) optimizaron el uso de pequeñas rebanadas (chips) de tejido de ratón con el objeto de reducir el número de animales, incrementar la similitud entre rebanadas y aumentar el número de muestras, permitiendo realizar un mayor número de ensayos a partir del mismo animal.

## 2.7 ANTECEDENTES PARTICULARES

Aunque existen múltiples aplicaciones de las rebanadas de hígado, su empleo para estudiar mecanismos de infección no ha sido reportado. Existe solamente un estudio en el cual se ha empleado el modelo de rebanadas de tejido como modelo de infección, en el que se menciona que las rebanadas de pulmón murino son susceptibles a ser infectadas por ciertos virus y bacterias gram negativas (Ebsen y col., 2002).

En el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS se ha trabajado con el modelo de rebanadas de tejido desde hace aproximadamente 4 años, por lo que se puede mencionar que se ha controlado el modelo en cuanto a la obtención y cultivo de rebanadas de hígado, riñón y pulmón de origen murino, las cuales se han mantenido viables de tres días a cinco días (Jaramillo Reyna, 2006).

Tomando en cuenta estos últimos resultados iniciamos un proyecto para estudiar la infección de rebanadas de pulmón con *Mycobacterium tuberculosis* para analizar la capacidad de los bacilos para infectar las rebanadas. Los resultados han sido muy prometedores e indican que las rebanadas de pulmón podrían constituir un modelo adecuado para estudiar mecanismos relacionados con la patogénesis de *M. tuberculosis*. Estos resultados nos han impulsado a proponer las rebanadas de hígado como un modelo de infección por amibas patógenas el cual, una vez caracterizado, puede ser utilizado en estudios de invasión amibiana y para el control de la infección.

Al respecto de esto último, en experimentos preliminares de infección de rebanadas de hígado de hámster con trofozoítos virulentos de *E. histolytica*, se ha logrado establecer la cantidad adecuada de amibas por rebanada para los ensayos de infección, también se ha encontrado que se conserva la capacidad fagocítica de la amiba y que ocurre difusión de moléculas amibianas hacia el tejido hepático circundante (Muñoz Sánchez 2008).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las rebanadas de tejidos representan un sistema de estudio intermedio entre los modelos *in vitro* y los modelos *in vivo*; sin embargo a pesar de sus diversas aplicaciones, no se ha utilizado como modelo de infección por amibas patógenas. Por otra parte, debido a la importancia de la amibiasis y del absceso hepático amibiano en nuestro país, el empleo de este sistema puede representar un método alternativo, sencillo y de bajo costo para estudiar algunos de los mecanismos involucrados en la patogénesis de esta enfermedad que ayuden a un mejor conocimiento y control de la misma.

Por lo anterior, en este trabajo se realizó la infección de rebanadas de hígado de hámster con trofozoítos de *E. histolytica* y, se analizaron los niveles de expresión de tres factores de virulencia amibianos, también se estudiaron la apoptosis y la expresión de distintas citocinas inducidas por *E. histolytica* en las rebanadas infectadas experimentalmente.



#### 4. HIPOTESIS

En los cultivos de rebanadas de hígado de hámster infectados con trofozoítos de *Entamoeba histolytica* se expresan factores de virulencia de la amiba.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión de factores de virulencia (cisteín proteinasas y amebaporo) y la presencia de apoptosis en un nuevo modelo de estudio para absceso hepático amibiano.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la secuencia de eventos morfológicos durante la infección de rebanadas de hígado de hámster con trofozoítos de *E. histolytica*.
- 2) Estudiar la apoptosis inducida por *E. histolytica* mediante la técnica de TUNEL.
- 3) Analizar la expresión de genes de virulencia de *E. histolytica* (Cisteín proteasa 1y 5, y amebaporo) mediante PCR cuantitativa en rebanadas infectadas.
- 4) Estudiar la expresión de distintas citocinas en los sobrenadantes de cultivos de rebanadas infectadas por la técnica de ELISA.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El presente trabajo de investigación se dividió en cinco etapas: 1) Obtención e infección de rebanadas de hígado de hámster con trofozoítos de *E. histolytica*, 2) Análisis morfológico para evaluar el proceso de infección, 3) Detección de apoptosis en las rebanadas infectadas, 4) Análisis molecular en el que se valoró la expresión de 3 factores de virulencia de la ameba (EhCP1, EhCp5 y amebaporo) y 5) Determinación de distintas citocinas para valorar la respuesta de medidores inmunológicos en la rebanada ante el proceso de infección. En la figura No. 3 se presenta un diagrama esquemático de la estrategia general.



Figura No. 3.- Se presenta un esquema general del proceso que se siguió para la realización de este proyecto.

## 7. ÁREA FÍSICA DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO

El proceso obtención, cultivo e infección de las rebanadas de hígado de hámster con trofozoítos de *E. histolytica*, los ensayos de ELISA y la extracción de ácidos nucleicos se realizaron en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Una vez realizadas las infecciones, los ensayos propuestos en la estrategia general se llevaron a cabo en diferentes lugares:

- En el Departamento de Anatomía Patológica de la Unidad de Alta Especialidad No. 34 del IMSS, se llevaron a cabo el procesamiento de muestras para realizar la técnica histológica, el análisis morfológico y de el ensayo de TUNEL.
- En la Unidad de Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL, se realizaron la reacción de transcriptasa reversa, cuantificación del cDNA y el análisis de PCR en tiempo real de los distintos factores de virulencia.

## 8. MATERIALES

### 8.1. MATERIAL BIOLÓGICO

*Animales:* Se utilizaron 10 hámsteres machos (*Mesocricetus auratus*), de 8 a 12 semanas de edad con un peso aproximado de 86 g, los cuales fueron obtenidos del bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Los animales se mantuvieron en jaulas de policarbonato, con acceso libre a alimento de una dieta especial para roedores de Purina® y agua (ver figura No. 4). Los experimentos se realizaron siguiendo las guías institucionales sobre el manejo y cuidado de animales de laboratorio establecidas internacionalmente y según la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999.

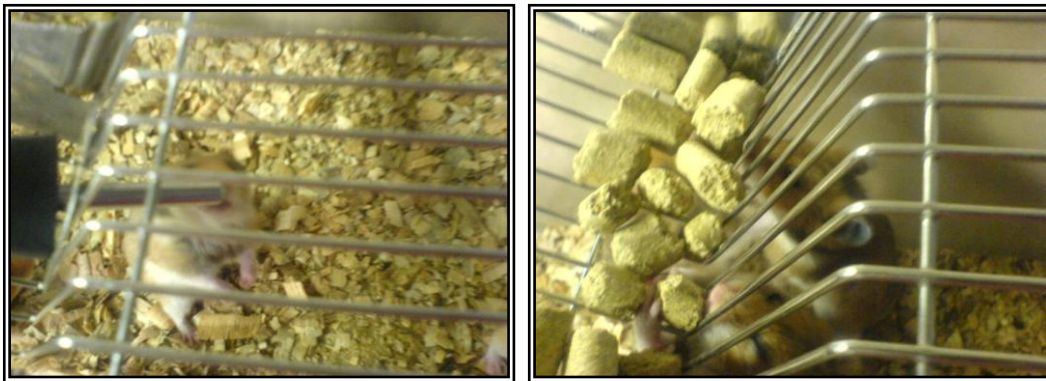


Figura No. 4. Forma de alimentación de hámster (*Mesocricetus auratus*).

*Parásitos:* Para realizar la infección de las rebanadas de hígado de hámster se utilizaron trofozoítos de *Entamoeba histolytica* cepa HM1:IMSS. Los trofozoítos fueron cultivados a 37 °C en medio de cultivo PEHPS (Said Fernández y cols., 1997), suplementado con 10% de suero de bovino. Se realizaron subcultivos cada tercer día y el inóculo fue preparado a partir de amibas en fase logarítmica de crecimiento (72 h de cultivo). Para mantener la virulencia de la cepa, los trofozoítos fueron inoculados en hígado de hámster cada 2 meses y posteriormente recuperados de los abscesos hepáticos producidos.

## 8.2 ORIGEN DEL MATERIAL DE USO GENERAL

El material de uso general fue obtenido a partir de distintas casas comerciales: las puntillas de micropipetas (10,100 y 1000  $\mu$ L), tubos eppendorff de 0.2 y 1.5 mL estériles, de Axigen®. Los portaobjetos y cubreobjetos de Corning®. Los frascos y recipientes de vidrio de Pyrex®.

## 8.3 ORIGEN DE LOS REACTIVOS

- Alcohol etílico: De Tecnología Industrial Química, S.A. de C.V.
- Detergente enzimático para lavado de material de vidrio y quirúrgico: De ALCONOX, Inc.
- DMEM/F12 (Medio Dulbecco modificado por Eagle/Mezcla de nutrientes F-12 de Ham), cloruro de sodio, cloruro de potasio, bicarbonato de sodio, D-Glucosa anhidra, cloruro de calcio, sulfato de magnesio y otros reactivos diversos: De Sigma Chemical Company.
- Estuche comercial Multi-Analyte ELISArray® para determinación de un panel de 12 citocinas: De SABiosciences.
- Estuche comercial RNeasy®: De Qiagen.
- Estuche comercial de TACS 2TdT DAB In Situ Apoptosis®: De Trevigen.
- Fosfato monobásico de potasio y fosfato dibásico de potasio: De Spectrum Quality Products, Inc.
- Gentamicina y suero fetal bovino: De GIBCO BRL Laboratories.
- Microplacas de 24 pozos: De Corning Incorporated.
- RNA later: De Ambión.

#### 8.4 EQUIPO

- Autoclave: De TUTTNAUER CO. LTD.
- Campana para PCR modelo P-036-02: De CBS Scientific.
- Espectrofotómetro ND-1000: De Nano Drop.
- FP120 h homogenizador de tejidos: De Fast Prep
- Histoquinete 1000 Shandon: De Citadel.
- Incubadora para cultivo celular: De Forma Scientific, Inc
- Microcentrifuga modelo 5417c: De Eppendorf.
- Microtomo 2040: De Reichert-Jung.
- Puntillas con filtro (10,20,200, 1000  $\mu$ L): De Axygen<sup>®</sup> Scientific.
- Rebanador de Tejidos: De Vitron, Inc.
- Termociclador Modelo PTC-100: De MJ Researchr.
- Termociclador StepOne: De Applied Biosystems.
- Transiluminador modelo M.26: De UVP.
- Sistemas de Filtración de 500 ml (poro de 0.22  $\mu$ m): De Corning Incorporated.

## 9 METODOLOGÍA

### 9.1 OBTENCIÓN DE LAS REBANADAS DE HÍGADO DE HAMSTER

#### 9.1.1 Obtención de hígado de hámster

Se administró a los hámsters una sobredosis de pentobarbital sódico vía intraperitoneal (5 mg/100 g de peso), una vez en anestesia profunda, se disecó el hígado utilizando material de cirugía estéril. El hígado se colectó en amortiguador Krebs-Bicarbonato (KB) a pH 7.4, estéril, y a 4°C.

#### 9.1.2. Preparación de rebanadas de hígado de hámster

Se obtuvieron cilindros del tejido utilizando sacabocados de acero inoxidable de 8 y 10 mm de diámetro. Posteriormente los cilindros de tejido se colocaron en el porta muestras del rebanador Brendel-Vitron, a través del cual se hizo recircular amortiguador KB a 4°C y una mezcla de gas (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>) a velocidad de flujo de 0.75 -1.0 l/min. Se prepararon las rebanadas de hígado de 8 y 10 mm de diámetro, las cuales fueron colectadas en el amortiguador KB a 4°C.

De las rebanadas obtenidas, se seleccionaron las de mejor apariencia visual para preparar “chips” de tejido de 4 mm de diámetro utilizando una perforadora para biopsias. Posteriormente se seleccionaron algunas de ellas y se midió su grosor por diferencia entre la medida 2 – medida 1 (grosor de rebanada entre portaobjetos – grosor de portaobjetos) empleando el equipo Mitutoyo absolute.

Finalmente se colocó un chip de tejido por cada pozo de una microplaca de 24 pozos con 1 ml de medio DMEM/F12/PEHPS suplementado con 10% de suero fetal bovino, glucosa 50 mM, mezcla de insulina-transferrina-selenio (ITS) 5 µg/ml, piruvato de sodio 2 mM y glucagón 30 ng/ml.



## 9.2 INFECCIÓN DE REBANADAS DE HÍGADO DE HÁMSTER.

A partir de cultivos axénicos de trofozoítos virulentos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS en fase exponencial (72 h), se realizó un recuento en cámara de Neubauer para determinar el número de amibas por mililitro de medio. Se preparó un inóculo de 200,000 trofozoítos por cada rebanada. Se incubó la microplaca que contenía las rebanadas infectadas a 37°C en una atmósfera de 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> en agitación lenta (30 rpm) y se tomaron muestras a las 0, 6, 12, 18 y 24 h. Como control se incluyeron rebanadas sin infectar.

## 9.3 ANÁLISIS MORFOLÓGICO

### 9.3.1 Técnica histológica

Después de cada tiempo de incubación las rebanadas se lavaron con PBS 1X a 37°C y se fijaron durante 24 h a temperatura ambiente en solución acuosa de formol al 10% amortiguado. Las muestras se incluyeron en parafina utilizando un procesador automático de tejidos (histoquinette) durante 24 h. Posteriormente se prepararon los bloques de parafina conteniendo los tejidos y se realizaron cortes de 5 µm de grosor empleando un microtomo convencional. Los cortes se colocaron en portaobjetos impregnados de albúmina-glicerina y se tiñeron utilizando las tinciones de Hematoxilina y Eosina (H y E) y Grocott-Gomori. Se realizaron preparaciones permanentes utilizando resina y se observaron al microscopio de luz. Se utilizaron estándares histopatológicos para establecer las características morfológicas distintivas del tejido normal y se compararon con las rebanadas de tejido infectado con trofozoítos de *E. histolytica*. Se valoraron la integridad celular de las membranas, núcleo y citoplasma, así como las interacciones de los trofozoítos con el parénquima hepático y en su caso el tipo de las lesiones ocasionadas. Se documentó la secuencia de eventos morfológicos de la infección e invasión amibiana al tejido hepático durante los tiempos de incubación establecidos.

## 9.4 DETECCIÓN DE APOPTOSIS

### **9.4.1 Inmunohistoquímica para el análisis de apoptosis mediante TUNEL**

La técnica de TUNEL se llevó a cabo utilizando un estuche de reactivos de Trevigen® en cortes de 6 µm provenientes de muestras fijadas con paraformaldehído al 4% e incluidas en parafina. La fragmentación del DNA se detectó añadiendo Oligo A marcado en los extremos 3´OH libres del DNA mediante la enzima DNA ligasa y posteriormente reconocidos por un anticuerpo antidigoxigenina unido a peroxidasa. La positividad se identificó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-diaminobencidina observando una coloración marrón oscuro en los núcleos positivos o bien núcleos basófilos en los núcleos negativos para esta técnica (tinción de contraste: Hematoxilina-Eosina). Las muestras de los distintos tiempos de infección se analizaron mediante microscopía de luz. Se incluyó un control negativo el cual consistió de rebanadas sin infectar.

### **9.4.2 Tinción del Ácido Peryódico de Schiff**

La tinción del Ácido Peryódico de Schiff (PAS, por sus siglas en inglés) es un método histoquímico que puede ser empleado para determinar el índice de apoptosis. Histológicamente, la célula apoptótica aparece como una masa redondeada u oval de citoplasma fuertemente eosinófilo con fragmentos de cromatina nuclear densa. La constricción celular y la formación de cuerpos apoptóticos tienen un comienzo abrupto y una duración de pocos minutos, sin embargo los cuerpos apoptóticos permanecen en el tejido aproximadamente 2 horas hasta que son fagocitados y degradados.

El conteo de células en apoptosis se llevó a cabo de la siguiente manera: Se realizó un conteo celular en cinco campos microscópicos de las rebanadas infectadas provenientes de los distintos tiempos de infección, incluyendo el control. Se contaron 100 células y se identificaron las que se encontraban en proceso de apoptosis, las cuales se caracterizan por poseer núcleos picnóticos, después se determinó el promedio de los cinco campos para calcular el porcentaje de células apoptóticas. El índice de apoptosis se determinó partir de tres experimentos independientes.

## 9.5 ANALISIS MOLECULAR

Para llevar a cabo el análisis de las proteínas cisteín proteasas 1 y 5, así como de amebaporo se realizaron los siguientes procesos:

### **9.5.1 Extracción de RNA Total**

La extracción del RNA total de las rebanadas de hígado de hámster infectadas y sin infectar con cultivos de trofozoítos de *E. histolytica* se realizó empleando el estuche comercial “RNeasy Mini Kit” de Qiagen®.

En todos los casos, se utilizaron materiales libres de RNAsas, tales como tubos para microcentrífuga, agua DEPC, soluciones disueltas en agua DEPC, recipientes de vidrio horneado a 300 °C por 3 h, micropipetas exclusivas para ese uso y cámaras de electroforesis tratadas con RNAasas.

Se colocaron las rebanadas de tejido preservadas en RNAlater, en tubos de FastPrep que contenían 600 µl de buffer de lisis (RLT), se homogenizó la muestra utilizando el aparato FastPrep FP120 h empleando un ciclo de 40s, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 3 min. Se tomó el sobrenadante y se depositó en un tubo nuevo al cual se le agregó 1 volumen de etanol al 70%, enseguida se depositó dentro de la columna RNeasy y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 s. Se eliminó el sobrenadante del tubo colector y se agregó a la columna 700 µl del buffer de lavado (RW1) y se centrifugó a 10,000 rpm por 1 min.

Enseguida se procedió a tratar la columna con DNasa incubando por 15 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se procedió a realizar un nuevo lavado con el buffer RW1 y se centrifugó a 10,000 rpm por 1 min. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 500 µl de buffer de lavado (RPE) a la columna y se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 2 min. Se pasó la columna a un tubo limpio y se agregaron 30-50 µl de agua libre de RNasas y se centrifugó a 10,000 rpm por 1 min para eluir el RNA. Finalmente el RNA obtenido se cuantificó y se almacenó a -70°C, hasta su uso.

La visualización de los RNA's se realizó en geles de agarosa al 1.5% colocados en una cámara de electroforesis horizontal sumergidos en amortiguador TBE 1X. La muestra fue mezclada con 1 µl de jugo azul 10X y se depositó en los carriles del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V por 60 min, posteriormente se tiñeron en una solución de bromuro de etidio a concentración de 5 µg/ml durante 10 min. La fotodocumentación de los geles con las muestras de los RNA's se realizó utilizando un transiluminador de luz UV.

Se verificó la calidad del RNA, así como su integridad por la presencia de dos bandas prominentes del RNAr de aproximadamente 5 y 2 Kb (28S y 18S, respectivamente).

Se cuantificó la concentración y se evaluó la pureza del RNA empleando el espectrofotómetro Nano Drop®-100.

### **9.5.2 Obtención de cDNA mediante la técnica de RT-PCR.**

Empleando el RNA extraído previamente, se procedió a incubar a 70 °C por 10 min, para llevar a cabo la síntesis del DNA complementario respectivo mediante la técnica de transcripción reversa (RT) utilizando el estuche comercial Reverse Transcription System (Promega).

Bajo las mismas condiciones de trabajo empleadas en la extracción de RNA para evitar la contaminación por RNAasas, se tomaron 4 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µl de Buffer de reacción (10X), 2 µl de dNTPs (10 Mm), 0.5 µl de Inhibidor de RNasas, 15 U de transcriptasa reversa, 1 µl de Oligo dT, 1 µg de RNA total pre incubado y se llevó a un volumen final de 20 µl con agua libre de nucleasas. Se incubó la mezcla de reacción a 95 °C por 5 min y después se inactivó la reacción incubando a 0-5 °C por 5 min.

Se preparó un blanco de cDNA siguiendo el protocolo antes mencionado solo que en la mezcla de reacción en lugar de agregar RNA se empleó agua libre de nucleasas. El cual también se utilizó para cuantificar el cDNA sintetizado a partir de cada una de las muestras. La cuantificación se realizó empleando el espectrofotómetro Nano Drop®-100. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C.

### **9.5.3 Diseño de iniciadores para el análisis de expresión de genes amibianos.**

Se seleccionaron tres genes específicos de *E. histolytica* (ehcp5, ehcp1 y amebaporo) los cuales son factores de virulencia de esta amiba, así como dos genes endógenos para utilizar como controles en el análisis de expresión en los diferentes tiempos de incubación estudiados.

Para el diseño de los oligonucleótidos específicos se utilizó una región del gen de interés (ehcp5, ehcp1, amebaporo) y los endógenos (actina y 18S) utilizando las secuencias nucleotídicas del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y los programas (Oligo 4.0 y Amplify 1.0). En la tabla No. 1 se muestran algunas características de los iniciadores empleados, para la estandarización de la PCR punto final y en la Tabla No, 2 se muestran los iniciadores empleados en el método de PCR cuantitativa.

| Nombre del Gen   | Clave              | GenBank             | SECUENCIAS (5'-3')  | Tm (°C)      | Tamaño (pb) |
|--|--------------------|---------------------|---|--------------|-------------|
| <b>Actina U</b><br><b>Actina L</b>                                   | EhACU1<br>EhACL1   | XM<br>00191460<br>2 | 5'AATGAAAGATTCAGATGCCC3'(U)<br>5'ATTGATCCTCCAATCCAGAC3'(L)      | 56<br>58     | 283         |
| <b>Cisteín<br/>proteínasa1U</b><br><b>Cisteín<br/>proteínasa1L</b>   | EhCP1U3<br>EhCP1L3 | Q01957              | 5'CATGTAGAAGTGATGTGAAAGC 3' (U)<br>5'TTCTTTCCCATCAACAACAC 3'(L) | 59<br>56     | 247         |
| <b>Cisteín<br/>proteínasa 5U</b><br><b>Cisteín<br/>proteínasa 5L</b> | EhCPU2<br>EhCPL2   | AB1794<br>45        | 5' ATTTGCTGCTATGACTGAGG3 (U)<br>5'TTCAGCAGCAACATATGG3 (L)       | 59.4<br>58.2 | 376         |
| <b>Amebaporo U</b><br><b>Amebaporo L</b>                             | EhAMU1<br>EhAML1   | M83945              | 5'AAGGAGAAATCCTCTGCAAC3'(U)<br>5'CAAATAGCATTGGCATCAAC3'(L)      | 58<br>56     | 216         |

Tabla No. 1 Iniciadores empleados para la detección de ehcp1, ehcp5, amebaporo y actina por PCR punto final.

| Nombre del Gen                                       | Clave              | GenBank             | SECUENCIAS (5'-3')  | Tm (°C)  | Tamaño (b) |
|--|--------------------|---------------------|---|----------|------------|
| Actina U<br>Actina L                                 | EhACU1<br>EhACL1   | XM<br>00191460<br>2 | 5'TGTTTGAAACATTCAACACC3'(U)<br>5'GTAAGATCACGTCCTGCAAG3'(L)          | 59<br>59 | 20<br>20   |
| 18S U  | 18SEhU<br>18SEhL   | AB426549<br>1       | 5CATGATTTATTGGGTAGTGGTG3'(U)<br>5'GAACATTTCTGTCTTATAGGCAG3'(L)      | 60<br>60 | 22<br>23   |
| Cisteín<br>proteínasa1U<br>Cisteín<br>proteínasa1L   | EhCP1U3<br>EhCP1L3 | Q01957              | 5'CATGTAGAAGTGATGTGAAAGC 3'(U)<br>5'TTCTTTCCCATCAACAACAC 3'(L)      | 59<br>56 | 22<br>20   |
| Cisteín<br>proteínasa 5U<br>Cisteín<br>proteínasa 5L | EhCPU2<br>EhCPL2   | AB1794<br>45        | 5' ATTTGCTGCTATGACTGAGGCTG3'(U)<br>5' AGTTTCTTCAGCAGCAACATATGG3'(L) | 60<br>60 | 23<br>24   |
| Amebaporo U<br>Amebaporo L                           | EhAMU1<br>EhAML1   | M83945              | 5'AAGGAGAAATCCTCTGCAAC3'(U)<br>5'CAAATAGCATTGGCATCAAC3'(L)          | 58<br>56 | 20<br>20   |

Tabla No. 2 Iniciadores empleados para la detección de actina, 18 S, ehcp1, ehcp5y amebaporo por PCR cuantitativa.

#### **9.5.4 PCR punto final**

Se realizó la detección de los factores de virulencia de ehcp1, ehcp5, amebaporo y del gen endógeno actina a partir de muestras de cultivo de trofozoítos y un "pool" de cDNA de rebanadas de los distintos tiempos de infección. La detección se realizó mediante la amplificación de una región de los genes de interés, mostrados en la tabla No. 1, empleando la metodología de PCR punto final. La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: 1.2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2.5 µl de Buffer de reacción (10X), 0.5 µl de dNTPs (10 Mm), 1 µl de Taq Polimerasa, 2 µl de cada iniciador (Upper y Lower) y 1 µg de cDNA la mezcla se llevó a un volumen final de 20 µl con agua libre de nucleasas.

Finalmente se colocó la mezcla de reacción en el termociclador Modelo PTC-100 de MJ Researchr, en el cual se llevó a corrio el siguiente programa:

| PASO    | TEMPERATURA<br>(°C) | TIEMPO   |
|---------|---------------------|----------|
| 1       | 94                  | 5 min.   |
| 2       | 94                  | 30 seg.  |
| 3       | 65                  | 30 seg.. |
| 4       | 72                  | 30 seg.  |
| 2,3 y 4 | 30 ciclos           |          |
| 5       | 72                  | 5 min.   |
| 6       | 4                   | ∞        |

#### **9.5.5 PCR Cuantitativa en Tiempo Real (qPCR).**

La qPCR es un método que permite la cuantificación de manera absoluta o relativa de ácidos nucleicos con gran exactitud. Está basada en la monitorización de la reacción de PCR usando moléculas intercaladoras o sondas fluorescentes.

Para analizar la expresión de los genes de interés en las muestras de los distintos tiempos de infección se realizó lo siguiente:

1. Se comenzó preparando en una placa de 48 pozos la mezcla de iniciadores (Upper y Lower) para cada gen de interés de una manera ordenada. Cada iniciador en la mezcla estaba a una concentración de 5  $\mu\text{M}/\mu\text{l}$ .
2. Cada gen se evaluó por duplicado en la misma placa para cada tiempo.



3. Se incluyeron dos genes endógenos, los cuales fueron utilizados para la normalización de los resultados y un control de referencia, que correspondía a trofozoítos provenientes de cultivos axénicos y que se tomaron como referencia para hacer la segunda normalización en los niveles de expresión de cada muestra por el método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  y un control negativo propio de la reacción de qPCR, el cual tenía todos los componentes de la reacción con excepción de cDNA muestra.

4. La mezcla para cada muestra se preparó de la siguiente manera:

Una vez cuantificado con un blanco el cDNA de la muestra, se realizaron los cálculos para que en cada pozo de reacción quedaran 60 ng totales de cDNA, al cual se le adicionaron por reacción 7  $\mu\text{l}$  de SYBR® Green Máster Mix de Invitrogen y se completó con agua libre de nucleasas a un volumen final por reacción de 15  $\mu\text{l}$ . Se realizaron distintas mezclas para evaluar la expresión de los genes en los distintos tiempos (6, 12, 18 y 24 h).

5. La mezcla de reacción se mezcló en vórtex y se centrifugó brevemente. Enseguida se prosiguió a repartir 13  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción a cada pozo de reacción de la placa, excepto en los controles negativos. El control negativo de la reacción se preparó agregando 7  $\mu\text{l}$  de SYBR® Green Master Mix de Invitrogen (Reactivo especialmente formulado que contiene ROX, un colorante de referencia, para emplearse con termocicladores de la marca Applied Biosystems™), 1  $\mu\text{l}$  de cada uno de los iniciadores empleados y 6  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas.

6. La placa de 48 pozos se selló con un film óptico.

7. La placa sellada se mezcló en un vórtex y se centrifugó a 3500 rpm por un min. Se protegió de la luz y se mantuvo almacenada a 4 °C hasta su colocación en el equipo de qPCR.

8. Se utilizó el termociclador StepOne de Applied Biosystems, donde se introdujo el siguiente programa:

| PASO | TEMPERATURA<br>°C | TIEMPO   |
|------|-------------------|----------|
| 1    | 95                | 10 min.  |
| 2    | 95                | 15 s.    |
| 3    | 60                | 1 min.   |
| 4    | 2 y 3             | 40ciclos |

Se agregó una curva de disociación:

| PASO | TEMPERATURA | TIEMPO  |
|------|-------------|---------|
| 1    | 95          | 15 seg. |
| 2    | 60          | 1 min.  |
| 3    | 95          | 15 seg. |

9. Al término de cada reacción se verificó que existiera un solo pico por reacción en los resultados de disociación.
10. Los resultados de CT “threshold cycle” (Número de ciclos al cual es detectado el producto amplificado) se exportaron en formato de Excel para la realización de los cálculos de niveles de expresión por el método de  $\Delta\Delta C_t$ .

#### 9.5.6 Análisis estadístico.

Se realizó un ANOVA mediante el método de Dunnett ( $p < 0.05$ ) para la comparación de medias en los ensayos de determinación de niveles de expresión de los tres factores de virulencia en los distintos tiempos de incubación. Para el análisis se utilizó el programa estadístico SPSS.

## 9.6 ANÁLISIS DE CITOCINAS

La determinación de la expresión de citocinas en rebanadas infectadas con trofozoítos de *E. histolytica* se llevó a cabo utilizando el estuche comercial Multi-Analyte ELISArray® mediante el cual se analizó simultáneamente un panel de 12 citocinas empleando un protocolo convencional de ELISA. Las citocinas y quimiocinas que se analizaron fueron las siguientes: IL1A, IL1B, IL2, IL4, IL6, IL19, IL12, IL17, IFN $\delta$ , TNF $\alpha$ , G-CSF y GM-CSF. Mediante esta técnica es posible la captura y detección de anticuerpos para cada una de las proteínas contenidas en el panel y su posterior detección mediante técnicas colorimétricas. Los resultados se analizaron estadísticamente empleando un análisis de ANOVA de dos vías y el programa SPSS versión 15.

## 10 RESULTADOS

### 10.1 OBTENCIÓN DE REBANADAS DE HÍGADO DE HÁMSTER.

Se obtuvieron rebanadas de hígado de hámster para los distintos tiempos de infección (0, 6, 12, 18 y 24 h) que poseen las características adecuadas para los ensayos: grosor promedio (347 micras), diámetro (4mm), peso e integridad macroscópica (Ver figura No. 5 y Tabla No. 3).

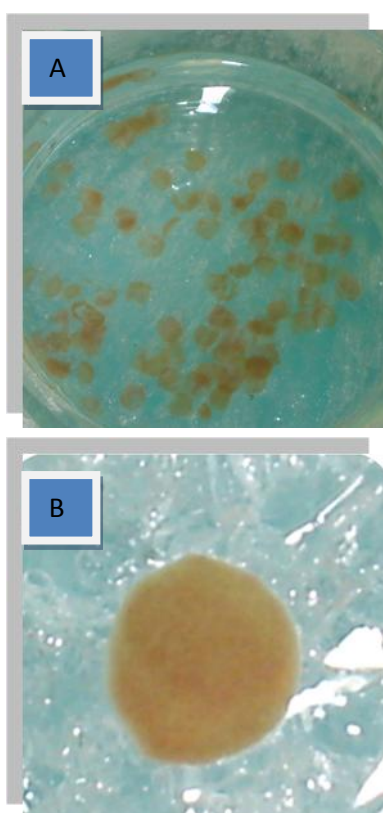


Figura No. 5 A y B) Aspecto Macroscópico de rebanadas de hígado de hámster de 4 mm de diámetro

| Repeticiones      | Medición 1 | Medición 2 | Diferencia   |
|-------------------|------------|------------|--------------|
| C                 |            |            |              |
| 1                 | 346        | 706        | 360          |
| 2                 | 369        | 720        | 351          |
| 3                 | 346        | 705        | 359          |
| 4                 | 360        | 730        | 370          |
| 5                 | 362        | 716        | 354          |
| 6                 | 345        | 725        | 380          |
| 7                 | 335        | 682        | 347          |
| 8                 | 389        | 704        | 315          |
| 9                 | 338        | 658        | 320          |
| 10                | 349        | 718        | 369          |
| 11                | 330        | 627        | 297          |
| 12                | 373        | 760        | 387          |
| 13                | 334        | 640        | 306          |
| <b>Promedio</b>   |            |            | <b>347.3</b> |
| <b>Desv. Est.</b> |            |            | <b>28.9</b>  |

Tabla No. 3.- Medición del grosor de las rebanadas obtenidas utilizando el Rebanador Brendel-Vitron en la posición 240.

## 10.2 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.

Los resultados del análisis histopatológico de las rebanadas control (sin infectar) se compararon con los resultados obtenidos de las rebanadas infectadas durante los distintos tiempos de incubación (0, 6, 12, 18 y 24 h).

### **10.2.1 Secuencia de eventos morfológicos durante la infección del tejido hepático por trofozoítos de *Entamoeba histolytica***

#### REBANADAS CONTROL (SIN AMIBAS)

Desde el tiempo 0 hasta las 24 h de cultivo, las rebanadas control mostraron una estructura histológica normal, la cual consiste en cordones de hepatocitos organizados de manera radial separados por los sinusoides hepáticos (espacio sinusoidal). Se encontró que la integridad del parénquima hepático se mantiene conservada, lo cual es un signo de viabilidad tisular. También se apreciaron elementos estructurales característicos del tejido hepático tales como venas centrales y triadas portales, estas últimas constituidas por la arteria hepática, vena portal y conducto biliar (figuras 6A y 6B). En los acercamientos microscópicos que corresponden a las figuras 6C y 6D, se aprecian detalles tales como la forma poliédrica de los hepatocitos, los cuales poseen núcleos y nucleolos prominentes.

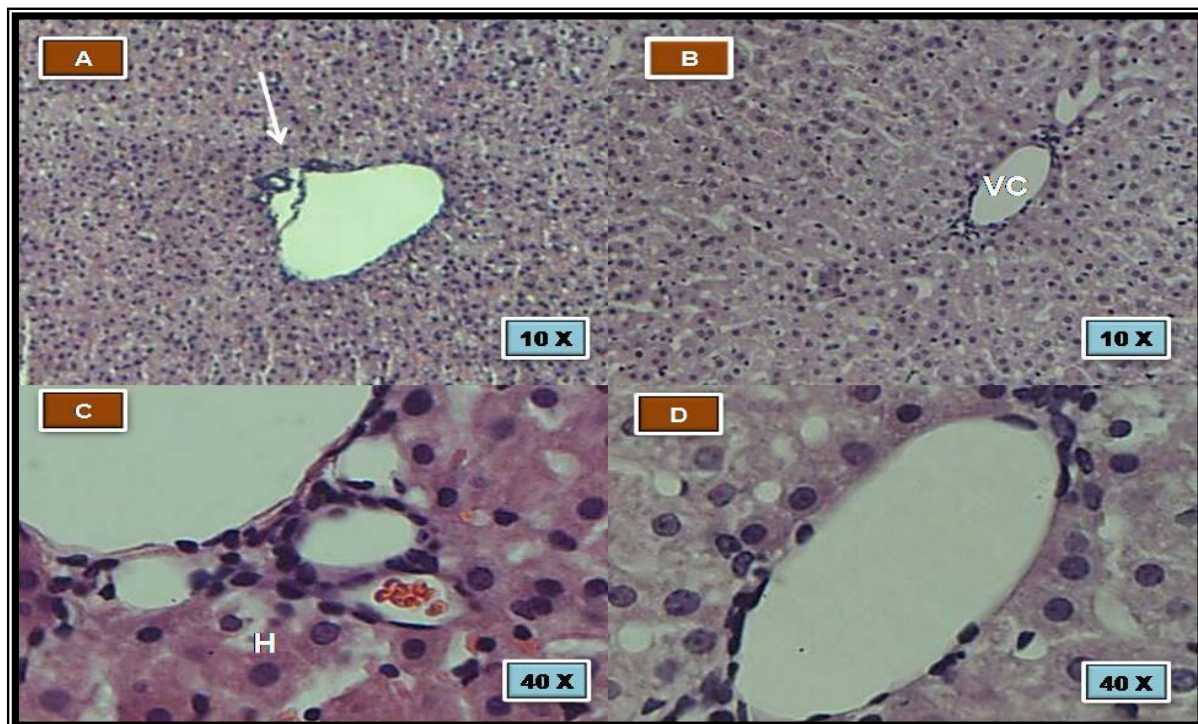


Figura No. 6.-Fotografías representativas de rebanadas control (sin amibas) incubadas durante 24 h: **A**) En vista panorámica donde se observa una triada portal (flecha); **B**) una vena central (VC), además de la disposición característica en cordones de los hepatocitos; **C y D**) Magnificación donde se observar la forma poliédrica de los hepatocitos (H). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. Tinción Hematoxilina y Eosina.

En las rebanadas incubadas durante 6 h con trofozoítos de *E. histolytica* se conserva la integridad del parénquima hepático (Figura No. 7A) y se aprecian amibas distribuidas individualmente en la periferia de la rebanada, como se demuestra mediante la tinción especial de Grocott (Figura No. 7B), también se observan sinusoides hepáticos dilatados, algunos de los cuales han sido ocupados por trofozoítos (Figura No.7C). En algunos casos los trofozoítos se encontraban rodeados por leucocitos polimorfonucleares, cuya infiltración se extiende hacia los sinusoides vecinos (Figura No.7D).



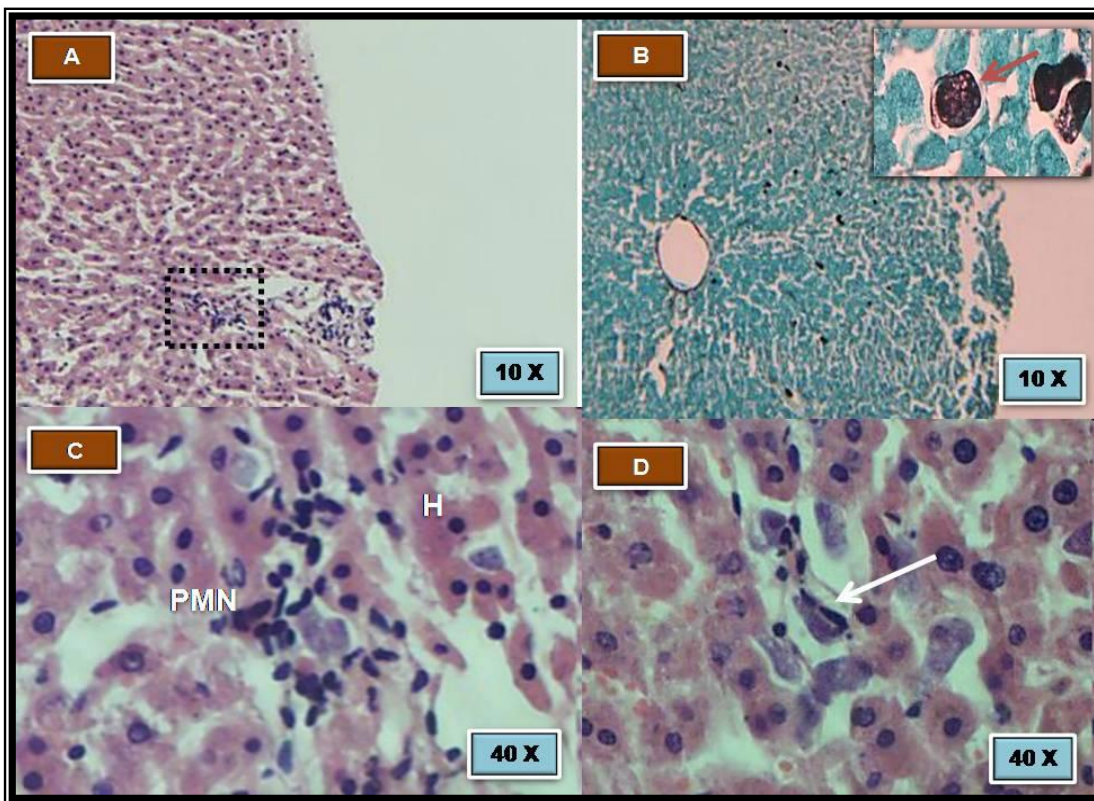


Figura No. 7.- Rebanadas de hígado de hámster 6 h de infección: **A)** Se observa la integridad del tejido y un pequeño foco inflamatorio (Recuadro punteado); **B)** Distribución de trofozoítos (Flecha roja) en la rebanada; **C)** Trofozoítos rodeados por polimorfonucleares (PMN), entre los hepatocitos (H) ; **D)** Trofozoítos (Flecha blanca) en espacios sinusoidales. Microscopía de luz. Inclusión en parafina. Tinción de Hematoxilina y Eosina (Figuras A, C, D) y Grocott- Gomori (Figura B).

A las 12 h de infección todavía se mantiene la integridad del tejido, no obstante, aparecen pequeños focos inflamatorios distribuidos en la rebanada, los cuales tienen formas irregulares y están constituidos por trofozoítos y polimorfonucleares (Figura No. 8A). También se observan leucocitos lisados (Figura No. 8B y 8C). Se incrementa la cantidad de amibas, las cuales se distribuyen más ampliamente en la rebanada (Figura No. 8D).

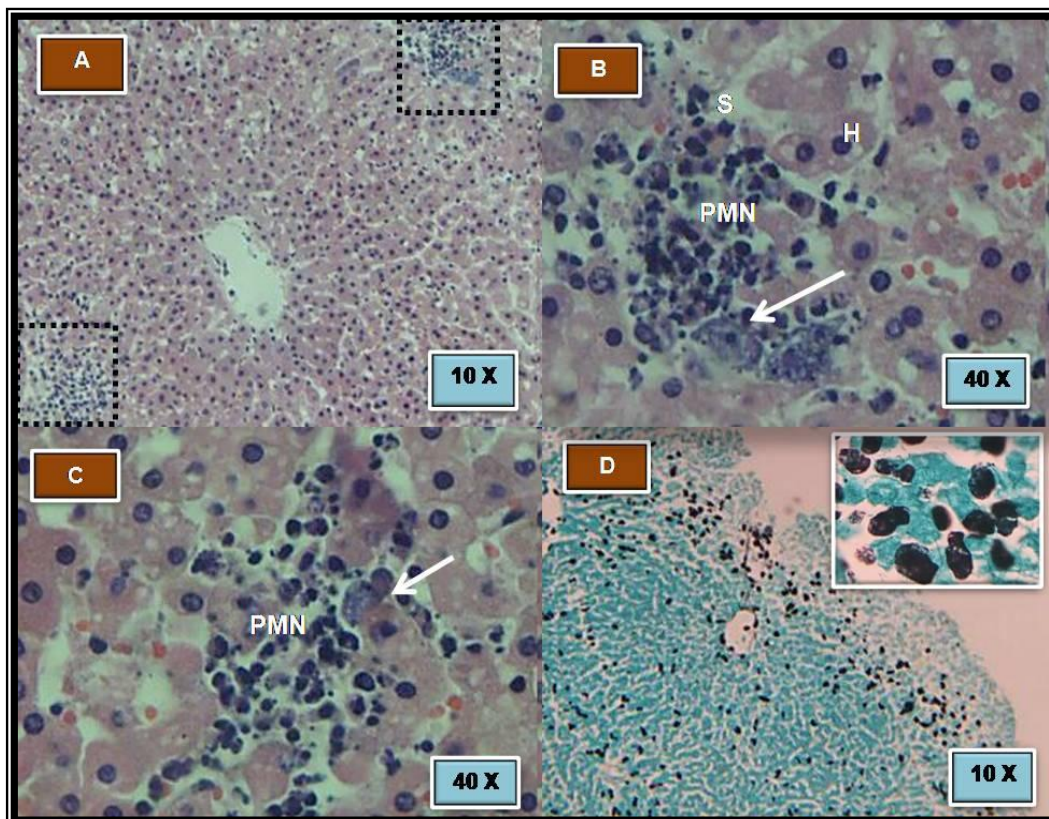


Figura No. 8.- Rebanadas de hígado de hámster infectadas durante 12 h. **A)** Se observa la distribución de dos microabscesos en la rebanada (recuadros punteados); **B y C)** Acercamiento de microabscesos: Polimorfonucleares (PMN), Trofozoítos (Flecha) en los sinudoides (S); Hepatocitos (H); **D)** Distribución de trofozoítos en la rebanada. Microscopía de luz. Inclusión en parafina. Tinción de Hematoxilina y Eosina (Figuras A, B, C) y Grocott- Gomori (Figura D).



Después de 18 h de incubación las rebanadas infectadas continúan manteniendo la integridad tisular, sin embargo existe un aumento en el tamaño del microabsceso (Figura No. 9A), así como incremento en el número de polimorfonucleares; se observan áreas de hepatocitos lisados, con signos de daño celular (Figura No. 9B). En el resto de las rebanadas, las amibas se distribuyen en grupos conspicuos (Figura No. 9C).

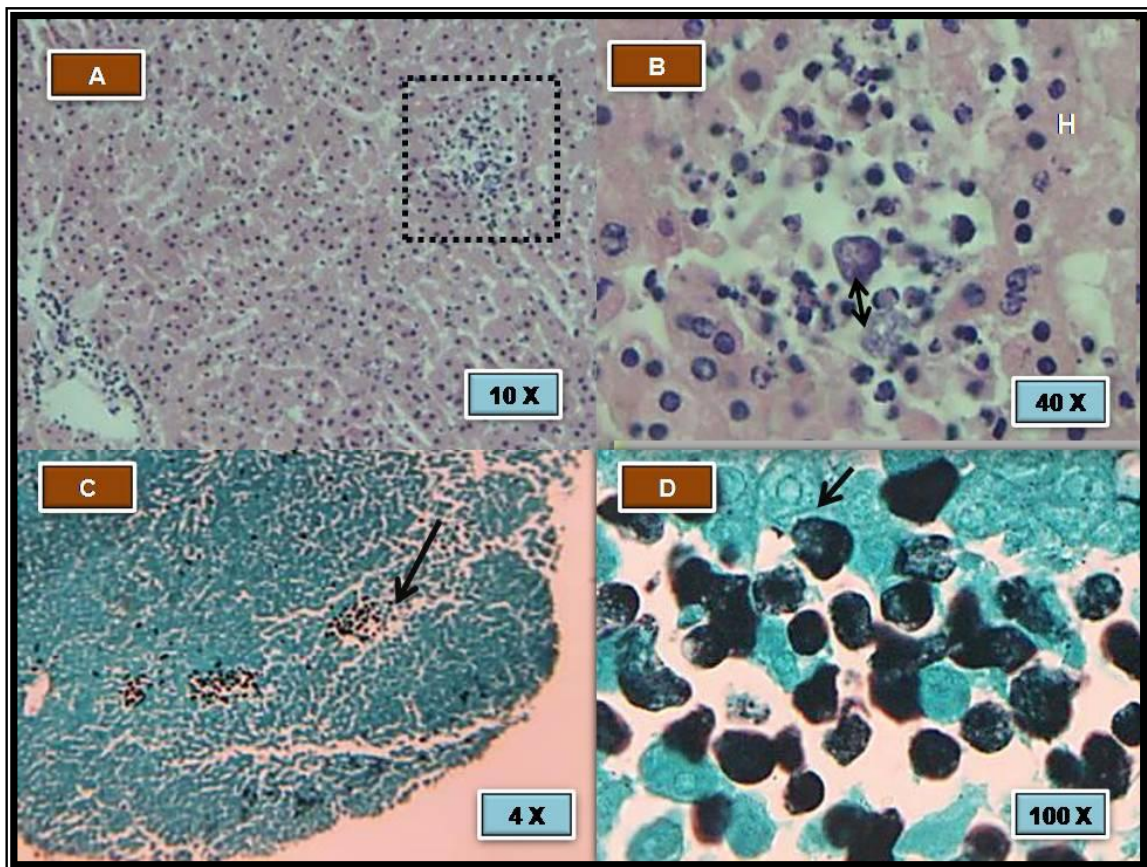


Figura No. 9.- Rebanadas de hígado de hámster a las 18 h de infección: **A)** Se observa un microabsceso de mayor tamaño en la rebanada (recuadro punteado); **B)** Acercamiento del microabsceso donde se aprecian dos trofozoítos (Flecha) rodeados por polimorfonucleares y hepatocitos (H); **C)** Distribución de trofozoítos en la rebanada. Microscopía de luz. Inclusión en parafina. Hematoxilina y Eosina (Figura No. A y B). Grocott- Gomori (Figura C y D).

A las 24 h post-infección, el área circundante al foco de inflamación que presenta una forma circular muestra necrosis extensa (Figura No.10A). En el área del microabsceso los hepatocitos presentan daño celular (Figura No, 10B), se observa un incremento de PMN y no se detectan trofozoítos (Figura No. 10C).

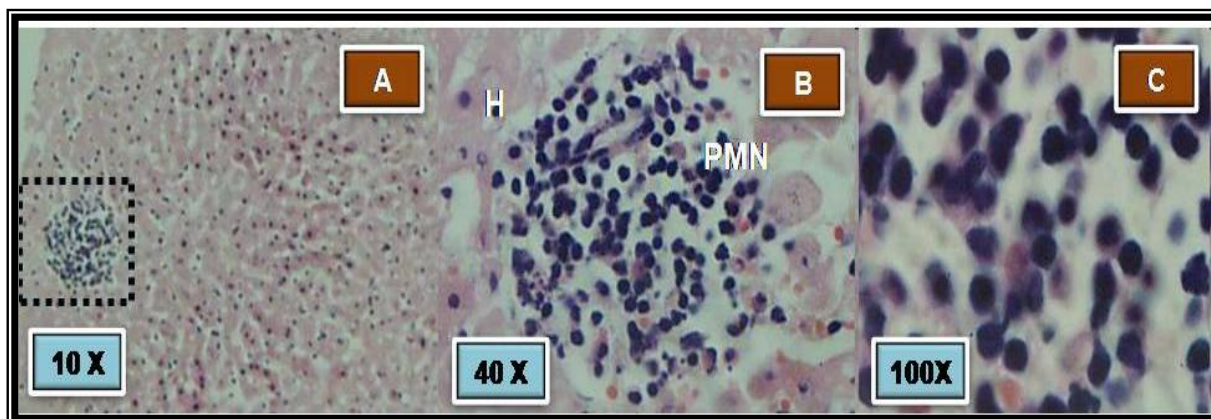


Figura No. 10.- Rebanadas de hígado de hámster de 24 h de infección: **A)** Se observa un microabsceso con forma circular en la rebanada (recuadro punteado); **B y C)** Acercamiento de microabsceso, se observa polimorfonucleares (PMN) y hepatocitos (H). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. Tinción de Hematoxilina y Eosina.

### 10.2.2 Eritrofagocitosis

Una característica distintiva que observamos en todos los tiempos de infección fue la elevada capacidad de eritrofagocitosis de los trofozoítos, por ejemplo, en la figura 11 (A y B), se pueden observar numerosos eritrocitos en el interior de un trofozoíto de *E. histolytica* durante los ensayos de infección a partir de las 6 h de infección. La eritrofagia se relaciona directamente con la virulencia de la amiba.

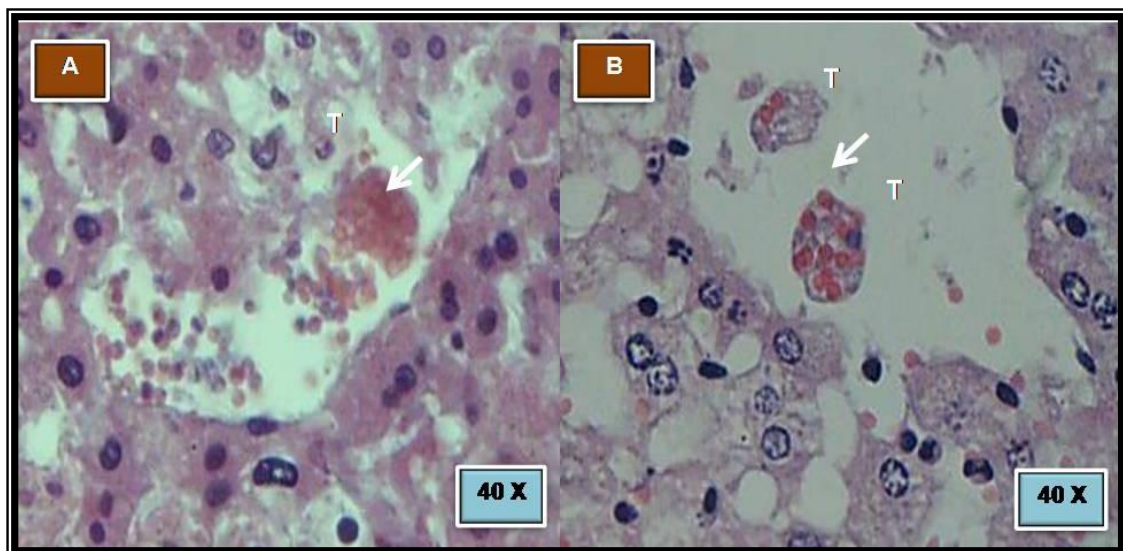


Figura No. 11.- Eritrofagocitosis de *E. histolytica* en rebanadas infectadas. Trofozoítos (T); Eritrocitos (Flecha). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. Tinción de Hematoxilina y Eosina.



### **10.2.3 Interacciones Trofozoíto-Hepatocito**

Al igual que en el modelo animal, en este modelo fue posible observar una estrecha interacción entre los trofozoítos y los hepatocitos, así como con otros elementos del parénquima hepático (Figura No. 12A y 12B). La plasticidad de la membrana plasmática de las amibas es notable, ya que éstas modifican su forma y tamaño para adaptarse a los espacios sinusoidales por donde recorren el tejido, aunque con frecuencia se movilizaban a través de vasos sanguíneos y capilares (Figura No. 12B). Un hallazgo interesante y que no ha sido descrito para *E. histolytica* fue la presencia de amibas en los conductos biliares (Figura No. 12D) lo cual fue observado con frecuencia en nuestros experimentos.

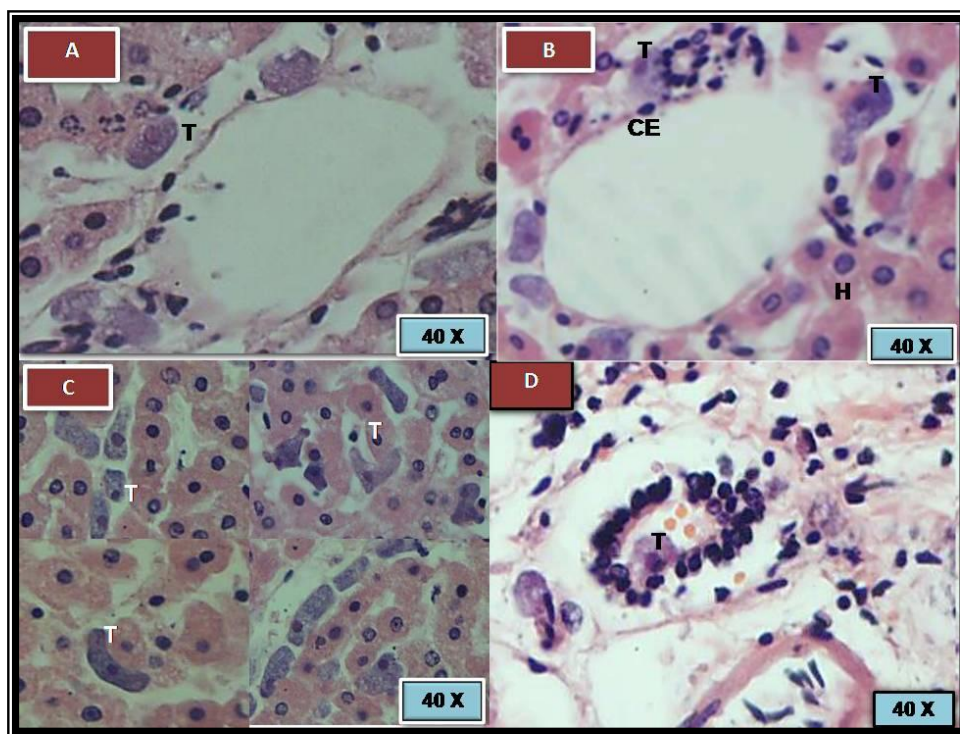


Figura No. 12.- Interacciones observadas entre los trofozoítos y los componentes hepáticos del hámster: **A)**Trofozoítos (T) Hepatocito (H); **B)**Trofozoítos (T) -Célula epitelial (CE); **C)** Plasticidad de trofozoítos; **D)** Trofozoítos dentro de conducto biliar. Microscopía de luz. Inclusión en parafina.Tinción de Hematoxilina y Eosina.

#### **10.2.4 Análisis histopatológico en los controles negativos.**

Como control se utilizaron rebanadas sin infectar durante todos los experimentos y en cada uno de los tiempos estudiados. En todos los casos se conservó la integridad del tejido hepático sin que se observaran signos de daño; según el criterio histológico, el tejido se mantuvo viable a lo largo del tiempo experimental (Ver Figura No.13).

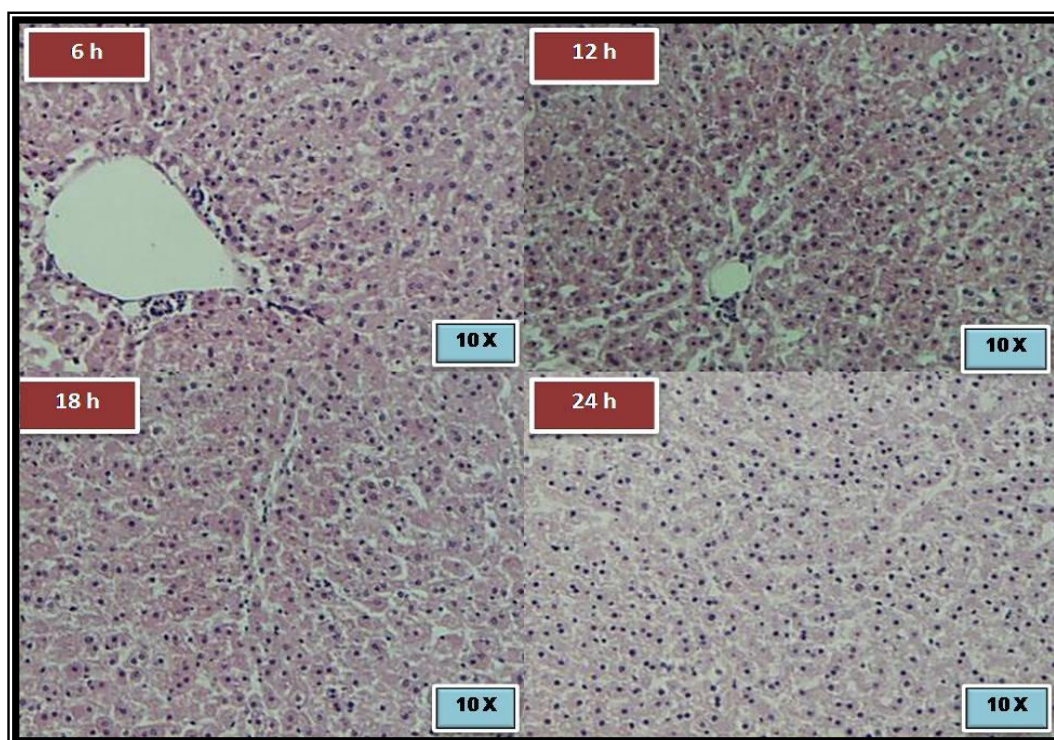


Figura No. 13.- Análisis histopatológico de las rebanadas control incubadas durante los diferentes tiempos experimentales (6, 12, 18 y 24 h). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. Tinción Hematoxilina y Eosina.

## 10.3 DETECCIÓN DE APOPTOSIS

### 10.3.1 Técnica de TUNEL

#### GRUPO CONTROL SIN TRATAMIENTO

Los cortes histológicos de hígado de hámster del grupo control sin infección evaluados mediante la técnica de TUNEL mostraron resultados negativos para esta técnica tanto en los núcleos de los hepatocitos, así como en las células epiteliales y PMN, debido a que se observan núcleos azules correspondientes a la coloración de contraste que fue Hematoxilina y Eosina. Para esta técnica se consideran positivos los núcleos con coloración marrón.

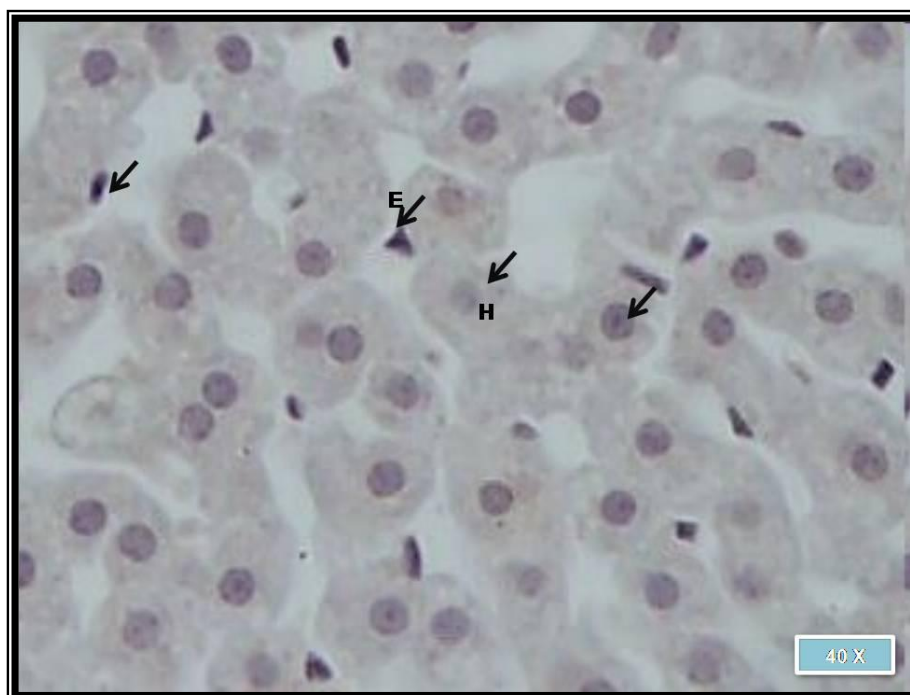


Figura No. 14.- Fotografía representativa de rebanadas de hígado de hámster del grupo control. Se observan hepatocitos (H) y células endoteliales (E). Las células con núcleos negativos se señalan con flechas. Microscopía de luz. Inclusión en parafina. Técnica de TUNEL.



**Rebanadas de Hígado de hámster Infectadas con trofozoítos de *Entamoeba histolytica* por distintos tiempos de incubación (6,12,18,24 h).**

En los cortes histológicos de hígado de hámster infectados durante 6,12,18 y 24 horas se pudieron observar resultados positivos en los núcleos de los hepatocitos, los cuales se incrementaron de manera gradual con respecto al tiempo de incubación.

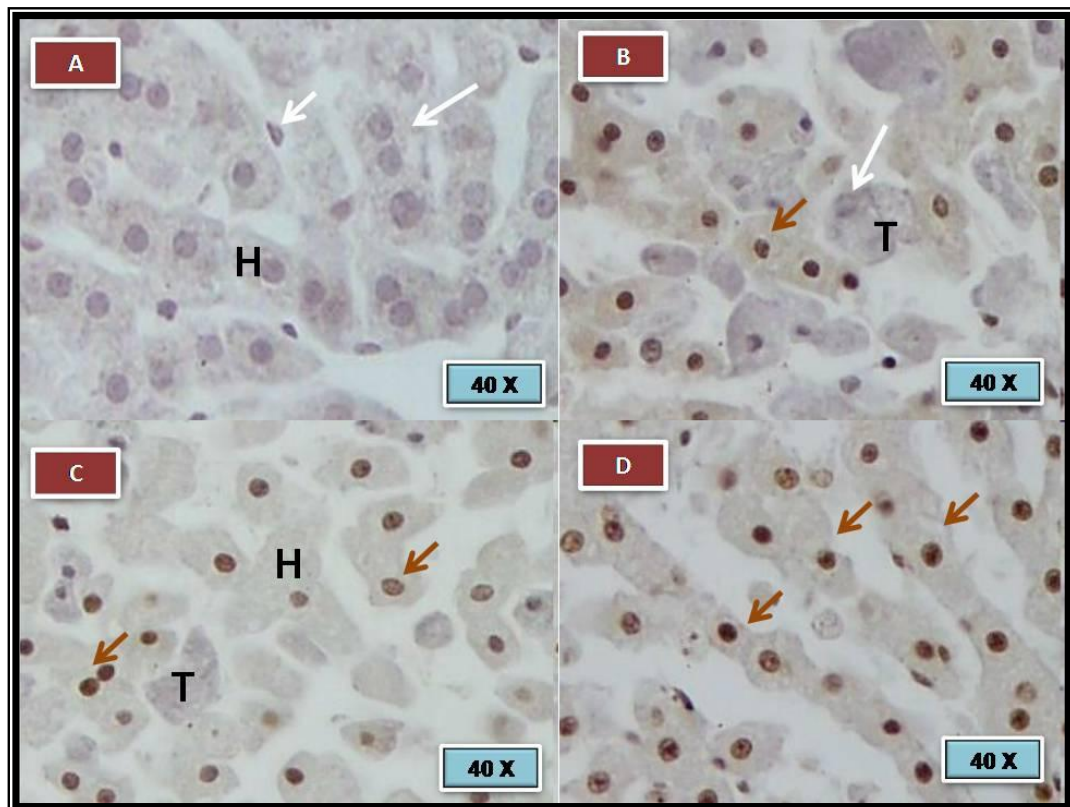


Figura No. 15.- Detección de apoptosis inducida por *E. histolytica* en rebanadas de hígado de hámster a distintos tiempos de infección. **A)** Control negativo rebanada sin infección: núcleos negativos (flecha blanca); **B, C y D)** Rebanadas representativas de los distintos tiempos de infección; núcleos positivos (flechas marrón). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. TUNEL.

### 10.3.2 Tinción de PAS (Ácido Peryódico de Schiff)

Se utilizó la tinción de PAS como un complemento a la técnica de TUNEL, así como para evaluar de manera más completa el índice de células en apoptosis. En los cortes histológicos de las rebanadas de hígado de hámster infectadas durante distintos tiempos fue posible observar los característicos núcleos positivos que exhiben condensación y fragmentación nuclear (Ver figura No. 16) los cuales se incrementan de manera gradual con respecto al tiempo de incubación, según se representa en la gráfica de la Figura No. 17.

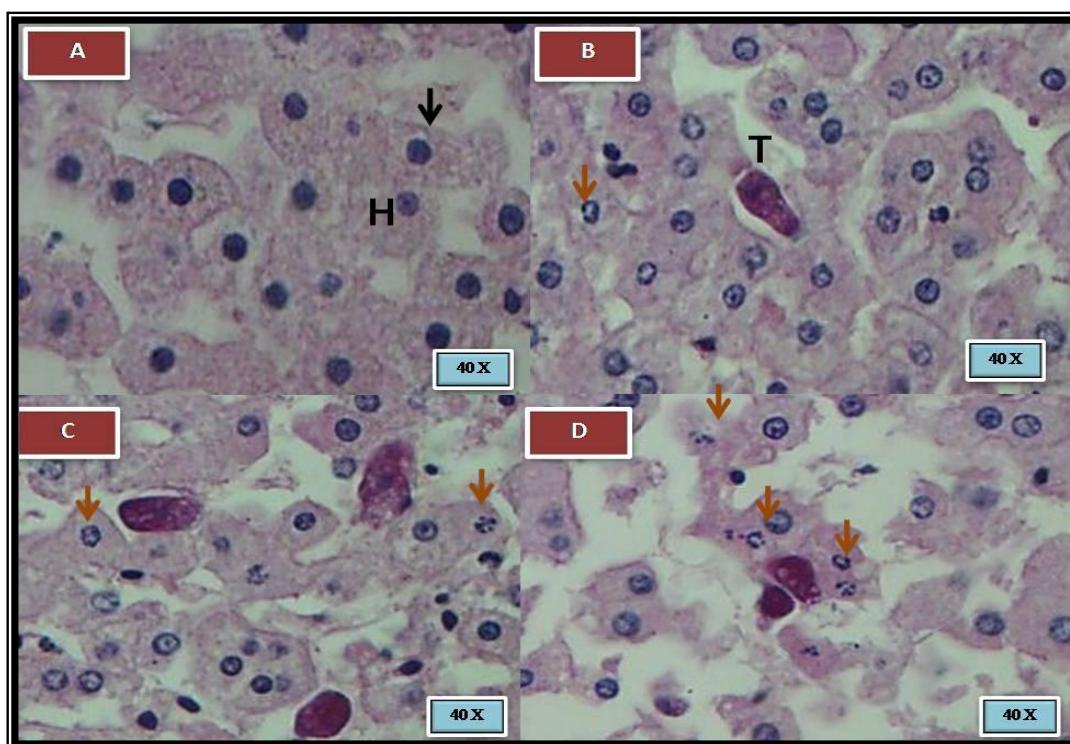


Figura No. 16.- Fotografías representativas utilizadas para la evaluación del índice apoptótico en rebanadas infectadas con trofozoítos de *E. histolytica* (T) empleando la tinción de PAS. A) Control negativo; hepatocitos (H), núcleo normal (Flecha negra). B, C y D) Rebanadas infectadas durante distintos tiempos; Núcleos apoptóticos (flecha marrón). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. Tinción de PAS.



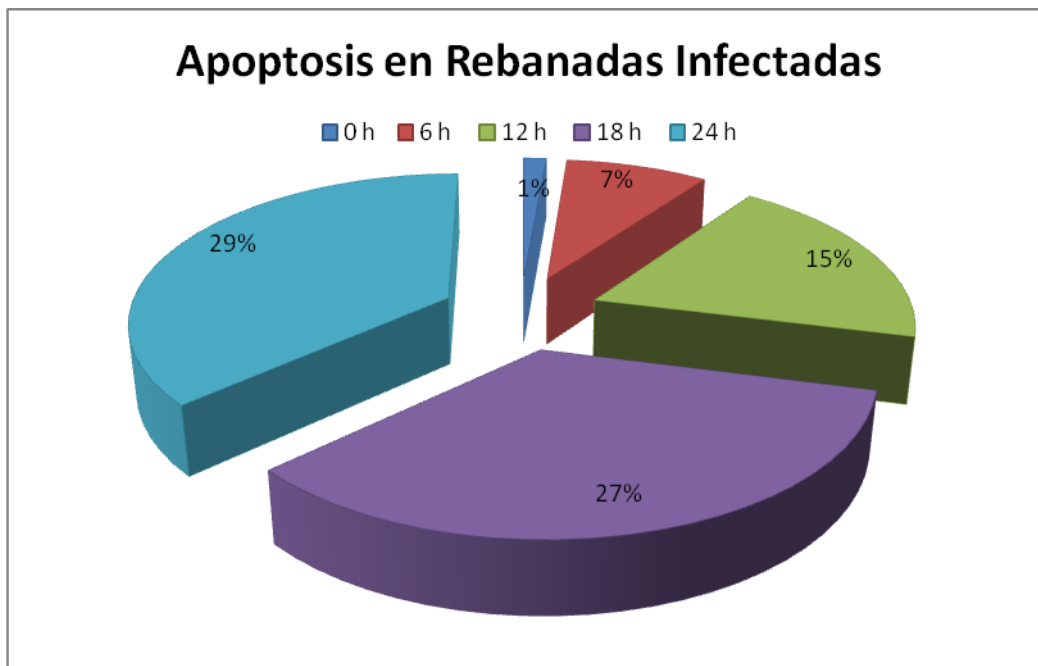


Figura No. 17.- Determinación del índice de apoptosis en rebanadas infectadas con *E. histolytica*: Se observa un incremento en los porcentajes 1% (0 h), 7% (6h), 15% (12 h), 27% (18 h) y 29% (24 h) con respecto al tiempo de incubación.

## 10.4 ANÁLISIS MOLECULAR

### 10.4.1 DETECCIÓN DE TRES FACTORES DE VIRULENCIA DE *E. histolytica* POR PCR PUNTO FINAL.

Se lograron identificar los factores de virulencia ehcp1, ehcp5 y amebaporo a partir de muestras procedentes de cultivo axénico de trofozoítos (Ver figura No. 18A) y de un “pool” de cDNA de rebanadas infectadas de los distintos tiempos (Ver figura No. 18B), ya que cada fragmento observado en el gel de agarosa al 1.5 %, corresponde con el tamaño del fragmento esperado para cada gen.

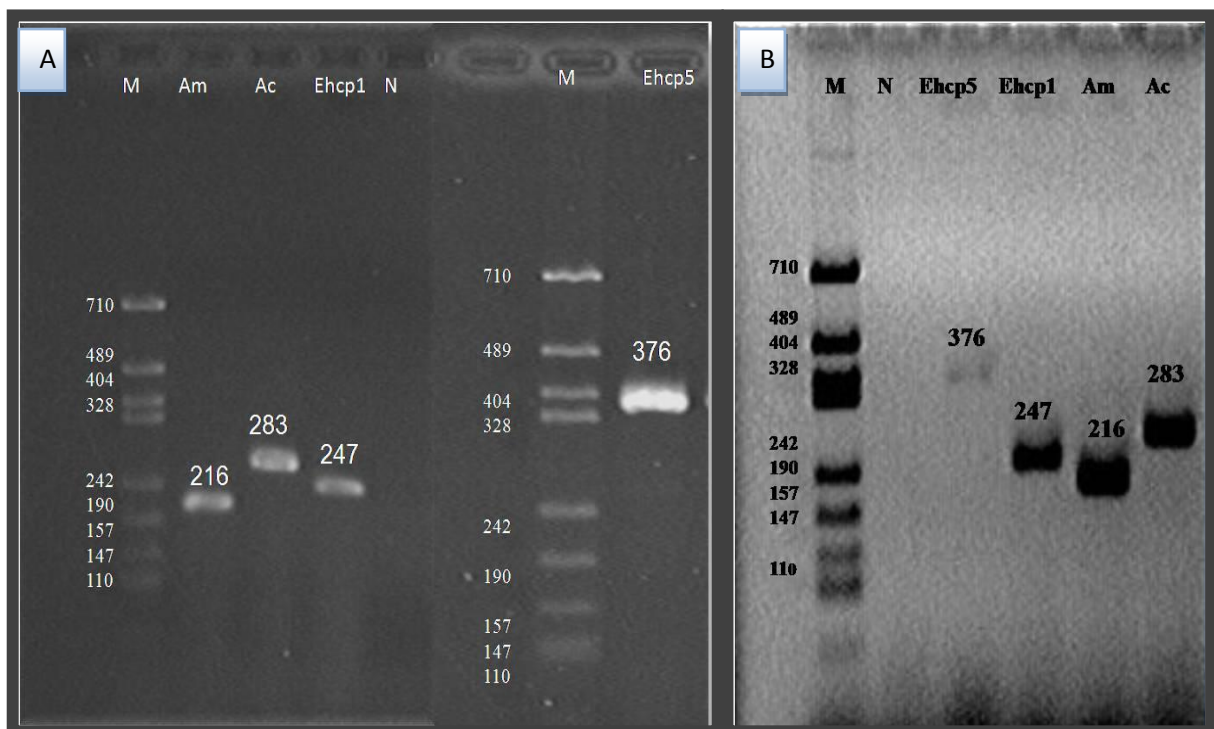


Figura No. 18. Identificación de los factores de virulencia de *E. histolytica* por PCR punto final: **A)** Muestra proveniente de cultivo axénico de trofozoítos y **B)** “Pool” de cDNA de rebanadas de hígado de hámster infectadas. Amebaporo (Am), actina (Ac), cistein-proteinasa 1 (Ehcp1), cistein-proteinasa 5 (Ehcp5), marcador de peso molecular (M) y control negativo (N). Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%

#### 10.4.2 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE qPCR.

La cuantificación de la expresión de los factores de virulencia ehcp1, ehcp5 y amebaporo de *E. histolytica* se llevó a cabo mediante el uso de la metodología de Syber Green, aplicando el esquema de cuantificación relativa ( $\Delta\Delta CT$ ). Se utilizaron los genes de actina y 18s como controles endógenos y como calibradores de comparación, trofozoítos provenientes de un cultivo axénico de *E. histolytica*. Para la estandarización del análisis cuantitativo y la selección de la concentración se utilizó un “pool” de cDNA’s obtenido a partir de rebanadas infectadas durante distintos tiempos de infección de tres experimentos realizados independientemente. Las etapas experimentales para el análisis de expresión se describen a continuación:

##### **10.4.2.1 Selección de concentración de la muestra.**

Para la selección de la cantidad de cDNA que se utilizó para el análisis de las muestras se prepararon 5 diluciones: 300, 150, 60, 30, 10 ng totales de cDNA por pozo de reacción para los tres genes de virulencia evaluados y los dos genes endógenos. De acuerdo a la gráfica No. 19 de correlación lineal se observa que los 5 genes evaluados mantiene una correlación lineal superior a 0.9 lo cual significa que la expresión se mantiene constante en cualquiera de las diluciones, por lo que se seleccionó para trabajar la concentración de 60 ng totales por pozo de reacción.

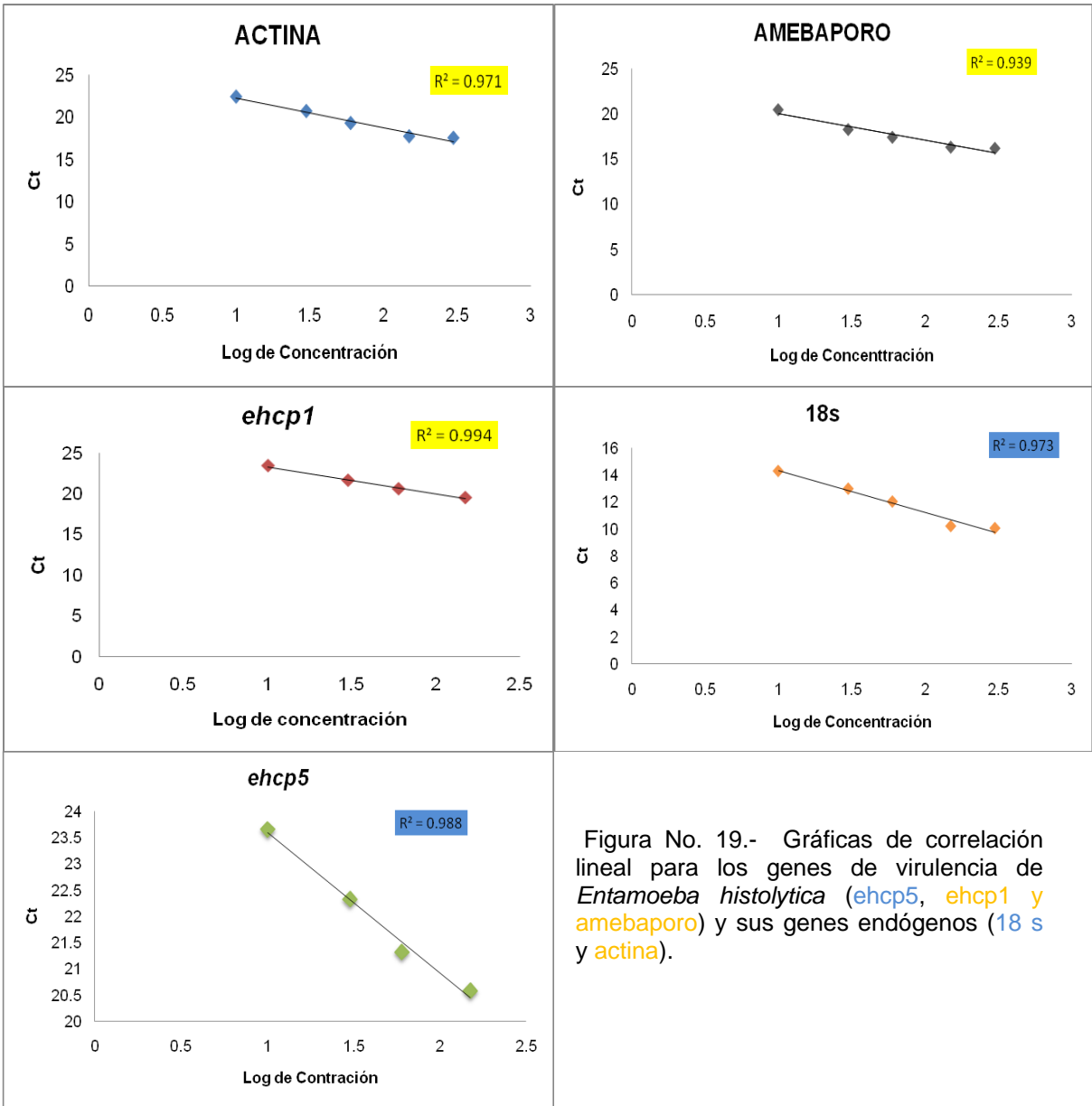


Figura No. 19.- Gráficas de correlación lineal para los genes de virulencia de *Entamoeba histolytica* (ehcp5, ehcp1 y amebaporo) y sus genes endógenos (18 s y actina).

**10.4.2.2. Rango dinámico**

Para verificar que el rango dinámico de los distintos genes (ehcp1, ehcp5 y amebaporo) y los controles endógenos sean la misma (18S y actina) se calculó el  $\Delta Ct$  de las diluciones correspondientes a 10, 30 y 60 ng de cDNA del “pool” de rebanadas infectadas para cada uno de los factores de virulencia y de los genes endógenos. En la figura No. 20 se muestra el logaritmo (log) de la concentración de las distintas diluciones vs el  $\Delta Ct$  obtenidos para cada una. Como puede observarse, la eficiencia de amplificación de los distintos factores y los endógenos empleados respectivamente son similares, ya que la pendiente de la línea recta es menor a 0.1.

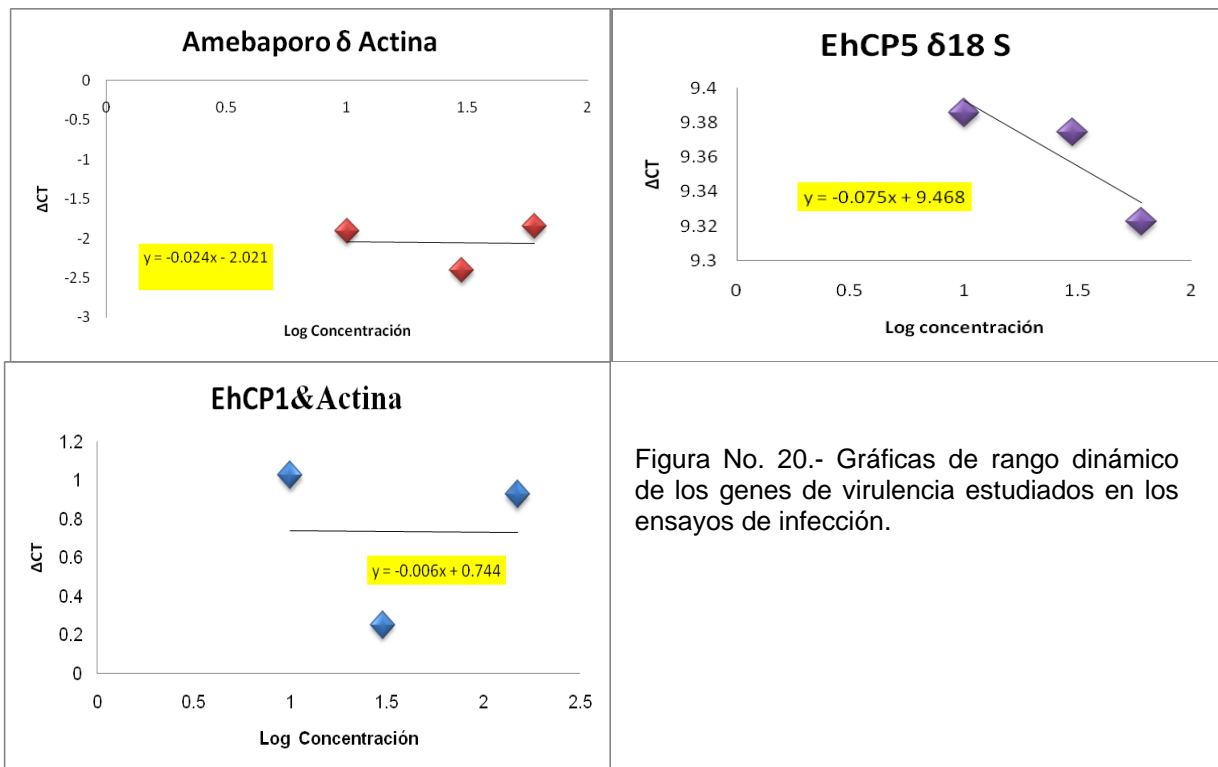


Figura No. 20.- Gráficas de rango dinámico de los genes de virulencia estudiados en los ensayos de infección.

### 10.4.2.3. Especificidad de amplificación

La especificidad de la amplificación para cada gen se muestra a través de la curva de disociación, la cual se realiza cuando se emplea un fluoróforo de intercalación como el Syber Green. Para saber si la amplificación es específica se debe observar en la curva de disociación solamente un “pico” a una  $T_m$  determinada, lo cual indica que solamente se formó un amplicón, la aparición de picos extras indican inespecificidad.

Se probaron los cinco genes a evaluar: ehcp1, ehcp5, amebaporo, actina y 18s. Se amplificaron mediante qPCR a partir del “pool” proveniente de cDNA de rebanadas infectadas durante distintos tiempos. Como puede observarse en la figura No. 21, el análisis de la curva de disociación para cada gen demuestra que los cinco genes mostraron picos específicos.

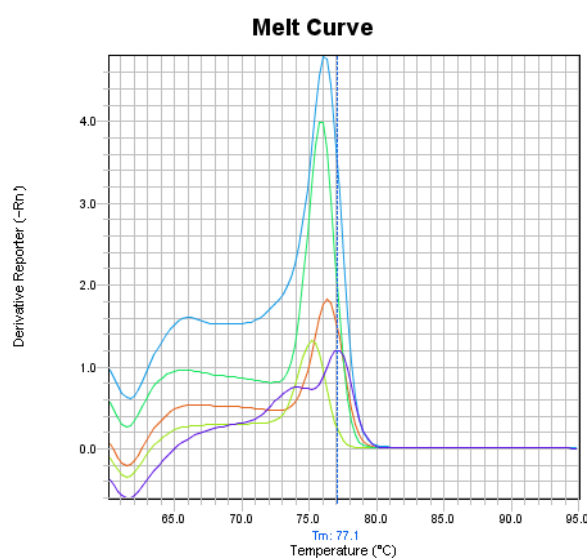


Figura No. 21.- Curva de disociación de los genes ehcp1, ehcp5, amebaporo, actina y 18S con picos específicos.

#### 10.4.3. ANALISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE Ehcp1, Ehcp5 Y AMEBAPORO DE *E. histolytica* MEDIANTE qPCR.

Una vez optimizada la reacción de qPCR se procedió a su aplicación en muestras provenientes de los distintos tiempos de infección y en cada una de ellas se analizó la expresión de ehcp1, ehcp5 y amebaporo, factores de virulencia de *E. histolytica*, con la finalidad de determinar diferencias en los niveles de expresión respecto a los trofozoítos provenientes de un cultivo axénico. Las reacciones de qPCR para cada gen y cada tiempo experimental se realizaron por duplicado a partir de tres ensayos independientes. Los Ct obtenidos de los tres experimentos se promediaron para generar dos valores de Ct, los cuales se emplearon para realizar los cálculos presentados en las tablas No. 4,5 y 6. La comparación de las muestras de rebanadas infectadas con respecto a las muestras del cultivo axénico de trofozoítos se realizó por el método de  $2\Delta\Delta Ct$  el cual se basa en la siguiente fórmula:

$$2\Delta\Delta Ct = (\text{Promedio de los Cts del gen evaluado en la muestra} - \text{Promedio de los Cts de los genes endógenos}) - (\text{Promedio de los Cts del gen evaluado en el cultivo de trofozoítos axenico} - \text{Promedio de los Cts de los genes endógenos}).$$

Este cálculo se realizó para cada gen evaluado para cada muestra, el resultado de  $2\Delta\Delta Ct$  nos da el nivel de expresión para cada gen (Figura No.22 y 23). De acuerdo a los resultados obtenidos, el gen *ehcp1* se encuentra sobre-expresado ( $p < 0.05$ ) con respecto al control a las 6 h, sin embargo esta situación cambia a partir de las 12, 18 y 24 h ya que se observa sub-expresado, con respecto al control. En cuanto al gen *ehcp5* se mantiene sobre-expresado ( $p < 0.05$ ) a las 6 y 12 h, sin embargo su expresión disminuye a partir de las 18h hasta las 24h. El gen amebaporo se observa sobre-expresado a partir de las 18 y 24h.

El análisis de los niveles de expresión de cada gen para cada muestra, se realizó mediante un análisis de ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett en la que se compararon los distintos tiempos con respecto al control.

| Muestra    | Actina     | ehcp1      | dCT        | ddCT       | 2 <sup>^</sup> -(ddCT) | Expresión relativa | SD         | Dunnett p   |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------------------|--------------------|------------|-------------|
| CT 0 h     | 19.0020733 | 18.6084461 | 0.39362717 |            |                        |                    |            |             |
| CT 0 h     | 18.1545315 | 17.7059174 | 0.44861412 |            |                        | 0.421120644        | 0.03888165 |             |
| INF 6h #1  | 28.8144989 | 27.5035839 | 1.31091499 | 0.88979435 | 1.85291198             | 1.625627313        | 0.32142906 | *P<br>0.023 |
| INF 6h #2  | 27.9132442 | 27.0084057 | 0.90483856 | 0.48371792 | 1.39834265             |                    |            |             |
| INF 12h #1 | 26.8545685 | 27.5846577 | 0.73008919 | 1.15120983 | 0.4502475              | 0.434776509        | 0.02187928 | *P<br>0.035 |
| INF 12h #2 | 26.9229317 | 27.7557373 | 0.83280563 | 1.25392628 | 0.41930552             |                    |            |             |
| INF 18h #1 | 26.5350151 | 27.8511162 | 1.31610107 | 1.73722172 | 0.29994675             | 0.280720296        | 0.02719031 | *P<br>0.013 |
| INF 18h #2 | 27.1087666 | 28.622797  | 1.51403046 | 1.9351511  | 0.26149385             |                    |            |             |
| INF 24h #1 | 36.6275482 | 38.0028801 | 1.37533188 | 1.79645252 | 0.2878816              | 0.244690639        | 0.06108124 | *P<br>0.011 |
| INF 24h #2 | 36.2939949 | 38.1840248 | 1.89002991 | 2.31115055 | 0.20149968             |                    |            |             |

Tabla No. 4.-Cuantificación relativa del gen ehcp1 usando el método comparativo Ct. \* p<0.05, estadísticamente significativo.

| Muestra    | Actina     | ehcp5      | dCT        | ddCT       | 2 <sup>^</sup> -(ddCT) | Expresión Relativa | SD         | Dunnett P |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------------------|--------------------|------------|-----------|
| CT 0h      | 15.3318567 | 26.4983654 | 11.1665087 |            |                        |                    |            |           |
| CT 0 h     | 15.3556414 | 25.7766819 | 10.4210405 |            |                        | 10.94128164        | 0.4518912  |           |
| CT 0 h     | 15.3010044 | 26.5373001 | 11.2362957 |            |                        |                    |            |           |
| INF 6h #1  | 20.3402119 | 26.6966953 | 6.35648346 | 4.58479818 | 23.9972665             | 21.70400292        | 3.24316451 | *p0.000   |
| INF 6h #2  | 20.1416416 | 26.8041401 | 6.66249847 | 4.27878316 | 19.4107393             |                    |            |           |
| INF 12h #1 | 19.1379433 | 26.1909904 | 7.05304718 | 3.88823446 | 14.807277              |                    |            |           |
| INF 12h #2 | 19.205122  | 26.1047153 | 6.89959335 | 4.04168828 | 16.4690825             | 15.63817979        | 1.17507396 | *P 0.001  |
| INF 18h #1 | 17.5771809 | 25.4109154 | 7.83373451 | 3.10754712 | 8.6191591              |                    |            |           |
| INF 18h #2 | 17.6292992 | 25.2889042 | 7.65960503 | 3.28167661 | 9.72485413             | 9.172006615        | 0.78184445 | *P 0.010  |
| INF 24h #1 | 20.3602371 | 31.9314766 | 11.5712395 | 0.62995783 | 0.6461953              |                    |            |           |
| INF 24h #2 | 19.9894104 | 31.9012947 | 11.9118843 | 0.97060267 | 0.51029285             | 0.578244075        | 0.09609755 | P0.995    |

Tabla No. 5. Cuantificación relativa del gen ehcp5 usando el método comparativo Ct. \* p<0.05, estadísticamente significativo.



| Muestra    | Actina     | Amebaporo  | dCT        | ddCT       | 2 <sup>-</sup> (ddCT) | Expresión relativa | SD         | p       |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------------|--------------------|------------|---------|
| CT 0 h     | 19.0020733 | 14.2934847 | -4.7085886 |            |                       |                    |            |         |
| CT 0h      | 18.1545315 | 14.4085646 | 3.74596691 |            |                       | 4.227277756        | 0.68067632 |         |
| INF 6h #1  | 25.6755505 | 20.7815304 | 4.89402008 | 0.66674232 | 1.5874843             | 1.491059368        | 0.13636545 | P0.913  |
| INF 6h #2  | 25.4284    | 20.7212353 | 4.70716476 | 0.47988701 | 1.39463443            |                    |            |         |
| INF 12h #1 | 26.9229317 | 20.8820896 | 6.04084206 | -1.8135643 | 3.51509651            | 3.534319519        | 0.02718544 | P 0.062 |
| INF 12h #2 | 26.8545685 | 20.7980328 | 6.05653572 | 1.82925797 | 3.55354253            |                    |            |         |
| INF 18h #1 | 28.3567905 | 22.1416664 | 6.21512413 | 1.98784637 | 3.96644453            | 4.34818504         | 0.5398626  | *P0.022 |
| INF 18h #2 | 29.9968433 | 23.5277481 | 6.46909523 | 2.24181747 | 4.72992555            |                    |            |         |
| INF 24h #1 | 31.079401  | 24.2892532 | 6.79014778 | 2.56287003 | 5.9088199             | 7.066161119        | 1.63672765 | *P0.002 |
| INF 24h #2 | 31.4972763 | 24.2302456 | 7.26703072 | 3.03975296 | 8.22350234            |                    |            |         |

Tabla No. 6.- Cuantificación relativa del gen amebaporo usando el método comparativo Ct.\*  
 p<0.05, estadísticamente significativo.

NIVELES DE EXPRESIÓN DE Ehcp1, Ehcp5 Y AMEBAPORO DE *E. histolytica* A PARTIR DE REBANDAS DE HÍGADO INFECTADAS

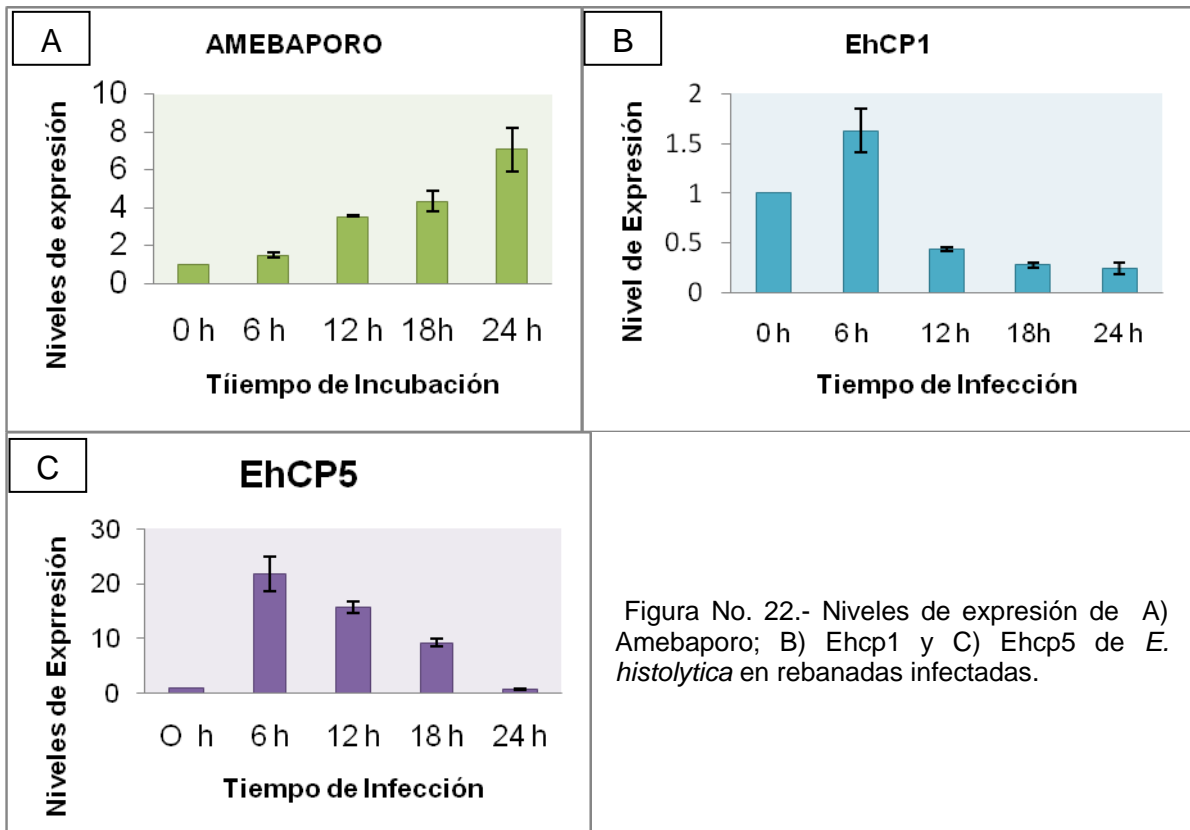


Figura No. 22.- Niveles de expresión de A) Amebaporo; B) Ehcp1 y C) Ehcp5 de *E. histolytica* en rebanadas infectadas.

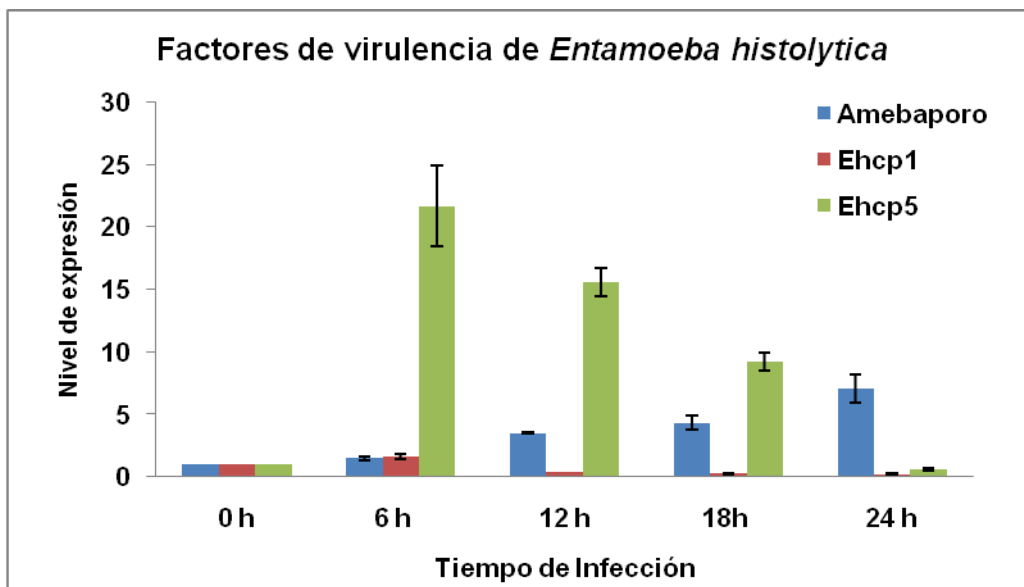


Figura No. 23.- Gráfica comparativa de los niveles de expresión de amebaporo, ehcp 1y ehcp5 en rebanadas infectadas con trofozoítos de *E. histolytica*.

### 10.5 ANÁLISIS DE CITOCINAS

Con respecto a la expresión de las citocinas estudiadas (IL1A, IL1B, IL2, IL4, IL6, IL19, IL12, IL17, IFN $\delta$ , TNF $\alpha$ , G-CSF y GM-CSF) empleando el kit Multi-Analyte ELISArray<sup>®</sup>, el análisis estadístico indica que existe un alto nivel de asociación entre las variables citocinas vs tiempo de incubación, encontrándose una  $r^2$  de 0.975.

En cuanto a la respuesta individual de cada citocina, tomando en cuenta los niveles basales a las 0 h, se encontró que la IL-2 e IL-4 fueron las que mostraron menos cambio, manteniendo niveles similares a los basales, sin embargo, el análisis estadístico sugiere que existe diferencia significativa con respecto al tiempo de incubación. Por otra parte, las IL-1A y 6 muestran un incremento constante conforme aumenta el tiempo de incubación.

La IL-1 $\beta$  se mantiene casi constante en todos los tiempos al igual que la IL-2 e IL-4. En cuanto a las citocinas IL-10, IL-12, IL-17A, IFN, TNF, G-CSF y GM-CSF, éstas presentan tendencias de respuesta interesantes que pudieran abordarse de manera más profunda en estudios posteriores. En general, considerando el tiempo de incubación y la producción de citocinas, se encontró que existe una relación directamente proporcional entre ambas variables, la cual es estadísticamente significativa (ver figura No. 24).

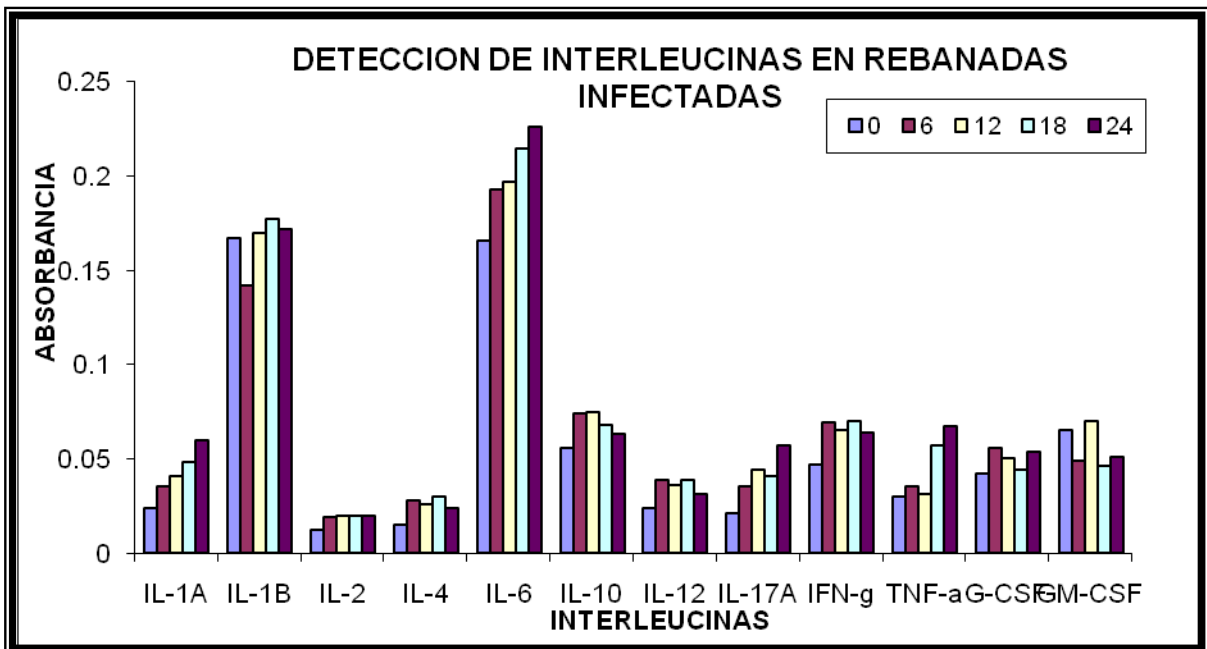


Figura No. 24.- Detección de citocinas en sobrenadantes de rebanadas de hígado de hámster infectadas con trofozoítos de *E. histolytica* mediante la técnica de ELISA.

## 1. DISCUSIÓN

El modelo de rebanadas de hígado se ha empleado principalmente para evaluar la toxicidad y metabolismo de distintos compuestos químicos (De Kanter y col., 2002; Harrigan y col., 2004), así como para estudiar mecanismos de daño y reparación del hígado (Vickers y col., 2004; Groneberg y col., 2002). Sin embargo, su utilidad como modelo de infección no ha sido reportada. Debido a la importancia de la amibiasis y del absceso hepático amibiano en nuestro País, el empleo de este sistema puede representar un método alternativo para estudiar algunos de los mecanismos involucrados en la patogénesis de esta enfermedad.

En este trabajo empleamos el sistema de rebanadas de hígado de hámster (*Mesocricetus auratus*) infectadas con trofozoítos virulentos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS, como un nuevo modelo experimental para estudiar la expresión de ehcp1, ehcp5 y amebaporo, considerados importantes factores en la virulencia de *E. histolytica*, así como la respuesta de las rebanadas ante la infección; para ello se estudió la expresión de distintas citocinas, y la inducción de apoptosis durante el establecimiento de la infección.

Al igual que las rebanadas control, las rebanadas de hígado de hámster infectadas se mantienen viables por 24h, lo anterior tomando en cuenta parámetros histopatológicos tales como la integridad del parénquima hepático y la relación núcleo-citoplasma (Figura No. 13). En distintos trabajos se ha demostrado que las rebanadas de hígado de rata, ratón y hámster pueden permanecer viables en cultivo por 72 h y hasta 10 días (Khong y col., 2007; Vickers y col., 2004; Jaramillo 2006; Muñoz 2008, Berhrsing y col., 2003).

La presencia y funcionalidad de todos los tipos celulares en las rebanadas de hígado, así como su actividad metabólica conservada, ofrecen una ventaja decisiva sobre los modelos *in vitro* para el estudio de la amibiasis hepática.

Por otra parte, los trofozoítos de *E. histolytica* también se mantuvieron viables en las rebanadas infectadas ya que produjeron pseudópodos activamente para desplazarse por el parénquima hepático, al mismo tiempo que mantuvieron una elevada actividad de eritrofagocitosis (Figura No. 11), esto último se considera un sello distintivo de la infección por *E. histolytica* y se relaciona directamente con la virulencia de este parásito (Boettner y col., 2005, 2008).

Con respecto a la progresión de la infección con amibas inoculadas por vías intraperitoneal, portal e intradérmica en el modelo de hámster, se ha observado que se producen focos múltiples de reacción inflamatoria con daño inicial de la superficie del hígado entre las 6 a 24 h post-infección (Shibayama y col., 1997; Espinosa-Cantellano y col., 1997) y que las amibas son rodeadas por células inflamatorias (Ventura Juárez y col., 2002; Tsutsumi y col., 1984). En nuestro trabajo al igual que en el modelo animal se observaron amibas desde las primeras horas de infección (Figura No. 7), y además detectamos la presencia de leucocitos polimorfonucleares que rodeaban a los trofozoítos localizados en los sinusoides hepáticos, progresando hacia la formación de microabscesos o focos de respuesta inmune constituidos por infiltrados de linfocitos y leucocitos polimorfonucleares (Figura No.8). Los microabscesos se distribuyeron en la rebanada e incrementaron de tamaño conforme avanzó el tiempo de infección (Figura No. 9) y posiblemente participaron en la eliminación de los trofozoítos, ya que a las 24 h post-infección no fue posible detectarlos (Figura No. 10).

Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Rigother y colaboradores en el 2002, quienes encontraron que la respuesta inmune celular durante las primeras horas de infección por esta amiba en el modelo del hámster es importante para la eliminación de los trofozoítos.

Al igual que en el modelo animal, fue posible observar las estrechas interacciones entre los trofozoítos de *E. histolytica* con los hepatocitos, vasos sanguíneos y células endoteliales (Figura No.12), similar a lo reportado por Ventura-Juárez y colaboradores en 1997.

Por otra parte, la muerte por apoptosis de las células del hospedero en el desarrollo del AHA, es un fenómeno que se ha estudiado recientemente. Empleando las técnicas de PAS y TUNEL, pudimos demostrar que las amibas que se encuentran infectando las rebanadas inducen apoptosis de los hepatocitos cercanos a estas (Figuras No. 15 y 16). La muerte por apoptosis ya ha sido establecida en los trabajos realizados por Blazquez y colaboradores en 2007 y Pelosof y colaboradores en 2006, quienes encontraron que la muerte de los hepatocitos y las células del sistema inmune durante la invasión de *E. histolytica* no solo es debida a la actividad citolítica de los trofozoítos, sino también de un proceso apoptótico.

Cuándo se compararon los niveles basales de expresión de ehcp1, ehcp5 y amebaporo de trofozoítos provenientes de cultivo axénico, con respecto a los niveles de expresión en las rebanadas infectadas, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los factores tiempo y tipo de factor de virulencia. Por una parte la amebaporo presenta un aumento estadísticamente significativo en su nivel de expresión a las 18 y 24 h (Figura No. 22 A). La ehcp1 presenta también un incremento en la expresión durante las primeras 6 h (Figura No. 22B), sin embargo, comienza a disminuir a partir de este tiempo y hasta las 24 h. Ocurre lo contrario con la ehcp5, la cual presenta una sobre-expresión desde las 6 a las 18 h post-infección (Figura No. 22 C).



Estos resultados están de acuerdo con estudios realizados por Freitas y colaboradores en el 2009 quienes encontraron diferencias en los niveles de expresión de ehcp5 a partir de trofozoítos aislados de lesiones hepáticas y trofozoítos provenientes de cultivos axénicos. Si se comparan los niveles de expresión entre las cistein proteasas estudiadas, ehcp5 presenta un mayor nivel de expresión que ehcp1 (Figura No. 22). A pesar de que ambas proteínas se han reportado como importantes factores de virulencia de *E. histolytica* durante el proceso de invasión y el desarrollo de AHA, la participación de ehcp5 es más importante para la formación del absceso hepático en animales de laboratorio (Tillack y col., 2006). Nuestros resultados en el modelo de rebanadas al igual que en el modelo animal refuerzan la importancia de ehcp5 en la virulencia presentada por *E. histolytica* (Tillack y col, 2006) y concuerdan con la mayor expresión de esta proteína en nuestro trabajo.

En cuanto a la determinación de citocinas por parte de la rebanada ante el proceso de infección, se encontró que del panel de las 12 citocinas (IL1B, IL2, IL4, IL19, IL12, IL17, IFN $\delta$ , TNF $\alpha$ , G-CSF y GM-CSF) solamente presentaron un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) en el nivel de expresión las citocinas IL-1A e IL-6 las cuales aumentan de manera constante a medida que aumenta el tiempo de incubación. Cabe mencionar que la IL-6 es una citocina pro-inflamatoria y multifuncional que regula varios aspectos de la respuesta inmune, como la reacción de fase aguda (Estrada y col., 2007). Los resultados de este trabajo concuerdan con lo observado en infecciones con protozoarios parásitos en la que una de las reacciones tempranas del huésped es la secreción de productos del metabolismo del ácido araquidónico y varias citocinas entre las que destacan las interleucinas IL-1 e IL-6. Por otro lado en un estudio en suero de pacientes con absceso hepático amibiano en fase aguda, la IL-6 fue la citocina que se encontró con mayor elevación entre otras citocinas estudiadas tales como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Cordero, 1999).

El modelo de rebanadas de hígado de hámster en la infección con *E. histolytica* nos permitió reducir el número de animales empleados (10 hámster) al compararlo con los empleados al utilizar el modelo animal que van de 25 hasta 100 (Tsutsumi y col 1984, 2006, Rigotherier, 2002), ya que a partir de un individuo se pudieron obtener suficientes rebanadas para los experimentos establecidos, optimizando la utilización de animales de laboratorio (Catania, 2007)

## 12 CONCLUSIONES

Las rebanadas de hígado de hámster representan un modelo alternativo para estudiar la amibiasis hepática ya que se logró montar una infección ambiana *in vitro*, similar a lo reportado en el modelo animal. Se observó la inducción de apoptosis por las amibas en las rebanadas infectadas. También se detectaron tres factores de virulencia (ehcp1, ehcp5 y amebaporo) de *E. histolytica* en las rebanadas infectadas. Se valoró la expresión de 12 citocinas por el tejido ante la infección por *E. histolytica*. Finalmente se detectó la presencia de *E. histolytica* dentro del conducto biliar.

## 13 PERSPECTIVAS

Algunas perspectivas del presente trabajo pudieran ser las siguientes:

- Realizar un análisis ultraestructural del proceso de infección e interacciones de amibas con el parénquima hepático.
- Validar algunos de los mecanismos involucrados en la patogénesis de la amibiasis.
- Estudio de nuevos fármacos antiamebianos directamente sobre tejido infectado.
- Probar nuevos métodos de detección para amibiasis hepática.
- Extender la aplicación del cultivo de rebanadas de hígado a tumores hepáticos primarios de humanos.

## 14 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andra J, Herbst R and Leippe.2003. Amoebapore archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. *Dev. Comp. Immunol.*27(4);291-304.

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.

Ankri S, Stolarsky T, Bracha R, Padilla-Vaca F, Mirelman D. 1999. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infect. Immun.* 67:421–322.

Bach PH, Vickers AEM, Fisher R, Baumann A, Brittebo E, Charlile D J, Koster H J, Lake B J, Salmon F, Sawyer W T, Skibinskil G. 1996. The Use of Tissue Slices for Pharmacotoxicology Studies. *ATLA* 24: 893-923.

Behrsing HP, Vickers AEM, Tyson CA. 2003. Extended rat liver slice survival and stability monitored using clinical biomarkers. *Biochem Biophys Res Comm* 312: 209–213.

Bernal Redondo RM. 2001. Entamoebiosis-amibiiasis intestinal. *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. *Bol Med Hosp Inf Mex.* 58: 217-219.

Berninghausen O, Leippe M. 1997. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 65:3615-3621.

Blazquez, S., M. C. Rigotherier, M. Huerre, and N. Guillen. 2007. Initiation of inflammation and cell death during liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* depends on activity of the galactose/N-acetyl-D-galactosamine lectin. *Int. J. Parasitol.* 37:425–433.

Boettner D.R., Huston C.D., Linford A.S. Buss S.N., Houpt E., Sherman N.E., Petri W.A. 2008. *Entamoeba histolytica* phagocytosis of human erythrocytes involves PATMK, a member of the transmembrane kinase family. *PLoS Pathogens* 4(1): 0122-0133.

Boettner, DR, Petr, WA. 2005. *Entamoeba histolytica* activates host cell caspases during contact-dependent cell killing. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 289: 175–184.

Bracha R., Nuchamowitz and Mirelman. 2003. Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: molecular analysis and effect on pathogenicity. *Eukaryot. Cell* 2:295.

Brendel K, Fisher RL, Krumdieck CL, Gandolfi J. 1993. Precision-cut rat liver slice in dynamic organ culture for structure-toxicity studies. *Methods in Toxicol* 1: 222-230.

Bruchhaus I, Loftus BJ, Hall N, Tannich E. 2003. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot Cell*. 2:501-509.

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., T. Jacobs, M. Leippe, and E. Tannich. 1996. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol. Microbiol.* 22:255–263.

Catania JM, Pershing AM, Gandolfi AJ. 2007. Precision-cut tissue chips as an in vitro toxicology system. *Toxicol in Vitro* 21: 956-961.

Cieslak PR, Virgin I V, Stanley SL. 1992. A severe combined immunodeficient (SCID) mouse model for infection with *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 176:1605-1609.

Cordero Perez, P. 1999. Respuesta Inflamatoria y de fase aguda en el absceso hepático amibiano mediante el estudio de leucotrienos B4,C4, E4 y D4 e interleucinas 6 y factor de necrosis tumoral alfa.

Cook, G.C. (1990) Parasitic disease in clinical practice. The Bloomsbury series in clinical science. Springer- Verlag. Lond on. G.B. 103-112.

De Kanter R, Monshower M, Meijer D, Groothuis G. 2002. Precision-cut organ slices as a tool to study toxicity and metabolism of xenobiotics with special reference to non-hepatic tissues. *Current Drug Metabolism* 3: 39-59.

Ebsen M, Mogilevski G, Anhenn O, Maiworm V, Theegarten D, Schwarze J, Morgenroth K. 2002. Infection of Murine Precision Cut Lung Slice (PCLS) with Respiratory Syncytial Virus (RSV) and *Chlamydia pneumoniae* Using the Krumdieck Technique. *Pathol Res Pract* 198: 747-753.

Eckmann L, Reed SL, Smith JR, Kagnoff MF. 1995. *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. *J Clin Invest* 96:1269-79.

Edwards RJ, Price RJ, Watts PS, Renwick AB, Tredger JM, Bobbis AR, Lake B G. 2002. Induction of Cytochrome P450 Enzymes in Cultured Precision-cut Human Liver Slices. *Drug Metab Disp* 31: 282–288.

Espinosa-Cantellano M, Castañon-Gutiérrez G, Martinez-Palomo A. 1997. In vivo Pathogenesis of *Entamoeba dispar*. Arch Med Res 28: S204-S206.

Estrada V., Morales M., Rodriguez D., Ramos M., Néquiz A., Ostoa S. 2007. IL-6 KO mice develop experimental amoebic liver infection with eosinophilia. 2007. J, Parasitol. 93(6);1424-8.

García-Zepeda EA, Rojas-Lopez A, Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P (2007) Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis. Parasite Immunol 29: 679–684.

Gilchrist C, Petri WA Jr. 1999. Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. Curr Opin Microbiol 2:433-437.

Groneberg D.A., Grosse C., Fischer A. 2002. In Vitro Models to Study Hepatotoxicity. Toxicologic Pathology. Vol 30. No.3: 394-399.

Freitas MA, Fernandes HC, Calixto VC, Martins AS, Silva EF, Pesquero JL. 2009. *Entamoeba histolytica*: cysteine proteinase activity and virulence. Focus on cysteine proteinase 5 expression levels. Exp Parasitol. 122(4):306-9.

Harrigan J.A., Vezina C.M., McGarrigle B.P., Ersing N., Box H., Maccubbin A., Olson J. 2004 DNA Adduct Formation in Precision-Cut Rat Liver and Lung Slices Exposed to Benzo(a)pyrene. Toxicological Science 77, 307-314

Huston CD, Boettner DR, Miller-Sims, V, Petri Jr, WA. 2003. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. Infect. Immun. 71: 964–972.

Jacobs T, Bruchhaus I, Dandekar T, Tannich E y Leippe M. 1998. Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. Mol. Microbiol. 27:269-276.

Jaramillo-Reyna Efrén. 2006. Rebanadas de tejidos: Un modelo alternativo en investigación biomédica. Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Keen B.L, M.E. Hidalgo, E. Orozco y J.H. McKerrow. 1990. *Entamoeba histolytica* correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of cysteine proteinase. Exp. Parasitol. 71:199-206.

Keene WE, Pettit MG, Allen S, McKerrow JH. 1986. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. J. Exp. Med. 163:536–549.

Khong Y.M., Zhang J., Zhou S., Cheung C., Doberstein K., Samper V., Yu H. 2007. Novel Intra-Tissue Perfusion System for Culturing Thick Liver Tissue. Tissue Engineering. Vol. 13.No. 9.

Lauwaet, T, M.J. Oliveira, B. Callewaert, G. De Bruyne, M. Mareel and A. Leroy 2004. Proteinase inhibitors TPCK and TLCK prevent *Entamoeba histolytica*

disturbance of tight junctions and microvilli in enteric cell layer in vitro. Int. J. Parasitol. 34: 785-794.

Lee J, Park SJ, Yong TS. 2008. Effect of iron on adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* to CHO cell monolayers. Korean J Parasitol 46:37-40.

Leippe M. 1997. Amoebapores. Parasitol Today 13:178-183.

Leippe M, Bruhn H, Hecht O, Grotzinger J. 2005. Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. Trends Parasitol 21:5-7.

Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UCM, Samuelson J, Amedeo P, Roncaglia P, Berriman M, Hirt R P, Mann B J, Nozaki T, Suh B, Pop M, Duchene M, Ackers J, Tannich E, Leippe M, Hofer M, Bruchhaus I, Willhoeft U, Bhattacharya A, Chillingworth T, Churcher C, Hance Z, Harris B, Harris D, Jagels K, Moule S, Mungall K, Ormond D, Squares R, Whitehead S, Quail M A, Rabbinowitsch E, Norbertczak H, Price C, Wang Z, Guillén N, Gilchrist C, Stroup S E, Bhattacharya S, Lohia A, Foster PG, Sicheritz-Ponten T, Weber C, Singh U, Mukherjee C, El-Sayed NM, Petri WA, Clarck CG, Embley TM, Barrel B, Fraser CM, Hall, N. 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. Nature 433 (7028):865-868.

López-Vancell R, Montfort I, Pérez-Tamayo R. 2000. Galactose-specific adhesin and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*. Parasitol Res 86:226-231.

Luaces AL, Barrett AJ. 1988. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. Biochem J 250:903–909. Moody-Haupt S, Patterson JH, Mirelman D,

McConville MJ. 2000. The major surface antigens of *Entamoeba histolytica* trophozoites are GPI-anchored proteophosphoglycans. J Mol Biol 297:409-420.

Moronvalle-Halley V, Sacré-Salem B, Sallez V, Labbe G, Gautier JG. 2005. Evaluation of cultured, precision-cut rat liver slice as a model to study drug-induced liver apoptosis. Toxicology 207: 203-214.

Murray JS. 1998. How the MCM selects Th1/Th2 immunity. Immunol Today; 19: 157–163.

Muñoz Sánchez Samuel. 2008. Análisis de la interacción de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* en rebanadas de hígado de hámster *Mesocricetus auratus* como modelo de infección por amibas patógenas. . Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Olivos G A, Tello E, Nequiz A, Gonzalez C, López V, García de L, Montfort I, Pérez T. 2004. Cysteine proteinase activity is required for survival of the parasite in experimental acute amoebic liver abscesses in hamsters. Parasitology 129, 19–25.

Orozco E, Guarneros A, Martinez Palomo A, Sanchez T. (1983) *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. Journal of Experimental Medicine 158:1511-1521.



- Parrish RA, Gandolfi AJ, Brendel K. 1995. Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci* 57: 1887-1901.
- Pinilla A, López M, Viasus D. 2008. Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. *Rev. Med. Chile* 136:118-124.
- Pelosof, L. C., P. H. Davis, Z. Zhang, X. Zhang, and S. L. Stanley, Jr. 2006. Coordinate but disproportionate activation of apoptotic, regenerative and inflammatory pathways characterizes the liver response to acute amebic infection. *Cell. Microbiol.* 8:508–522.
- Pérez Tamayo, Montfort, I., Olivos García A., Ramos E., Nequiz M. y Tello E. 2006. Amibiasis hepática. *Rev Gastroenterol Mex*, Vol 71, Supl.2
- Pfaller W, Balls M, Clothier R, Coecke S, Dierickx P, Ekwall B, Hanley BA, Hartung T, Prieto P, Ryan M P, Schmuck G., Ladowski D, Vericat JA, Wendel A, Wolf A, Zimmer J. 2001. Novel Advanced *In Vitro* Methods for Long-term Toxicity Testing. *ATLA* 29: 393-426.
- Plazar J, Hreljac I, Pirih P, Filipic M, Groothuis GMM. 2007. Detection of xenobiotic-induced DNA damage by the comet assay applied to human and rat precision-cut liver slices. *Toxicology In Vitro*, 1-9.
- Que X, Reed SL. 2000. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 13:196-206.
- Ravdin, J.I. 1986. Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*. Studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.* 8: 247-260
- Reed SL, Bouvier J, Pollack AS, Engel JC, Brown M, Hirata K, Que X, Eakin A, Hagblom P, Gillin FD, McKerrow JH. 1993. Cloning of a virulence factor of *Entamoeba histolytica*: pathogenic strains possess a unique cysteine proteinase gene. *J Clin Invest* 91:1532–1540.
- Reinertson J.W. Thompson P.E. 1951. Experimental amebic hepatitis in hamsters. *Society for Experimental Biology and Medicine* 76:518-520.
- Rigothier MC, Khun H, Tavares P, Cardona A, Huerre M, Guillén N. 2002. Fate of *Entamoeba histolytica* during Establishment of Amoebic Liver Abscess Analyzed by Quantitative Radioimaging and Histology. *Inf Imm* 70: 3208–3215.
- Said-Fernández S, Carranza-Rosales, MP, Elizondo-Herrera A, Vargas-Villarreal J, González-Ramírez D, Martínez-Rodríguez H. 1997. Modelos celulares para el estudio de efectos tóxicos de fármacos y metales pesados. *Gac Méd Méx* 33: 586-593.
- Shibayama M, Campos-Rodríguez R, Ramirez-Rosales A, Martinez-Palomo A, Tsutsumi V. 1998. *Entamoeba histolytica*: Liver Invasion and Abscess Production by Intraperitoneal Inoculation of Trophozoites in Hamsters, *Mesocricetus auratus*. *Experimental Parasitology* 88, 20-27.

Shibayama M, Campos-Rodríguez R, Ramirez-Rosales A, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V. 1997. Morphological Analysis of Amebic Liver Abscess Produced by Intraperitoneal Inoculation of *Entamoeba histolytica* Trophozoites in Hamsters. Arch Med Res 28: S207-S210.

Shibayama-Salas M, Navarro-García F, López-Revilla R, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V. 1997. In vivo and in Vitro intestinal amebiasis in gerbils. Parasitol Res 83:170-176.

Singh D, Naik SR, Naik S. 2004. Contact of *Entamoeba histolytica* with baby hamster kidney-21 (BHK-21) cell line on cysteine proteinase activity. Indian J Med Res 119:157-61.

Singh D, Naik SR, Naik S. 2004. Role of cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* in target cell death. Parasitology 129(Pt 2):127-35.

Sloane, B.F., J. Rozhin, J.S. Hatfield, J.D. Crissman, and K.V. Honn. 1987. Plasma membrane-associated cysteine proteinases in human and animal tumors. Exp. Cell. Biol. 55:209-224.

SSA, 2006. Información Epidemiológica de Morbilidad 2005. Secretaría de Salud. México.

Stanley SL. 2003. Amoebiasis. Lancet 361:481-489.

Tanimoto M, Sepulveda B, Vazquez Saavedra J.A, Landa I. 1971. Lesiones producidas en el hígado por inoculación de *Entamoeba histolytica* cultivada en medio axénico Archivos de Investigación Médica (Mex) 2:275-284.

Tay Zavala J; Velazco Castrejon O; Lara Aguilera R y Gutierrez Quiróz M. 2002. En Parasitología Médica; Cap.5;Entamoebiasis o Amibiasis; Edit.Mendez Editores; Edición: Septima; 63-86.

Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA & Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 1994; **83**: 113–118.

Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nolchen B, Judmaier G, and Huber C. 1992 Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. Gastroenterology. 103: 264-274.

Tillack M., Nowak N., Lotter H., Bracha B., Mirelman D., Tannich E., Bruchhaus I., 2006. Increased expression of the major cysteine proteinases by stable episomal transfection underlines the important role of EhCP5 for the pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol. 149(1):58-64.

Tsutsumi V, Mena-Lopez R, Anaya-Velazquez F, Martínez-Palomo A. 1984. Cellular Bases of Experimental Amebic Liver Abscess Formation. AJP 117: 81-91.

Tsutsumi V, Shibayama M. 2006. Experimental amebiasis: A selected review of some in vivo models. Arch Med Res 37:210-220.

Urra E. López J.; Niihez H., Sandoval C., y Francis P. 2004. Absceso Hepatico Amebiano Multiple con Ruptura a la Pared Abdominal. Caso Clinico. Informe Medico 6 (ti): S61-36M

Van de Bovenkamp M, Groothuis GMM, Draaisma AL, Merema MT, Bezuijen J I, Van Gils MJ, Meijer DKF, Friedman SL, Olinga P. 2005. Precision-cut liver slices as a new model to study toxicity-induced hepatic stellate cell activation in a physiologic milieu. *Tox Sci* 85: 632-638.

Velásquez C, Shibayama-Salas M, Aguirre-García J, Tsutsumi V, Calderón J. 1998. Role of the neutrophils in the innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasite Immunol* 20:255-262.

Ventura-Juárez J, Campos-Rodríguez R, Tsutsumi V. 2002. Early interactions of *Entamoeba histolytica* trophozoites with parenchymal and inflammatory cells in the hamster liver: an immunocytochemical study. *Can J Microbiol* 48: 123–131.

Ventura-Juarez J, Campos-Rodríguez R, Ramirez-Rosales A, Martinez-Palomo A, Tsutsumi V. 1997. Early in vivo Interaction of *Entamoeba histolytica* Trophozoites with Hepatic Parenchymal and Inflammatory Cell of Hamster. *Arch Med Res* 28: S211-S213.

Verril C, Davies J, Millward-Sadler H, Sundstrom L, Sheron N. 2002. Organotypic liver culture in a fluid-air interface using slices of neonatal rat and adult human tissue a model of fibrosis in vitro. *J Pharmacol Toxicol Methods* 48: 103-110.

Vickers AEM, Saulnier M, Cruz E, Merema MT, Rose K, Bentley P, Olinga P. 2004. Organ Slice Viability Extended for Pathway Characterization: An in Vitro Model to Investigate Fibrosis. *Toxicol Sci* 82:534-544.

WHO, 1997. WHO Amoebiasis Report, 1997.

Willhoeft UL, Hamann E, Tannich E. 1999. A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. *Infect Immun* 67:5925–5929.

Zhang X, Zhang Z, Alexander D, Brancha R, Mirelman D, and Stanley S.L. Jr. 2004. Expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis. *Infect. Immun.* 72; 678-683.

Zhang T, Cieslak PR, Stanley SL. 1994. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. *Infect Immun* 62:1166-1170.

## 15. APÉNDICE A

### TÉCNICAS

#### A1.-Técnica Histológica para muestras incluidas en parafina.

- 1) Obtención de la muestra.
- 2) Fijación en formaldehído al 4 % amortiguado.
- 3) Deshidratación en alcoholes graduales 80-100%
- 4) Aclaración con xilol.
- 5) Pre inclusión (Impregnación en parafina).
- 6) Inclusión definitiva para la formación del bloque.
- 7) Microtomía.
- 8) Adhesión de los cortes en baño de flotación.
- 9) Desparafinar e hidratar
- 10) Tinción.
- 11) Deshidratación y aclaración.
- 12) Montaje con resina sintética.

#### A2.-Tinción con Hematoxilina y eosina (H y E).

- 1) Desparafinar con xilol 5 min.
- 2) Xilol 5 min.
- 3) Alcohol absoluto 2 min.
- 4) Alcohol 96 % 2 min.
- 5) Alcohol 80% 2 min.
- 6) Alcohol 70% 2 min.
- 7) Agua destilada 10 inmersiones.
- 8) Hematoxilina de Harris 7 min.
- 9) Agua de la llave 10 inmersiones.
- 10) Alcohol ácido 2 inmersiones.
- 11) Agua de la llave 10 inmersiones.
- 12) Alcohol amoniacal 2 inmersiones.
- 13) Agua de la llave 10 inmersiones.
- 14) Alcohol 96 % 10 inmersiones.
- 15) Eosina 20 seg.

- 16) Alcohol 96 % 10 inmersiones.
- 17) Alcohol 96 % 10 inmersiones.
- 18) Alcohol 96 % 10 inmersiones.
- 19) Alcohol 96 % 10 inmersiones.
- 20) Alcohol absoluto 10 inmersiones.
- 21) Alcohol isopropílico 10 inmersiones.
- 22) Xilol 5 min.
- 23) Xilol 5 min.
- 24) Montaje con resina sintética.

### **A3.-Tinción de Ácido Peryódico de Schiff (PAS).**

- 1) Desparafinar con xilol 5 min.
- 2) Xilol 5 min.
- 3) Alcohol absoluto 2 min.
- 4) Alcohol 96% 2 min.
- 5) Alcohol 80% 2 min.
- 6) Alcohol 70% 2 min.
- 7) Agua destilada 10 inmersiones.
- 8) Ácido peryódico 0.5 % 15 min.
- 9) Agua destilada 2 min.
- 10) Reactivo de Schiff 45 min.
- 11) Agua de la llave 10 min.
- 12) Hematoxilina de Harris 8 min.
- 13) Agua de la llave 10 inmersiones.
- 14) Alcohol ácido 2 inmersiones.
- 15) Agua de la llave 10 inmersiones.
- 16) Alcohol amoniacal 0.5% 2 inmersiones.
- 17) Agua de la llave 10 inmersiones.
- 18) Alcohol 96 % 10 inmersiones.
- 19) Alcohol 96 % 10 inmersiones.
- 20) Alcohol absoluto 10 inmersiones.
- 21) Alcohol isopropílico 10 inmersiones.
- 22) Xilol 5 min.
- 23) Xilol 5 min.
- 24) Montaje con resina sintética.

**A4.- Tinción de Grocott-Gomori.**

- 1) Desparafinar con xilol 5 min.
- 2) Xilol 5 min.
- 3) Alcohol 95 % 10 inmersiones.
- 4) Acido crómico 5 % por 1 h a T.A.
- 5) Agua destilada 10 inmersiones.
- 6) Bisulfito de sodio 1 % 1 min.
- 7) Agua destilada 10 min.
- 8) Agua destilada 10 inmersiones (4 cambios).
- 9) Solución de trabajo Metamina-Nitrato de plata 60 min. A 56 °C.
- 10) Agua destilada 10 inmersiones (6 cambios).
- 11) Cloruro de Oro 0.1 % 2-5 min.
- 12) Agua destilada 10 inmersiones.
- 13) Tiosulfato de sodio 0.2 % 5 min.
- 14) Agua destilada 10 inmersiones.
- 15) Solución verde 45 segundos.
- 16) Alcohol 96 % 10 inmersiones.
- 17) Alcohol 96 % 10 inmersiones.
- 18) Xilol 5 min.
- 19) Xilol 5 min.
- 20) Montaje en resina sintética.

**A5.- Método Inmunohistoquímico para detectar la fragmentación de la cromatina utilizando TUNEL.**

Para muestras fijadas con paraformaldehído al 4% incluidas en parafina y cortes de 6 µm.

**I.- DESPARAFINAR:**

- 1.- Colocar los cortes en estufa a 57 °C, 5 min.
- 2.- Pasar cortes a 2 cambios de xilol 5 min c/u.
- 3.- Hidratar en alcoholes graduales 100%, 95% y 70%, 5 min c/u.
- 4.- Sumergir en PBS 1X, 2 cambios 5 min c/u.

**II.- PROTOCOLO DEL KIT**

- 1.- Cubrir con 50 µl/muestra de solución de proteinasa K, incubar 20 min a 37 °C
- 2.-Lavar 2 veces en agua desionizada 2 min c/u.
- 3.- Sumergir las muestras en solución bloqueadora por 5 min a TA.
- 4.-Lavar las muestras en PBS 1 X, 1 min.
- 5.- Sumergir en Buffer TdT 1X, 5 min.

- 6.-Cubrir la muestra con 50 µl de mezcla de reacción de marcaje e incubar por 24 h a 4°C.
  - 7.- Sumergir en Buffer Stop TdT 1 X, 5 min a TA.
  - 8.- Lavar 2 veces en PBS 1X, 2 min c/u, TA.
  - 9.- Cubrir la muestra con 50 µl de solución Strep-HRP e incubar 10 min. A 37 °C.
  - 10.- Lavar 2 veces en PBS 1 X, 2 min c/u.
  - 11.- Sumergir en solución de DAB 10 min.
  - 12.- Lavar en varios cambios de agua desionizada 2 min c/u.
- III.- CONTRATINCION:
- 1.- Sumergir las muestras en agua desionizada por 2 min.
  - 2.- Sumergir las muestras 20 seg en Hematoxilina y Eosina.
  - 3.- Lavar las muestras subsecuentemente sumergiéndolas 10 veces en c/u:
    - Agua desionizada.
    - Etanol 70%, 2 cambios.
    - Etanol 95%, 2 cambios.
    - Etanol 100%, 2 cambios.
    - Xilol 2 cambios.
  - 4.- Limpiar el exceso de xilol.
  - 5.- Montar y guardar.

#### **A6.- Procedimiento para el ensayo de ELISA**

A) Preparación de la muestra.

##### **Muestras obtenidas a partir de sobrenadantes de cultivo de rebanadas:**

Remover cualquier partícula mediante centrifugación por 10 minutos a 1000 xg procesar inmediatamente o realizar alícuotas y almacenar las muestras a ≤ -20 °C. Evitar ciclos de congelación y descongelación.

B) Sacar la placa de ELISA de su bolsa y seguir el protocolo:

- A. Pipetear 50 µl del buffer de ensayo en cada pocillo.
- B. Agregar 50 µl de buffer de dilución de la muestra dentro de cada pocillo en la fila A dentro de la placa ya que se tomara como control negativo.
- C. Agregar 50 µl de cada muestra y/o diluciones en cada pocillo de las filas siguientes ( B a G) dentro de la placa.
- D. Agregar 50 µl del coctel de estándar de antígeno final dentro de la fila H como control positivo.



- E. Cubrir la placa y agitar suavemente por 10 segundos para mezclar e incubar por 2 h a 37°C.
- F. Lavado de la placa de ELISA :
- Decantar o aspirar el contenido de los pocillos.
  - Lavar los pocillos agregando 350 µl del buffer de lavado 1X.
  - Seguir con agitación suave por 10 segundos. Decantar o aspirar.
  - Poner boca abajo la placa sobre una toallita de papel para remover cualquier residuo de buffer.
  - Repetir lo anterior en dos ocasiones más, para completar tres lavados.
- G. Adicionar 100 µl de cada anticuerpo diluido a los pocillos correspondientes.
- H. Incubar la placa por 1 h a 37°C.
- I. Lavar la placa de ELISA como se describe en el paso F.
- J. Agregar 100 µl de la dilución Avidin-HRP 1X a cada pocillo.
- K. Cubrir la placa y agitar gentilmente por 10 segundos para mezclar.
- L. Incubar por 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad.
- M. Lavar la placa de ELISA como se describe en el paso F.
- N. Agregar 100 µl de la solución de desarrollo de color a cada pocillo.
- O. Incubar la placa por 15 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- P. Agregar 100 µl de la solución stop a cada pocillo en el mismo orden como se agregó la solución de desarrollo de color. El color cambia de azul a amarillo.
- Q. Leer la absorbancia a 450 nm dentro de los 30 minutos después de parar la reacción (15 min). Si es posible hacer corrección de la lectura a 570 nm y se le resta la de 450 nm.

## 16 APENDICE B (SOLUCIONES)

### Agua DEPC

Se preparo añadiendo 1ml de DEPC 6.9M (dietilpirocarbonato) en 1l de agua destilada, se homogenizó por agitación, se incubó a 37 °C por un mínimo de 12 h, y se esterilizó por autoclave durante 15 min para hidrolizar.

### Buffer Krebs-Bicarbonato (KB)

Se pesaron 13.8 g de Cloruro de Sodio (NaCl), 0.72 g de Cloruro de Potasio (KCl), 0.26 g de fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 4.22 g de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), 9.0 g de D-Glucosa anhidra (CH<sub>2</sub>OH(CHOH)<sub>4</sub>CHO), 0.85 g de Cloruro de Calcio (CaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O) y 0.59 g de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O), los cuales se disolvieron en 1.8 l de agua MiliQ. Se ajustó el pH a 7.4 y se aforó a 2 l. Posteriormente se esterilizó por filtración, utilizando unidades de filtración con diámetro de poro de 0.22 µm. Se almacenó a 4 °C hasta su uso.

### Buffer PBS

Se pesaron 13 g de cloruro de sodio (NaCl), 5.6 g de fosfato de potasio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0.8 g de fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), los cuales se disolvieron en 1.8 l de agua MiliQ. Se ajusto el pH a 7.4, se aforo a 2 l. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121 °C 15lb de presión/15 min. Se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

### Gel de agarosa al 1.5%

Pesar 0.6 g de Agarosa y disolver en 40 ml de Buffer TBE 1X. Posteriormente fundir la agarosa y finalmente colocar en el molde.

### Jugo Azul

Azul de bromofenol 0.25%

Xilencianol 0.25%

Glicerol 30%

### Medio de cultivo DMEM/F12

Se pesaron 15.62 g de medio de cultivo en polvo DMEM/F12 1:1 (Sigma) y 1.2 g de bicarbonato de sodio grado cultivo celular (SIGMA), se disolvieron en 800 ml de agua Milli Q y se ajustó el pH a 7.35, se añadió 1ml de una solución a 50 mg/ml de gentamicina (GIBCO), posteriormente se aforó a 1 litro y se esterilizó por filtración utilizando membranas de 0.22  $\mu$ m, se suplementó con 10% de suero fetal de bovino descomplementado y 25 mM de glucosa y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

### Medio PEHPS para cultivo de *Entamoeba histolytica*

Se pesaron los siguientes componentes:

| Reactivo                            | gramos/l |
|-------------------------------------|----------|
| Peptona de caseína                  | 10       |
| Acido Ascórbico                     | 0.20     |
| Cisterna                            | 1.0      |
| Glucosa                             | 6.0      |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>     | 1.0      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>     | 0.6      |
| Extracto de hígado y páncreas (EHP) | 250 ml   |

**Tabla No. 7 .** Composición del medio PEHPS.

Se disolvieron todos los componentes en 650ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10N, y se aforó el volumen a 1000 ml con agua desionizada, se guardó en alícuotas de 5ml en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca y se esterilizó en autoclave por 20 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se cerraron y almacenaron los tubos a temperatura ambiente, antes de usar se agregaron 0.5 ml de suero bovino.

### **Mezcla de medio DMEM/F12-EHP**

Para la mezcla DMEM/F12-EHP se mezclaron en condiciones de esterilidad 760 ml de medio DMEM/F12 y 240 ml de extracto de hígado y páncreas (EHP) y se suplementaron con 10% de suero fetal bovino.

### **Extracto de hígado y páncreas (EHP)**

Fue proporcionado por el laboratorio del Dr. Javier Vargas Villarreal y fue preparado como mencionan Said y col., 1988.

### **Reactivo de Schiff**

Fuscina Básica 1 g, diluirlo en 200 ml de agua destilada y llevarlo a punto de ebullición.

Dejarlo enfriar y agregar 2 g de metabisulfito de Potasio y 10 ml de HCl 1N. Dejarlo aclarar durante 24 h y después agregar 0.5 g de carbón activado. Agitar durante 1 min y filtrar en varias ocasiones. Al terminar almacenar en refrigeración.

### **Soluciones empleadas en Kit de ELISA**

#### 1.- Buffer de lavado.

- a) Inspeccionar que el buffer de lavado concentrado que todos sus componentes estén en solución. Si hay presencia de precipitado visible, agitar el recipiente hasta disolver cualquier precipitado. Diluir 50 ml del buffer de lavado concentrado en agua destilada o de-ionizada (dH<sub>2</sub>O) a un volumen final de 500 ml. Transferir al bote de lavado. Mantener a temperatura ambiente.

#### 2.- Buffer de ensayo.

Diluir 0.6 ml de 10% de BSA en un volumen de 30 ml de buffer de ensayo stock. Mantener a temperatura ambiente.

#### 3.- Buffer de dilución de la muestra.

Para las muestras de sobrenadantes de cultivo celular, prepararlas en buffer de dilución de muestra 1:

Diluir 2 mL de BSA 10% en un volumen de 20 ml de Buffer de dilución de muestra stock. Guardar en hielo.

#### 4.- Generar un coctel de Estándar de Antígeno

- A. Justo antes de su uso, descongelar los estándares de antígeno en hielo por 20 minutos. Mezclar muy bien y dar un vórtex suavemente.
- B. En un tubo individual, preparar un coctel de estándar de antígeno que contenga los 12 estándares de antígeno pipeteando 10  $\mu$ l de cada estándar de antígeno dentro de un volumen de 880  $\mu$ l del Buffer de dilución de la muestra, para obtener 1 ml de concentrado del coctel de estándar de antígeno.
- C. Por último diluir 200  $\mu$ l del concentrado del coctel de estándar de antígeno en 800  $\mu$ l del Buffer de dilución de la muestra para obtener el coctel de estándar de antígeno final.

#### 5- Preparación de dilución de anticuerpos:

- A. Para descongelar poner los anticuerpos para la detección en hielo por 30 minutos.
- B. Agregar 855  $\mu$ l del buffer de ensayo a cada tubo de detección de anticuerpo.
- C. Mezclar bien pero suavemente.
- D. Transferir cada anticuerpo de detección a su tubo correspondiente de detección.
- E. Enseguida agregar los anticuerpos de detección contenidos en los tubos en un orden de izquierda a derecha. Confirmar el orden.

#### 6.- Preparar Avidin-HRP 1X:

- A. Justo antes de su uso, descongelar el conjugado Avidin-HRP en hielo por 20 minutos.
- B. Mezclar suavemente.
- C. Agregar 11  $\mu$ l del conjugado Avidin-HRP a 11 ml de Buffer de ensayo 1X

#### **TBE 10X (Tris 0.89M, Ac. Bórico 0.89 M, EDTA 20mM)**

Disolver 108 g de Tris, 55g de ácido bórico y 7.4 g de EDTA (Na<sub>2</sub>) en 800 ml de agua destilada ultrapura. Si es necesario ajustar el pH a 8.2 con HCl. Ajustar el volumen a 1l con agua MilliQ. Esterilizar en autoclave.