



**Universidad Nacional Autónoma de México**

---

---

**Facultad de Química**

MECANISMOS MOLECULARES DE  
PATOGENICIDAD DE  
*Entamoeba histolytica*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMÁCEUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

FABIOLA SANTOS RAMOS



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**                   **PROFESOR:** GUTIÉRREZ RAMOS ABEL  
**VOCAL:**                           **PROFESOR:** MONTIEL AGUIRRE JESÚS FERNANDO  
**SECRETARIO:**               **PROFESOR:** OLIVOS GARCÍA ALFONSO  
**1ER. SUPLENTE:**           **PROFESOR:** LARA NÚÑEZ AURORA  
**2DO. SUPLENTE:**           **PROFESOR:** CORDERO HERNÁNDEZ JOSÉ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL, FACULTAD DE MEDICINA UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:**       DR. ALFONSO OLIVOS GARCÍA

---

**(NOMBRE Y FIRMA)**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**   BIÓLOGO. MARIO NEQUIZ AVENDAÑO

---

**(NOMBRE Y FIRMA)**

**SUSTENTANTE:**       FABIOLA SANTOS RAMOS

---

**(NOMBRE Y FIRMA)**

## DEDICATORIA

*A mis padres, Rosa y José. Por ser los mejores padres para mí, esas personas especiales que siempre me proporcionan el apoyo para realizar mis metas, quienes me enseñaron los valores y principios para ser la persona que ahora soy. Gracias por brindarme su amor y confianza en todo lo que hago.*

*A mi hermano Tono. Porque siempre ha sido y seguirá siendo el mejor ejemplo a seguir. Por sus cuidados y consejos que me han ayudado tanto, así como las situaciones tan divertidas que hemos vivido, pues persona más ocurrente no puede existir. Te amo!!*

*A mi mejor amigo y compañero Aldair. Porque siempre ha estado a mi lado dándome cariño, fortaleza y consejos para tomar las mejores decisiones. Por enseñarme tantas cosas y compartir otras más que han hecho de la prepa y la universidad momentos inolvidables. Te quieroooo!!*

*A mis “hermananos”, Abril, Monse, Serch y Sofio. Por todos los momentos únicos y especiales que hemos vivido juntos. Cada uno me ha enseñado cosas diferentes que siempre me han ayudado en la vida. Los quiero!!*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al Dr. Alfonso Olivos. Por haberme aceptado en su grupo de trabajo y brindarme las herramientas necesarias y su tiempo para la realización de esta tesis. Además, por ayudarme en mi desarrollo académico y personal.*

*Al Bio. Mario Nequiz. Por su asesoramiento en los experimentos y enseñarme los “trucos” para la realización de éstos. Gracias por contagiarme de su buen humor y hacer de mi estancia en el laboratorio momentos inolvidables. Persona más divertida no puede haber.*

*Al Téc. Marco Gudiño. Por su ayuda en el procesamiento de imágenes y sus conocimientos que me comparte día a día sobre diversos programas. Así como las pláticas que siempre tenemos sobre situaciones diferentes. Por hacerme reír en todo momento y confiar en mí.*

*A la Médico Kahory Hernández. Por ser esa persona atenta y amable conmigo, su apoyo incondicional es algo que valoro mucho y como olvidar todos sus casos de medicina que me cuenta, eres muy especial. A la alumna de Medicina Andrea, por ser extremadamente honesta algo que nos ocasiona tanta risa. Por enseñarme que todo se puede hacer cuando uno se organiza y por esas ganas de saber más cuestionando todo. Kahooo y Andrea!, mejores compañeras de trabajo no puede haber.*

*Al encargado del bioterio Sr. Ricardo Vargas. Por su excelente disposición para proporcionarnos animales.*

*Al Sr. Pedro Balderas por su apoyo en el procesamiento histológico.*

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	10
1.1. <i>Amibiasis</i>	10
1.2. <i>Agente Etiológico y Ciclo Biológico</i>	11
1.3. <i>Patogenicidad y Virulencia</i>	13
1.4. <i>Estrés Oxidante</i>	16
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	23
<b>3. HIPÓTESIS</b>	24
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	25
<b>5. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	25
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	26
6.1. <i>Cultivo de Eh vir</i>	26
6.2. <i>Cultivo de Eh no vir</i>	26
6.3. <i>Cultivo de E. dispar</i>	27
6.4. <i>Sobrevida amibiana en el hígado de hámster</i>	27
6.5. <i>Susceptibilidad amibiana a oxígeno</i>	27
6.6. <i>Susceptibilidad amibiana a oxígeno fisiológico</i>	28
6.7. <i>Susceptibilidad amibiana a peróxido de hidrógeno</i>	28
6.8. <i>Obtención de lisados amibianos</i>	29
6.9. <i>Actividad formadora y detoxificante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	29
6.10. <i>Efecto de PEG-catalasa en la resistencia amibiana a oxígeno</i>	31
6.11. <i>Determinación de la expresión de Eh29 y Eh34</i>	31
6.12. <i>Consumo de oxígeno</i>	34
<b>7. RESULTADOS</b>	35

<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>47</b>
<b>9. CONCLUSIÓN</b>	<b>52</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>57</b>
<b>APÉNDICE</b>	<b>53</b>
<b>A. Preparación de reactivos</b>	<b>53</b>
<b>B. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford</b>	<b>55</b>

## ABREVIATURAS

<b>Ack</b>	Acetato cinasa
<b>AHAH</b>	Absceso Hepático Amibiano Experimental en Hámster
<b>APS</b>	Persulfato de amonio
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CPs</b>	Proteasas de cisteína
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b><i>E. dispar</i></b>	<i>Entamoeba dispar</i>
<b>Eh 29</b>	Peroxiredoxina
<b>Eh34</b>	NADPH: flavín-oxidoreductasa
<b>EhADH2</b>	Aldehído-alcohol deshidrogenasa
<b>EhPTN</b>	Piridina Nucleótido Transhidrogenasa
<b>Eh Trx</b>	Tioredoxina
<b>EhTrxR</b>	Tioredoxina reductasa
<b>Eh vir</b>	<i>Entamoeba histolytica</i> virulenta
<b>Eh no vir</b>	<i>Entamoeba histolytica</i> no virulenta
<b>Fd</b>	Ferredoxina
<b>FDP</b>	Proteína “Flavodiiron”
<b>FDPR</b>	Proteína “Flavodiiron” reductasa
<b>Fe-SOD</b>	Fe-Superóxido Dismutasa
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HCPs</b>	Proteínas “hybrid-cluster”
<b>Isf</b>	Flavoproteínas “iron-sulfur”
<b>KSCN</b>	Tiocianato de potasio
<b>NaCl</b>	Cloruro de Sodio



<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub></b>	Sulfito de sodio
<b>((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>))<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	Sulfato ferroso de amonio
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>Ox</b>	Oxidado
<b>PAS</b>	Tinción de ácido periódico (Schiff)
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>PEG- catalasa</b>	Polietilenglicol-catalasa
<b>PFOR</b>	Piruvato: ferredoxin Oxido-reductasa
<b>PMNs</b>	Polimorfonucleares
<b>Rbr</b>	Rubreritina
<b>Red</b>	Reducido
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>TBST</b>	Buffer Tris salino-Tween 20
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>Trans-PMET</b>	Transporte transmembranal de electrones
<b>TPQ-7</b>	Termoplasmaquinona-7

## RESUMEN

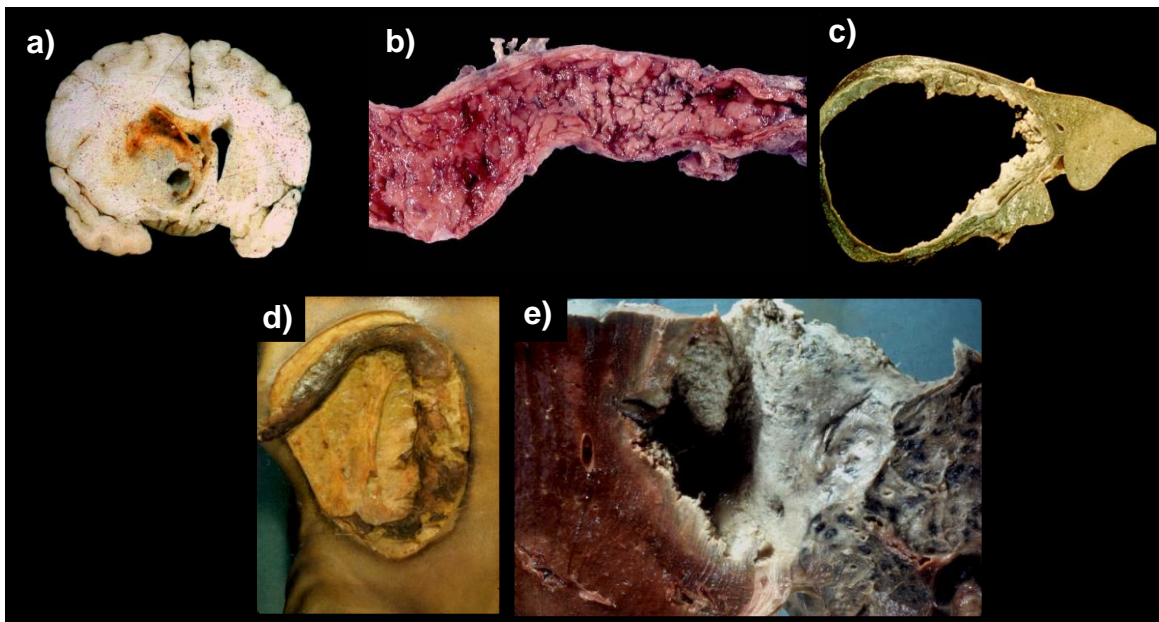
*Entamoeba histolytica* es el parásito responsable de la amibiasis en humanos. Esta enfermedad es frecuente en países subdesarrollados y causa aproximadamente cien mil muertes por año en el mundo. De todas las especies de amibas que colonizan el intestino del humano, sólo *E. histolytica* es capaz de invadir y causar daño en tejidos. Se conocen moléculas que le permiten a este parásito invadir y sobrevivir en tejidos, que han sido identificados y propuestos como factores de virulencia. Sin embargo, a pesar del hecho de que durante las primeras etapas de la invasión a tejidos, *E. histolytica* tiene que enfrentarse a concentraciones tóxicas de oxígeno, se ha prestado poca atención a los mecanismos moleculares de resistencia a oxígeno y su relación con su patogenicidad y/o virulencia. En este trabajo se comparó la capacidad de *E. histolytica* virulenta, *E. histolytica* no virulenta y *E. dispar* para reducir el oxígeno y sobrevivir en hipoxia o bien a oxígeno fisiológico. Además, se analizó el efecto de ésta en la vía de reducción de oxígeno. Nuestros resultados muestran que la capacidad disminuida de detoxificación de oxígeno se correlaciona con la incapacidad de *E. dispar* para sobrevivir en los tejidos. Por otra parte, en lugar del oxígeno, la reducción de  $H_2O_2$  endógeno, generado durante la hipoxia se encuentra relacionado con *E. histolytica* no virulenta. Llegamos a la conclusión de que el mantenimiento de la hipoxia intracelular y probablemente el sistema de reparación de proteínas amibianas oxidadas son requisitos para su patogenicidad y virulencia.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Amibiasis

La amibiasis en humanos es una enfermedad intestinal causada por el parásito *Entamoeba histolytica*. Esta enfermedad afecta al 10% de la población mundial, es frecuente en países subdesarrollados y es responsable de aproximadamente cien mil muertes por año en el mundo (WHO, 1997).

Cuando el parásito invade el intestino grueso del ser humano, se puede comportar como un comensal inofensivo o bien invadir la mucosa intestinal y causar destrucción tisular, siendo la colitis amibiana ulcerativa la más frecuente de estas alteraciones. Además, con menor frecuencia el parásito también puede invadir el hígado, los pulmones, el cerebro y la piel (Brandt and Tamayo, 1970) (**Imagen 1**).



**Imagen 1. Amibiasis invasiva en diferentes tejidos del ser humano. a) cerebro. b) intestino. c) hígado. d) piel. e) pulmón**

La amibiasis intestinal puede presentarse en dos formas clínicas: síndrome diarreico y disentería. El síndrome diarreico se caracteriza por dolor cólico moderado y ausencia de tenesmo, diarrea escasa con poca materia fecal y abundante material líquido o mucoide hemorrágico. Mientras que la disentería se inicia con mayor número de evacuaciones mucosanguíneas, acompañadas de tenesmo y dolor tipo cólico.

Por otra parte la colitis amibiana ulcerativa se presenta con 20 o más evacuaciones diarias compuestas casi en su totalidad por sangre, con intenso dolor abdominal y tenesmo agudo. Además el paciente presenta fiebre, deshidratación e hipotensión. El amiboma, otra forma de amibiasis intestinal, se caracteriza por una masa seudotumoral que puede producir obstrucción parcial del colón, disentería y dolor abdominal.

En cuanto a las manifestaciones extraintestinales tenemos el absceso hepático amibiano en donde los pacientes presentan fiebre elevada y persistente, calosfríos, sudación nocturna, náusea, diarrea y se puede observar hepatomegalia.

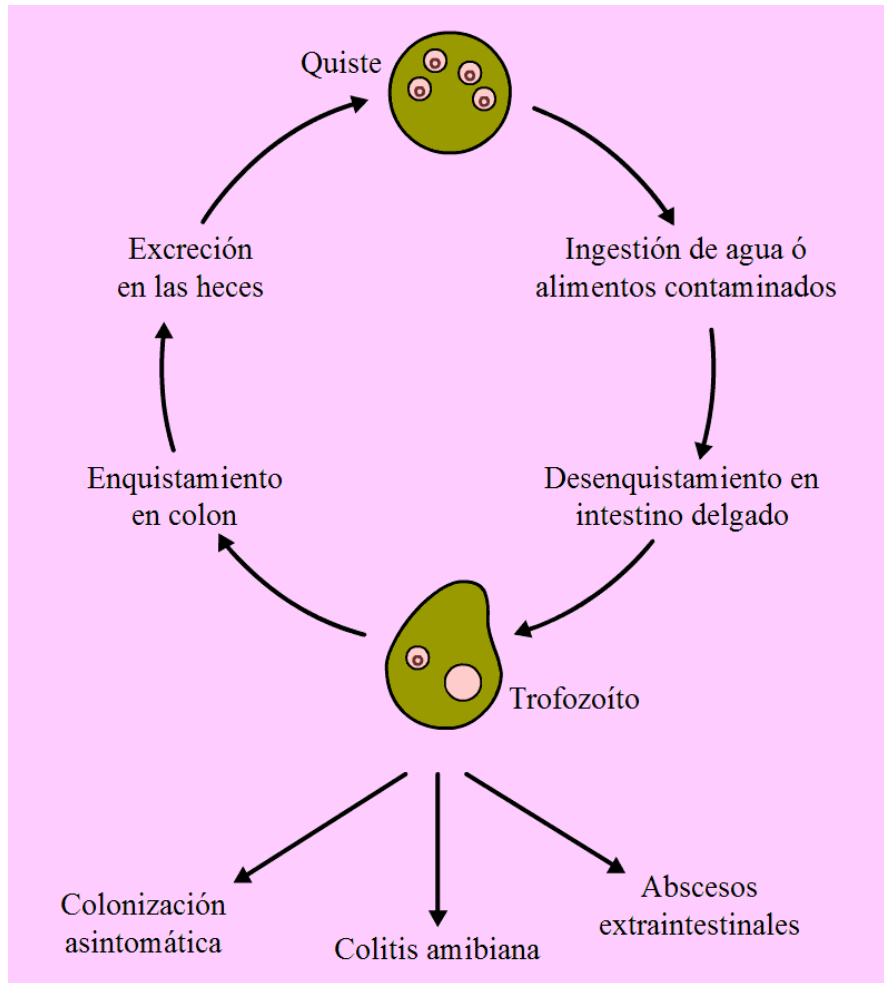
### *1.2 Agente Etiológico y Ciclo Biológico*

*E. histolytica* es un protozoario unicelular de la clase *Rhizopoda* o *Sarcodina*, clasificada de esta forma de acuerdo a su movilidad por pseudópodos y corresponde al género *Entamoeba*. Su forma de reproducción es por división binaria (reproducción asexual).

El ciclo biológico de *E. histolytica* es relativamente simple (**Imagen 2**), la infección es adquirida cuando se ingieren alimentos o agua contaminados por la forma infectante (quistes), estos son esféricos y miden 10-15  $\mu\text{m}$ . Presentan, según su grado de madurez, 1- 4 núcleos con endosoma central y cromatina periférica fina distribuida regularmente, cuerpos cromatoidales de bordes curvos, una masa de glucógeno y son resistentes al pH ácido del estómago.

Cuando los quistes llegan al intestino delgado se lleva a cabo el proceso de desenquistamiento, es decir a partir de un quiste tetra nucleado se forman ocho trofozoítos (forma invasora). Los trofozoítos tienen un diámetro de 10 - 60  $\mu\text{m}$ , forma alargada, un núcleo con las mismas características que el quiste. Presentan movilidad mediante la emisión de pseudópodos digitiformes (lobópodos). Los trofozoitos crecen y proliferan en el intestino grueso, en algunas ocasiones pueden permanecer como comensales inofensivos y por mecanismos desconocidos adoptar nuevamente la forma de quiste para ser eliminados por las heces.

Algunas ocasiones los trofozoítos pueden no enquistarse en pacientes con disentería activa; a menudo se observan trofozoítos hematófagos móviles en las heces frescas, pero éstos mueren con rapidez debido a que no resisten las condiciones ambientales. Por otro lado, los trofozoítos pueden colonizar la mucosa intestinal, o bien por medio de la circulación sistémica invadir cualquier órgano.



**Imagen 2. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*.**

### 1.3 Patogenicidad y Virulencia

Los organismos que se benefician del hospedero para su desarrollo sin causar daño, se denominan comensales. Sin embargo, en ciertas condiciones estos pueden llegar a ser patógenos. La patogenicidad se define como la capacidad de un parásito para producir enfermedad en un hospedero específico bajo ciertas condiciones.

Diversas amibas como *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Iodameba bütschlii*, *Dientamoeba fragilis* son capaces de colonizar el intestino grueso del ser humano sin embargo sólo *E. histolytica* es capaz de invadir y causar destrucción tisular.

En 1925 la amiba no patógena llamada *Entamoeba dispar* fue descrita por el parasitólogo francés Emile Brumpt. Esta amiba es muy similar a *E. histolytica* y sólo con técnicas de biología molecular es posible diferenciarlas (Willhoeft et al., 2002).

Por otro lado, la virulencia es el grado de expresión de la patogenicidad. Los microorganismos patógenos expresan factores de virulencia, que son las moléculas implicadas en el establecimiento de la patología y generalmente éstas participan en los procesos de adhesión, colonización, invasión de tejidos y en la evasión o inhibición de la respuesta inmune del hospedero.

La respuesta rápida de adaptación a los cambios físicos del microambiente de los tejidos y la evasión de los mecanismos de defensa del hospedero, son esenciales para la supervivencia del parásito. Para estos procesos *E. histolytica* requiere de diversas moléculas denominadas factores de virulencia como: lectinas, proteasas de cisteína, amiboporos y fosfolipasas.

- Lectinas: son proteínas de superficie que reconocen carbohidratos en la membrana de células blanco. En *E. histolytica* se encuentra abundantemente una lectina específica que reconoce galactosa y N-acetil galactosamina (Petri et al., 1987). Esta molécula es esencial para la

fagocitosis y adherencia a la superficie de la mucosa intestinal. Además, debido a su similitud con la proteína de superficie CD59 de las células sanguíneas humanas, que evita el ensamble del complemento, participa en la evasión de la lisis por complemento (Braga et al., 1992).

- Amiboporo: es una familia de péptidos no enzimáticos (A, B y C) de ~18 kDa que producen poros en la membrana de células blanco. Éstos presentan similitud estructural con el polipéptido NK lisina de linfocitos T citotóxicos y con la melitina (Leippe et al., 1994).
- Proteasas de cisteína (CPs): son enzimas proteolíticas con cisteína en su centro catalítico. *E. histolytica* contiene en su genoma más de 60 diferentes genes de CPs, sin embargo, sólo algunas son expresadas de forma constitutiva o por diversos estímulos. Las CPs son capaces de degradar *in vitro* algunos componentes de la matriz extracelular (Montfort et al., 1993). Por otra parte, contrario a la destrucción tisular del hospedero, se ha demostrado que son esenciales para la supervivencia del parásito en los tejidos.
- Fosfolipasas: son enzimas encargadas de romper los enlaces de la estructura de los fosfolípidos en sitios específicos. En *E. histolytica* se han descrito dos fosfolipasas que están involucradas en el daño celular por contacto. Una de éstas es dependiente de calcio y su funcionalidad



depende de un pH alcalino. La otra es independiente de calcio y su pH óptimo es ácido (Long-Krug et al., 1985).

Diversas funciones amebianas tales como fagocitosis, actividad proteolítica, citotoxicidad, resistencia a complemento y proliferación han sido relacionadas con la virulencia de *E. histolytica* (Espinosa-Cantellano and Martinez-Palomo, 2000). Además, recientemente se ha observado una correlación directa entre la resistencia amebiana a oxígeno con su virulencia (capacidad de formar lesiones en hígado de hámster (Ramos-Martinez et al., 2009).

#### *1.4 Estrés Oxidante*

*E. histolytica* es un microorganismo micro-anaeróbico que tolera concentraciones bajas de oxígeno (menor al 5%) (Band and Cirrito, 1979). Este parásito vive y se multiplica en el intestino grueso del ser humano, lugar en el que se encuentran bajos niveles de oxígeno (0.1-2.3 %) (Ladas et al., 2007), sin embargo cuando *E. histolytica* invade los tejidos es capaz de soportar, al menos temporalmente, sus concentraciones tóxicas de oxígeno (mayores al 5%).

Uno de los principales obstáculos en el estudio de la amebiasis experimental ha sido la falta de un modelo animal que reproduzca la enfermedad intestinal que se observa en humanos. Sin embargo, el modelo del absceso hepático amebiano experimental en hámsters (AHAH), que es causado por la inyección intraportal de *E. histolytica* virulenta, es el más utilizado para estudiar los mecanismos de patogenicidad y virulencia del parásito debido a la similitud de lo que ocurre en

humanos. En los estadios iniciales del AHAH, los trofozoítos son rodeados por células inflamatorias (PMNs), las cuales liberan enzimas lisosomales y generan un aumento temporal en el consumo de oxígeno conocido como estallido oxidativo, cuya consecuencia es la generación de especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés ROS) tales como: superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), principalmente. Dicha inflamación causa isquemia y posteriormente necrosis tisular, lo cual genera un ambiente de hipoxia que es favorable para el crecimiento y proliferación de *E. histolytica*, y al mismo tiempo reduce la exposición a las moléculas antimicrobianas que el hospedero genera, (ROS, NO, anticuerpos y complemento). La incapacidad de *E. histolytica* para sobrevivir en el hígado de hámster en ausencia de células inflamatorias apoya esta propuesta (Olivos-Garcia et al., 2004). Por lo anterior, sólo durante las etapas iniciales de invasión tisular la alta resistencia antimicrobiana a oxígeno, NO, complemento y ROS debiera ser un requisito indispensable para su patogenicidad y/o virulencia.

Al igual que todos los microorganismos anaeróbicos o micro-anaeróbicos los centros Fe-S de algunas enzimas metabólicas de *E. histolytica* están expuestos al solvente y son funcionales en potenciales redox extremadamente bajos (~-300mV)(Outten and Theil, 2009). Por un lado, esto les confiere alta eficiencia catalítica, pero por otro, los hace vulnerables a la oxidación por oxígeno, ROS, y NO. Por tal motivo estos microorganismos evitan dicha oxidación a través de un sistema enzimático de reducción de oxígeno que mantiene una hipoxia intracelular en niveles aceptables para el apropiado funcionamiento metabólico. Cuando las

concentraciones de oxígeno y/o ROS rebasan la capacidad enzimática antioxidante se genera una falla metabólica que puede dar lugar a la muerte, sólo si ésta es prolongada.

Con respecto al sistema ambiental detoxificante de oxígeno se sabe que *E. histolytica* expresa: NADPH: flavín oxido-reductasa (Eh34) (Lo and Reeves, 1980), superóxido dismutasa (FeSOD) (Tannich et al., 1991), proteína “flavodiiron” (FDP) (Vicente et al., 2012) y peroxiredoxina (Eh29) (Bruchhaus et al., 1997)

- NADPH: flavín oxido-reductasa (Eh34): enzima de 34 kDa encargada de la reducción de oxígeno para formar peróxido de hidrógeno. Esta enzima utiliza como donador principal de electrones NADPH, el cual deriva de una transhidrogenación de NADH que es generado en la glucólisis.
- Peroxiredoxina (Eh29): enzima de 29 kDa que a través de una reducción divalente reduce el peróxido de hidrógeno a H<sub>2</sub>O. La regeneración de la actividad de Eh29 la lleva a cabo la tioredoxina y la enzima Eh34.
- Proteína flavodiiron (FDP): pertenece a una amplia familia de enzimas detoxificantes que pueden actuar como oxido reductasa y/o oxido nítrico reductasa. En el genoma de *E. histolytica* se encuentran cuatro diferentes genes de FDPs, una de éstas es una NADH oxido reductasa que transforma el oxígeno en agua mediante una reducción tetravalente.

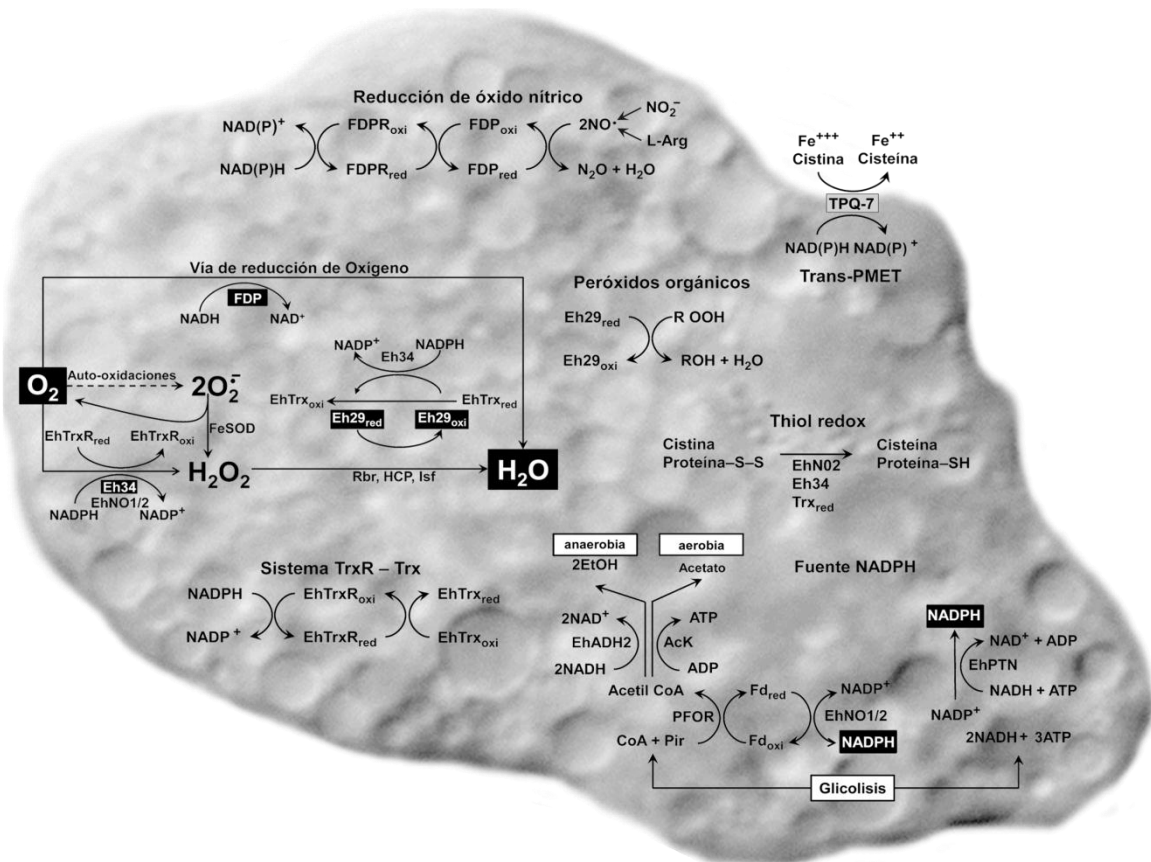
- Superóxido dismutasa (FeSOD): enzima que transforma el superóxido endógeno formado por auto-oxidaciones. Por cada dos moléculas de superóxido una la transforma en peróxido de hidrógeno y la otra la regresa a oxígeno.

Por otra parte, se han estudiado otras enzimas que podrían contribuir en la reducción de oxígeno sin embargo, su participación en la vía de detoxificación de oxígeno de *E. histolytica* no ha sido determinada.

- EhNO1 y EhNO2 (EhNO1/2): son oxido-reductasas dependientes de NADPH, se encuentran involucradas en el mantenimiento del potencial redox a través de la reducción de L-cistina y de Fe<sup>+++</sup>. (Jeelani et al., 2010). Además, al igual que Eh34 estas enzimas podrían estar involucradas en la reducción divalente del oxígeno.
- Proteínas “hybrid-cluster” (HCPs): son capaces de reducir el peróxido de hidrógeno en agua. El análisis de las secuencias genómicas de bacterias anaeróbicas reductoras de sulfato, sugiere que algunos genes HCPs se encuentran presentes en una gran variedad de organismos que pertenecen a los dominios Bacteria, Archaea y Eukarya. (Almeida et al., 2006; Andersson et al., 2006). Por otro lado, en *Escherichia coli* los genes de HCP se sobre expresan con la exposición a peróxido de hidrógeno mientras que éstos no cambian en *E. histolytica*. (Vicente et al., 2009). La función

fisiológica precisa de estas proteínas en *E. histolytica* no ha sido determinada.

- Flavoproteínas “iron-sulfur” (Isf): son oxido-reductasas ampliamente distribuidas en procariontes anaeróbicos estrictos. Los genes de Isf de *E. histolytica* se encuentran sobre expresados durante el estrés oxidante y nitrosante (Vicente et al., 2009).
- Rubreritina (Rbr): enzima similar a Eh29 encargada de reducir el peróxido de hidrógeno a agua. Se localiza en mitosomas y se ha propuesto que su principal función podría ser la de protección de los centros Fe-S que se sintetizan en este compartimento.



**Imagen 3. Vías antioxidantes en *E. histolytica*.** Este parásito se protege del oxígeno y ROS a través de la vía de reducción de oxígeno, asistida por la contribución de otros sistemas. El NADH generado en la glucolisis es transhidrogenado para producir NADPH, el cual es usado como donador de electrones para la reducción de oxígeno. Eh34 y EhNO1/2 generan  $H_2O_2$  a través de la reducción divalente del  $O_2$ . El  $H_2O_2$  es reducido a  $H_2O$  por Eh 29 la cual se mantiene reducida por Eh34 o Trx, Trx oxidada es reducida por TrxR a expensas de la oxidación de NADPH. El  $O_2^-$  generado por auto-oxidaciones es incorporado a esta vía como  $H_2O_2$  por FeSOD. También se encuentran otras enzimas como Isf, FDP, Rbr y HCP con actividad antioxidante en el genoma de *E. histolytica*, sin embargo su función aún no está determinada. Eh29 participa en otras funciones; en la detoxificación de peróxido orgánico y junto con EhNO y Trx mantiene el estado redox intracelular (cistina/ cisteína). También este parásito disminuye el potencial redox del lado externo de la

membrana plasmática a través de Trans-PMET. Por otro lado FDP reduce el oxígeno en agua utilizando NADH.

Abreviaciones: Flavoproteína “iron-sulfur” (**Isf**). Proteína flavo diiron (**FDP**). Proteína “flavodiiron” reductasa (**FDPR**). Rubreritina (**Rbr**). Proteína “hybrid-cluster” (**HCP**). NADPH: Flavín oxido-reductasa (**Eh34**). Peroxiredoxina (**Eh29**). Oxido-reductasa NADPH-dependiente (**EhNO1/2**). Fe-superóxido dismutasa (**FeSOD**). Transporte transmembranal de electrones (**Trans-PMET**). Termoplasmaquinona-7 (**TPQ-7**). Tioredoxina (**EhTrx**). Tioredoxina reductasa (**EhTrxR**). Ferredoxina (**Fd**). Piruvato: Ferredoxin oxido-reductasa (**PFOR**). Piridina nucleótido transhidrogenasa (**EhPTN**). Aldehído-alcohol deshidrogenasa (**EhADH2**). Acetato cinasa (**Ack**). Reducido (**Red**). Oxidado (**Ox**).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la virulencia de *E. histolytica* no puede explicarse completamente por la actividad de sus moléculas citotóxicas (adhesinas, fosfolipasas y amiboporos) o proteolíticas (proteasas de cisteína), se decidió estudiar los mecanismos de patogenicidad y/o virulencia de *E. histolytica* mediante la comparación funcional y molecular entre *E. histolytica* virulenta (**Eh vir**, por causar lesiones en hígado de hámster), *E. histolytica* no virulenta (**Eh no vir**, por su incapacidad de causar lesiones en hígado de hámster debido al cultivo prolongado) y *E. dispar* (amiba no patógena). Se sabe que a pesar de que Eh vir y Eh no vir son de la cepa HM-1: IMSS y realizan de igual forma algunas funciones *in vitro* asociadas con su virulencia (eritrofagocitosis, resistencia a complemento, actividad citotóxica y proteolítica), sólo *E. histolytica* no virulenta es eliminada del hígado de hámster en menos de 24 h (Olivos et al., 2005). Lo anterior sugiere que el oxígeno y moléculas derivadas del sistema inmune innato como complemento y ROS pueden ser los responsables de dicha eliminación. En el presente trabajo mediante un estudio comparativo entre Eh vir, Eh no vir y *E. dispar* se determina si la resistencia amibiana a oxígeno está relacionada con su patogenicidad y/o virulencia. El esclarecimiento de los mecanismos de patogenicidad y virulencia de *E. histolytica* es necesario no sólo para la mejor comprensión de la enfermedad, sino también para el diseño racional de mejores medidas terapéuticas. Esto último sería un elemento importante para el control y eventual erradicación de la amibiasis endémica en México y otros países con este problema de salud pública, que no existe en los países desarrollados.



### **3. HIPÓTESIS**

La resistencia amibiana a oxígeno está determinada por su capacidad de generar hipoxia intracelular y a su vez ésta se encuentra relacionada con la virulencia y patogenicidad de *E. histolytica*.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la actividad de la vía reductora de oxígeno de *Entamoeba histolytica* se encuentra relacionada con su virulencia y/o su patogenicidad.

#### **5. OBJETIVOS PARTICULARES**

En Eh vir, Eh no vir y *E. dispar*:

- Determinar su tiempo de sobrevivencia en el hígado de hámster.
- Evaluar su susceptibilidad a oxígeno y peróxido de hidrógeno.
- Determinar su resistencia a concentraciones fisiológicas de oxígeno.
- Determinar su expresión y actividad de las principales enzimas que reducen el oxígeno y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Evaluar el efecto de la enzima PEG-catalasa sobre su resistencia a oxígeno.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cultivo de *Eh vir*

Tres hámsters de la cepa sirio dorado se anestesiaron con pentobarbital sódico y se les inyectó en la vena porta  $1 \times 10^6$  trofozoítos de amibas (cepa HM-1:IMSS) resuspendidos en 200 $\mu$ L de solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Para evitar la hemorragia se puso un fragmento de gelfoam en el sitio de la inyección. La herida fue suturada en dos planos con hilo de seda. Después de haber realizado la cirugía se dejaron 7 días con agua y alimento *ad libitum*. Pasados estos días el hígado con abscesos se extirpó, se cortó en trozos pequeños y se introdujeron en tubos con medio TYI-S-33. A estos tubos se les adicionaron 3 gotas de una mezcla de antibióticos (bencilpenicilina, estreptomocina y ceftriaxona), se cerraron y se incubaron a 36.5°C. Enseguida, las amibas sin bacterias ( $1 \times 10^6/50$ ml medio TYI-S-33) fueron colocadas en cajas (Corning cat. 3056) y expandidas sin antibióticos para su uso posterior.

### 6.2 Cultivo de *Eh no vir*

*Eh no vir* corresponde a la misma cepa HM-1:IMSS, con la diferencia de que ha perdido la capacidad de formar lesiones en hígado de hámster, debido al cultivo prolongado (más de 8 años). Para obtener un crecimiento adecuado las amibas se cultivaron de forma similar a la *Eh vir*.

### 6.3 Cultivo de *E. dispar*

El medio de cultivo que se emplea para el crecimiento de *E. dispar* es el LYI-S-2. Dos millones de amibas se resuspendieron en 50 mL medio LYI-S-2 y se incubaron a 36.5°C por 72 h.

### 6.4 Sobrevida amibiana en el hígado de hámster

Un millón de trofozoítos de *Eh vir*, *Eh no vir* y *E. dispar* (cada uno por duplicado), se resuspendieron en 200 µL de PBS y se inyectaron en hígados de hámsters como arriba se menciona. Los hámsters fueron sacrificados después de 1 y 24 h de la inyección de las amibas y los hígados se fijaron con formol al 15% en PBS. Después de un procesamiento histológico convencional (alcohol-xileno-parafina) los cortes de hígado se tiñeron con PAS.

### 6.5 Susceptibilidad amibiana a oxígeno

Se incubaron  $1 \times 10^6$  de amibas *Eh vir*, *Eh no vir* y *E. dispar* en 1.2 mL de PBS saturado con O<sub>2</sub> (burbujeado con O<sub>2</sub> durante 15 min) durante 1 h a 36.5°C en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Finalizado el tiempo de incubación se determinó la viabilidad con azul de Tripano (SIGMA-ALDRICH, cat. T-0887) en una cámara de Neubauer. Enseguida, para evaluar el efecto amibicida de 1 h de hiperoxia, se resuspendieron  $1 \times 10^6$  de las amibas sobrevivientes en 1.5 mL de su medio de cultivo (TYI-S-33 ó LYI-S-2) y se incubaron durante 24 h. Al término de este tiempo se evaluó la viabilidad como arriba se menciona.

### 6.6 Susceptibilidad amibiana a oxígeno fisiológico

Con el fin de inducir leucopenia en hámsters, se irradiaron veinte hámsters con 1400 Rads (radiación gamma) como lo describe Olivos-Garcia et al. (2004). Después de 48 h en que se observó una leucopenia casi total, a los animales les fueron colocadas, en la cavidad peritoneal, unas cámaras de plástico (diseñadas en nuestro laboratorio) (**Figura 7**) que contenían  $1 \times 10^6$  trofozoítos de amibas Eh vir, Eh no vir y *E. dispar* resuspendidas en 0.5 mL de PBS. Después de 6 h las cámaras se retiraron, se enfriaron con hielo y a las amibas se les determinó la viabilidad con azul de Tripano.

### 6.7 Susceptibilidad amibiana a peróxido de hidrógeno

Se resuspendieron  $0.5 \times 10^6$  trofozoítos de Eh vir y Eh no vir ó  $0.5 \times 10^6$  y  $0.85 \times 10^6$  de *E. dispar* en 1mL de su medio de cultivo (TYI-S-33 ó LYI-S-2) y por duplicado se colocaron en dos placas de cultivo de 24 pozos. A muestras paralelas se les adicionó 0.5, 1, 5 y 10 mM de  $H_2O_2$  (30% Merck). Con el fin de evitar el efecto amibicida del oxígeno ambiental, las placas se introdujeron en una cámara de anaerobiosis (Billups-Rothenberg. Inc) y se purgó con 100% de nitrógeno durante 10 minutos. Enseguida las placas fueron incubadas durante 1 h a  $36.5^\circ C$ . Concluido este tiempo, a todas las amibas contenidas en una de las placas se les determinó la viabilidad con azul de Tripano. En la otra placa, con el fin de consumir el  $H_2O_2$  residual, a cada pozo se le adicionaron 536 unidades/mL de catalasa de hígado bovino (SIGMA-ALDRICH cat. C9322). Enseguida esta placa se incubó nuevamente en la cámara de anaerobiosis con 100% de nitrógeno,

como arriba se menciona, durante 24 h a 36.5°C y al término a cada una de las muestras se le determinó su viabilidad con azul de Tripano.

### *6.8 Obtención de lisados amibianos*

Dos millones de amibas *Eh vir*, *Eh no vir* y *E. dispar* contenidas en 2 mL de medio de cultivo, se colocaron en cajas Petri de 35 mm dentro de una cámara de anaerobiosis purgada con 100% de oxígeno durante 15 min. La cámara se incubó a 36.5°C durante 90 minutos. Finalizado este tiempo, las muestras se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugaron a 1000 *g* durante 2 minutos y al sedimento resultante se le adicionaron 200 µL de H<sub>2</sub>O, 10 µL iodoacetamida 10 mM (SIGMA-ALDRICH cat. 16125), 5 µL EDTA 5 mM (SIGMA-ALDRICH cat. ED4SS) y se congelaron a -70°C para la posterior determinación de la actividad formadora y detoxificante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### *6.9 Actividad formadora y detoxificante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

Para determinar la actividad amibiana generadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mg de lisados amibianos (*Eh vir*, *Eh no vir* y *E. dispar*) normales y expuestos a 100% de oxígeno, como arriba se menciona, se resuspendieron en 1.15 mL de PBS y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Enseguida para inactivar a la actividad detoxificante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a cada tubo se le adicionaron 10 µL de iodoacetamida y se incubaron a 36.5°C durante 30 minutos. Debido a que la actividad reductora de

oxígeno es dependiente de NADPH, a cada tubo se le adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de NADPH 10 mM (en tris-HCl 15 mM, pH 8.8) y se incubaron a la misma temperatura durante 90 minutos en balancín. Para detener la reacción se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) al 50%. Después, los tubos fueron centrifugados a 6000 g durante 10 minutos y 1 mL de sobrenadante de cada tubo se transfirió a tubos nuevos y se le adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de sulfato ferroso de amonio 10mM  $((\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$  (SIGMA-ALDRICH cat. 215406) disuelto en TCA al 0.1% y 100  $\mu\text{L}$  de tiocianato de potasio 2.5 M (KSCN) (SIGMA-ALDRICH cat. P2713). En presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  el  $\text{Fe}^{2+}$  se oxida dando lugar a un complejo de color rojizo (tiocianato- $\text{Fe}^{3+}$ ) que absorbe a una longitud de onda de 480nm. La cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se determinó usando una curva estándar de 0 a 90  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Por otra parte, para determinar la actividad detoxificante de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1 mg de lisados de amibas normales y expuestas a oxígeno, como anteriormente se mencionó, se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5mL y a cada uno se le adicionaron 1.15 mL de PBS que contenía 0.4 mM del agente reductor DTT (SIGMA-ALDRICH cat. 43819). Estos tubos se incubaron durante 20 min a 36.5°C. Después a todos los tubos se les adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 mM y nuevamente se incubaron durante 90 min a 36.5°C en balancín. La reacción se detuvo agregando 20  $\mu\text{L}$  de TCA al 50%. Los tubos se centrifugaron a 6000 g durante 10 min y enseguida 1ml de sobrenadante se transfirió a otros tubos Eppendorf de 1.5 ml. A estos tubos se les adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de sulfato ferroso de amonio 10mM  $((\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$  disuelto en TCA al 0.1% y 100  $\mu\text{L}$  de tiocianato de potasio 2.5 M (KSCN).

Finalmente el contenido de cada tubo fue leído a 480 nm y el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se determinó usando una curva de 0 a 90 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 6.10 Efecto de PEG-catalasa en la resistencia amibiana oxígeno

Para determinar la participación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno en la resistencia amibiana a oxígeno, un millón de amibas Eh vir, Eh no vir, *E. dispar* y 1.7x10<sup>6</sup> de *E. dispar* fueron colocados en tubos de rosca de 1.5 mL (por duplicado) y se les adicionaron 700 unidades/ mL de polietilenglicol-catalasa (PEG-catalasa permeable) (SIGMA-ALDRICH cat. C4963) disuelto en PBS y se incubaron durante 15 minutos a 36.5 °C. Finalizado el tiempo de incubación, se adicionaron 1.2 mL de PBS saturado con O<sub>2</sub> (burbujeado con O<sub>2</sub> durante 15 min) y se incubaron nuevamente 90 minutos a 36.5°C. Enseguida, para desprender a las amibas de las paredes del tubo, las muestras fueron colocadas en hielo y a éstas se les determinó la viabilidad con azul de Tripano.

#### 6.11 Determinación de la expresión de Eh29 Y Eh34

Para cuantificar la expresión amibiana de las principales enzimas encargadas de la detoxificación de oxígeno, un millón de amibas (Eh vir, Eh no vir y *E. dispar*) se centrifugaron a 900 g durante 2 minutos y se le realizaron 2 lavados con PBS para eliminar el medio de cultivo. Enseguida las amibas se resuspendieron en 200 µL de H<sub>2</sub>O que contenía iodoacetamida 10mM, EDTA 5 mM y se congelaron a -70°C durante 10 minutos. Después, la proteína contenida en cada una de estas



muestras se cuantificó por el Método de Bradford y 10 ó 40 mg se destinaron para electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reducidas. Las condiciones de corrimiento de los 4 geles fueron 150 Volts durante 30 minutos y después 200 Volts hasta el término de la electroforesis. Enseguida un gel fue teñido con azul de Coomassie y los otros tres se destinaron para inmunoelectrotransferencia en papel de nitrocelulosa usando el sistema “TRANS-BLOT SEMI-DRY TRANSFER CELL” de BIORAD. La inmunoelectrotransferencia se realizó a 20 Volts durante 60 minutos empleando buffer de transferencia (Tris 25mM, Glicina 192mM y Metanol al 20%). Posteriormente los sitios reactivos de las membranas fueron bloqueados con leche descremada al 5 % en 50 mL de TBST (NaCl 150 mM, Tris-HCl pH 7.4, tween 20 al 0.005%) durante 2 h. Enseguida se realizaron 4 lavados con TBST (cada uno de 10 minutos). La primer membrana fue incubada con suero de conejo anti-Eh29 (producido previamente en nuestro laboratorio) en una dilución de 1: 20 000 en 20 mL de TBST; la segunda membrana se incubó con 4µg de anticuerpo anti-Eh34 (producido previamente en nuestro laboratorio) en 20 mL de TBST y la tercera membrana se incubó con un anticuerpo anti-actina (Sigma Aldrich, cat. A 2066) diluido 1:3000 en TBST. Todas las membranas con los anticuerpos primarios se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h y nuevamente se realizaron 3 lavados. Debido a que todos los anticuerpos primarios fueron producidos por conejos, cada membrana se incubó 3 h a temperatura ambiente con anticuerpo anti-conejo peroxidado (Cell Signaling cat. 7074) 1:3000 en 20 mL de TBST. Después de tres lavados de 10 minutos con TBST la presencia de anticuerpo primario se reveló con 20 mL de una

solución de Tris 0.1 M conteniendo 5mg de diaminobenzidina, imidazol 10mM y 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se detuvo con dos lavados de agua corriente. Finalmente, la adquisición de las imágenes se realizó con el equipo VERSADOC de BIORAD. Además, el análisis densitométrico de las bandas y el cálculo de su peso molecular se realizó con el programa Quantity One de BIORAD.

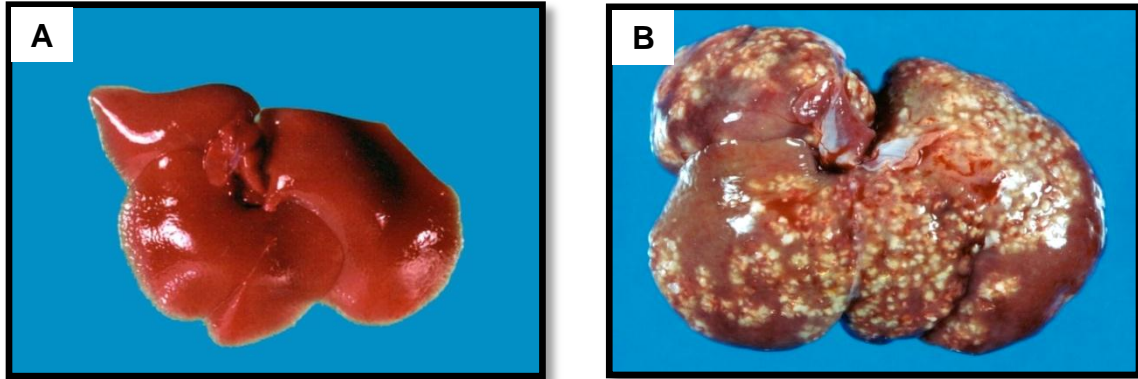
Los anticuerpos anti-Eh34 y anti-Eh29 utilizados en los ensayos de inmunoelectrotransferencia se obtuvieron por inmunización de conejos con proteínas recombinantes purificadas en nuestro laboratorio siguiendo el procedimiento descrito por (Montfort et al., 1994): los conejos fueron inyectados por vía intramuscular con 500  $\mu$ g de proteína recombinante Eh29 disuelta en 2 mL de PBS y emulsificada en 2mL de adyuvante completo de Freund. Después de 20 días se inyectaron 250  $\mu$ g de Eh29 y 10 días después nuevamente 250  $\mu$ g, pero éstas últimas inyecciones fueron por vía intraperitoneal y sin adyuvante. De igual forma otros conejos fueron inmunizados con proteína recombinante Eh34 como anteriormente se describió. Después de 1 semana todos los conejos fueron sangrados y para determinar la presencia de anticuerpos contra las proteínas Eh29 y Eh34 presentes en lisados de *E. histolytica*, el suero obtenido fue analizado mediante inmunoelectrotransferencia. Debido a que el suero hiperinmune anti-Eh29 mostró alta especificidad fue utilizado para la inmunoelectrotransferencia. Sin embargo, los anticuerpos anti-Eh34 tuvieron que ser purificados mediante dos etapas de cromatografía de afinidad; proteína A y Eh34 recombinante.

### 6.12 Consumo de oxígeno

El consumo ambiental de oxígeno se determinó utilizando el electrodo “MT200 Respirometer Cell, Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Scotland” calibrado previamente con PBS equilibrado 20 min con oxígeno ambiental (punto máximo, 220  $\mu\text{M}$ ) y con 2 % (w/vol) de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  disuelto en PBS (punto cero). Un millón de amibas *Eh vir*, *Eh no vir*, *E. dispar* y  $1.7 \times 10^6$  de *E. dispar* fueron resuspendidas en 250  $\mu\text{L}$  de su medio de cultivo correspondiente. Cada muestra (25  $\mu\text{l}$ ) fue analizada en una cámara con agitación magnética y temperatura constante (37°C) que contenía 125  $\mu\text{L}$  de PBS. Para el análisis de los resultados se utilizó un software de “Instruments Strathkelvin”.

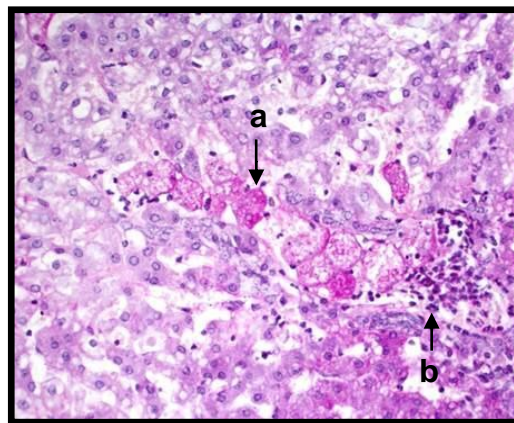
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Absceso hepático amibiano en hámster

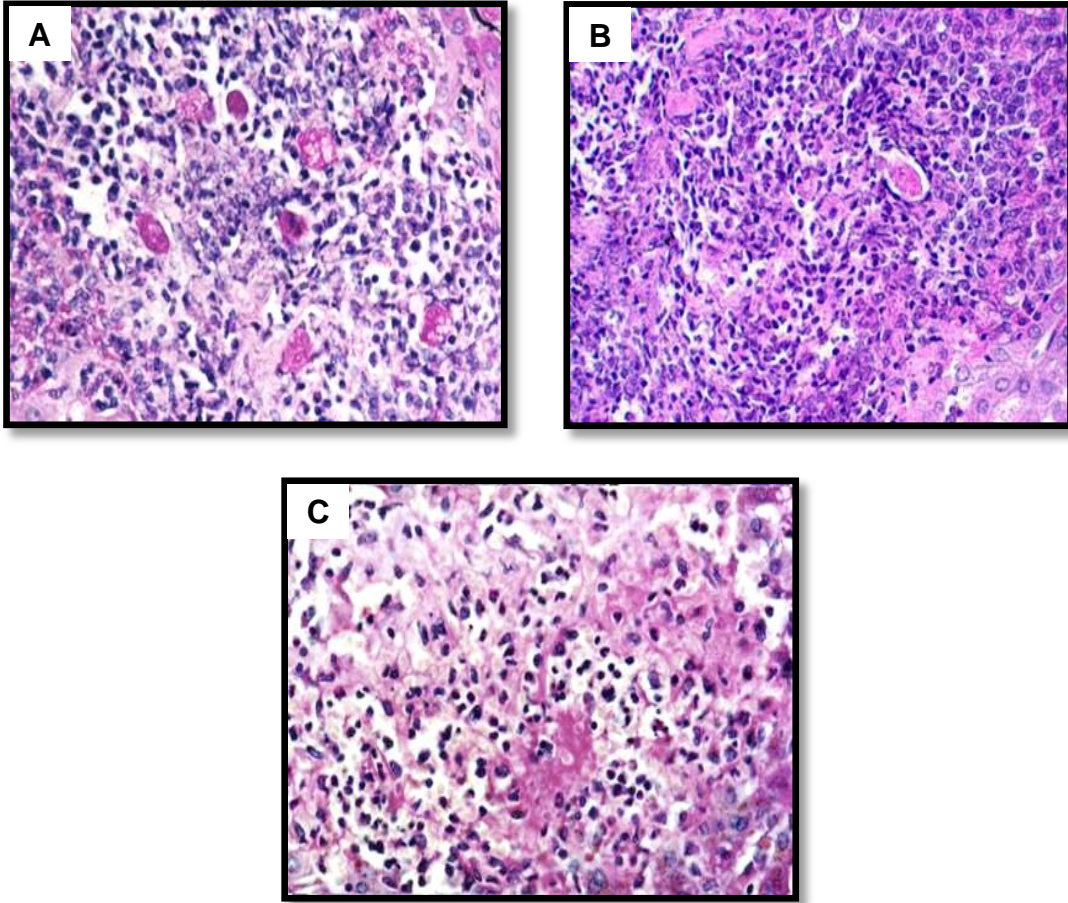


**Figura 1. Hígado de hámster A.** Hígado normal. **B.** Hígado con lesiones amebianas puntiformes distribuidas en todos los lóbulos y con hepatomegalia (7 días).

### 7.2 Sobrevida amibiana en el hígado de hámster

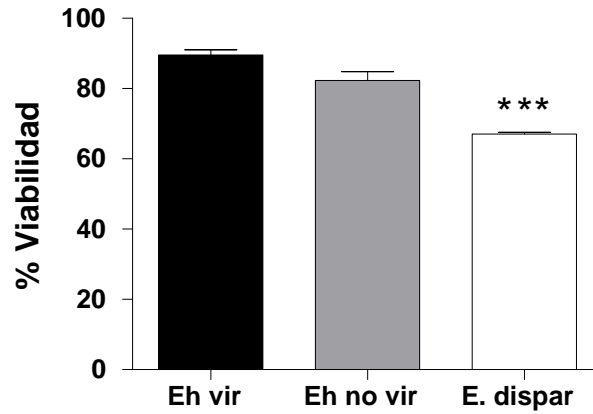


**Figura 2. Fotomicrografía del hígado de hámster infectado con amibas (1 h).** Este aspecto se observó con las tres amibas inyectadas (**Eh vir**, **Eh no vir** y **E. dispar**), en la que diversos trofozoítos (**a**) se encuentran en contacto con hepatocitos sin aparente daño celular y con escasas células inflamatorias (PMNs) en su vecindad (**b**).

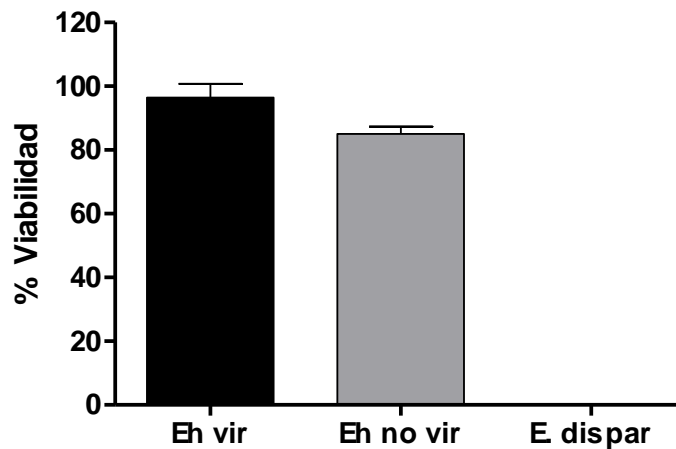


**Figura 3. Fotomicrografías de hígado de hámster (24 h).** A) *Eh vir*. Se observan trofozoítos bien conservados rodeados por una intensa reacción inflamatoria y con daño tisular. B) *Eh no vir* y C) *E. dispar*. Lesiones residuales sin amibas y con células inflamatorias características a este tiempo.

### 7.3 Susceptibilidad amibiana a oxígeno

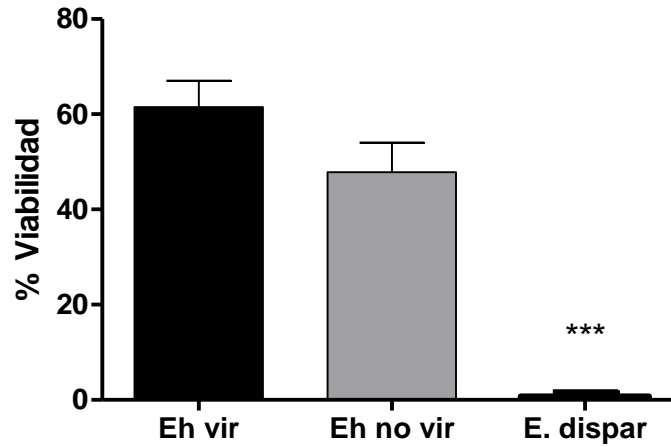


**Figura 4. Efecto de 1 h de hiperoxia en la viabilidad amibiana.** Las amibas fueron incubadas durante 1h en PBS saturado con oxígeno (burbujeado durante 15 minutos con O<sub>2</sub>). No se observan diferencias significativas en la viabilidad entre **Eh vir** y **Eh no vir**, mientras que **E. dispar** presenta menor viabilidad respecto a **Eh vir** y **Eh no vir**. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes y se graficó el error estándar. Prueba ANOVA de una vía con post-prueba estadística de Bonferroni. Significancia \*\*\*p<0.001 con respecto de Eh vir.



**Figura 5. Efecto de 1 h de hiperoxia en la sobrevivencia amibiana durante 24 h de cultivo.** Un millón de las amibas que sobrevivieron a 1 h de hiperoxia se incubaron en su medio de cultivo correspondiente durante 24 h y se determinó su viabilidad. Este tratamiento fue ligeramente citotóxico para **Eh vir** y **Eh no vir** que no presentaron diferencia significativa entre ellas. Sin embargo, este tratamiento fue completamente letal para **E. dispar**. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes y se graficó el error estándar. Prueba ANOVA de una vía con post-prueba estadística de Bonferroni. Significancia \*\*\* $p < 0.001$  con respecto de Eh vir.

#### 7.4 Susceptibilidad amibiana a concentraciones fisiológicas de oxígeno



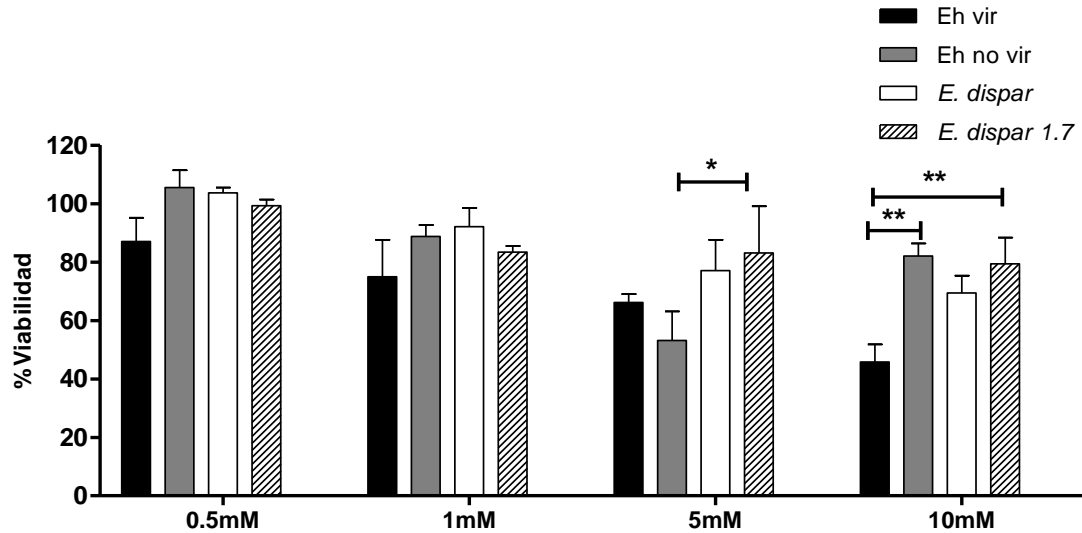
**Figura 6. Efecto de 6 h de exposición amibiana a oxígeno fisiológico.** Las amibas contenidas en las cámaras de plástico se colocaron en la cavidad peritoneal de hámsters leucopénicos y al término se evaluó su viabilidad. En estas condiciones entre el 60 y 50% de **Eh vir** y **Eh no vir** sobreviven, sin embargo estas diferencias no fueron significativas. Contrario a esto y al igual que la hiperoxia in vitro, **E. dispar** es incapaz de sobrevivir en el peritoneo del hámster, que al igual que el de la rata y el ratón puede tener ~6% de oxígeno (Renvall and Niinikoski, 1975). Los resultados corresponden a la media de seis determinaciones y se graficó el error estándar. Prueba ANOVA de una vía con post-prueba estadística de Bonferroni. Significancia \*\*\* $p < 0.001$  con respecto de Eh vir.



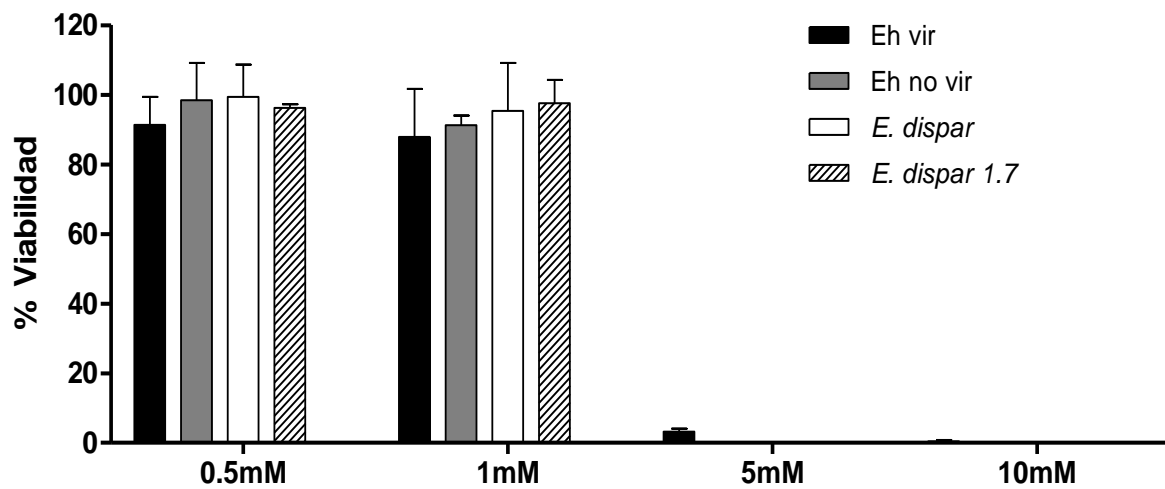
**Figura 7. Cámara de exposición amibiana a oxígeno fisiológico.** Tiene una membrana (poro 5  $\mu\text{m}$ ) que permite el intercambio de gases cuando es colocada en el peritoneo, y el fácil análisis de la viabilidad en amibas. Sus dimensiones son 1 cm x 1.7 cm.



### 7.5 Susceptibilidad amibiana a peróxido de hidrógeno

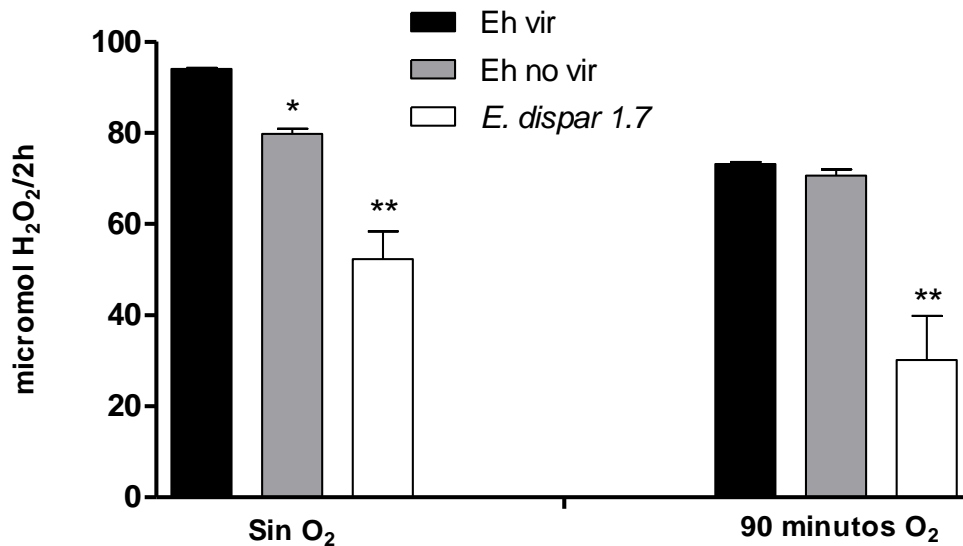


**Figura 8. Efecto de 1 h de exposición amibiana a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones de anaerobiosis.** Las amibas fueron incubadas en medio de cultivo durante 1 h en presencia de diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno (0.5, 1, 5 y 10 mM). Los resultados muestran que las concentraciones de 0.5 y 1 mM no fueron citotóxicas para las tres amibas analizadas. Interesantemente con la concentración de 5mM *E. dispar* mostró ser más resistente que **Eh vir** y **Eh no vir**. Por otro lado, **Eh no vir** y ***E. dispar* 1.7** fueron más resistentes que **Eh vir** con la concentración de 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes y se graficó el error estándar. Prueba ANOVA de dos vías con post-prueba estadística de Bonferroni. Significancia \*p<0.05, \*\* p<0.01

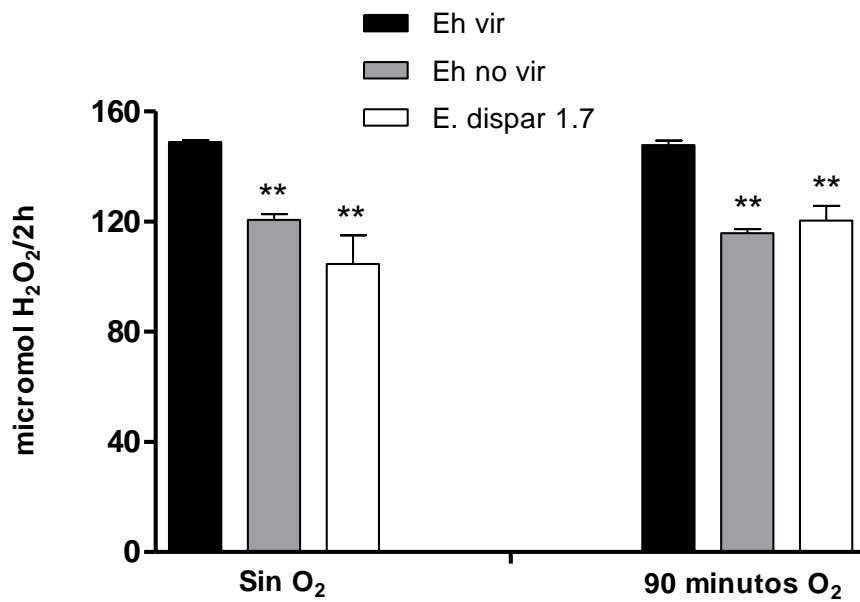


**Figura 9. Efecto de 1h de exposición ambiental a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre 24 h de cultivo.** A las amibas expuestas a 1 h de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se les adicionaron 536 unidades/mL de catalasa y se incubaron nuevamente durante 24 h. Se puede observar que en las tres amibas no existen diferencias en la susceptibilidad ambiental a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a largo plazo; las concentraciones de 0.5 y 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no fueron tóxicas, pero 5 y 10 mM tuvieron un efecto completamente letal. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes y se graficó el error estándar. Prueba ANOVA de dos vías con post-prueba estadística de Bonferroni.

## 7.6 Actividad formadora y detoxificante de peróxido de hidrógeno

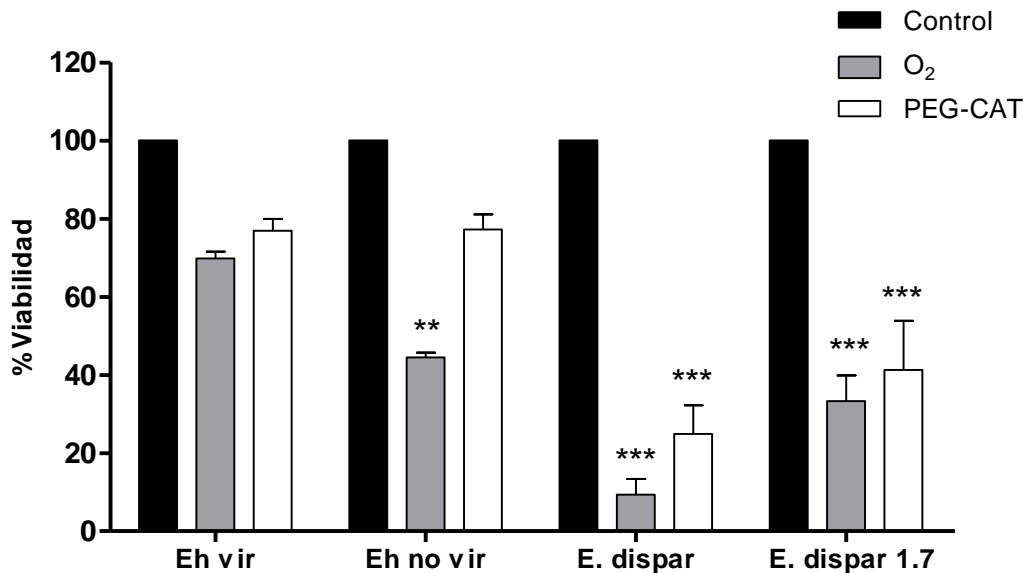


**Figura 10. Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por lisados amibianos.** Se determinó la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por los lisados amibianos normales y provenientes de la exposición de los trofozoítos a 90 min de hiperoxia. La producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue mayor en **Eh vir**, pero después de la hiperoxia esta cantidad se redujo a niveles similares a la **Eh no vir**. En cambio en las 2 condiciones la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en **E. dispar** fue menor a **Eh vir** y **Eh no vir**. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes y se graficó el error estándar. Prueba ANOVA de una vía con post-prueba estadística de Bonferroni. Significancia \*p<0.05, \*\* p<0.01 con respecto de Eh vir



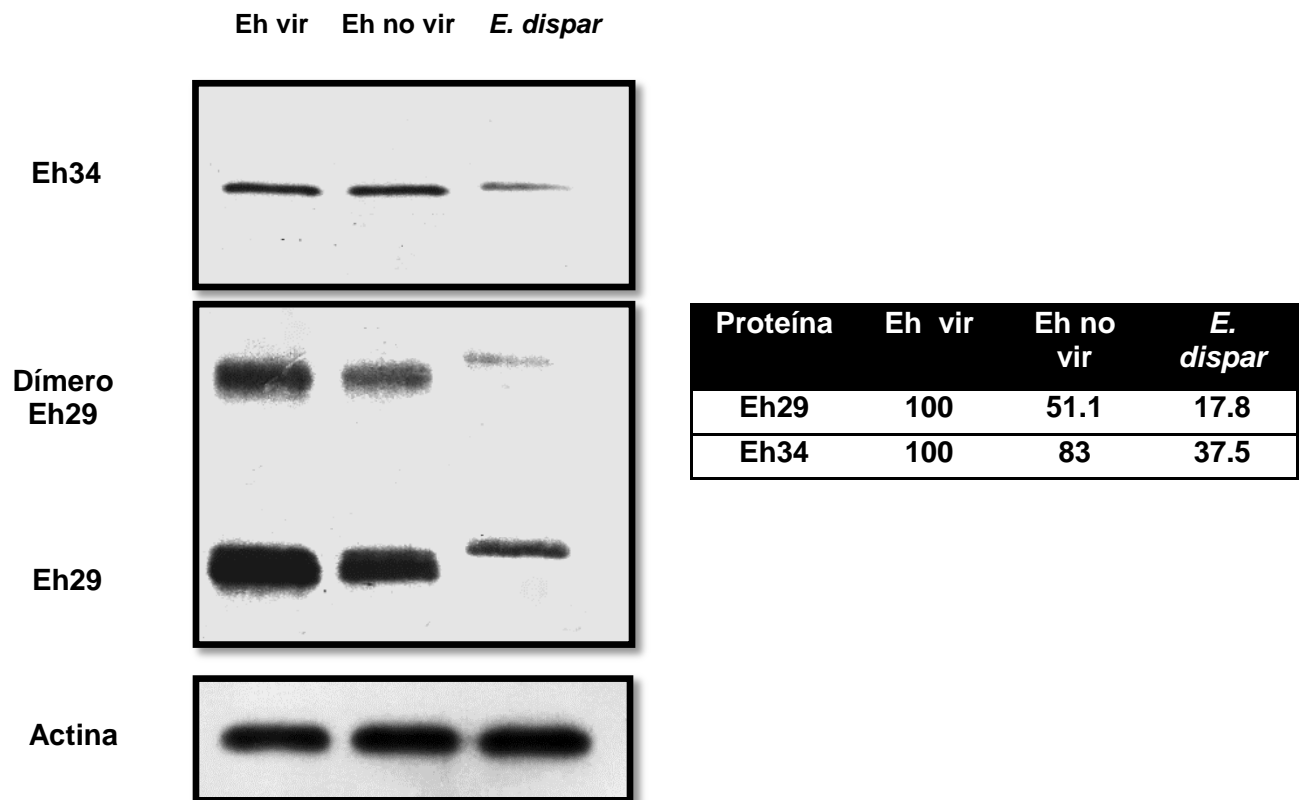
**Figura 11. Consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por los lisados amibianos.** Se determinó el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones de microanaerobiosis y después de la exposición de los trofozoítos a 90 min de hiperoxia. Este consumo fue mayor en **Eh vir** respecto a **Eh no vir** y E. dispar antes y después de la exposición a la hiperoxia. A diferencia de la actividad generadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ésta no se modificó después de la exposición amibiana a oxígeno. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes y se graficó el error estándar. Prueba ANOVA de una vía con post-prueba estadística de Bonferroni. Significancia \*\* p<0.01 con respecto de Eh vir

### 7.7 Efecto de PEG-catalasa en la resistencia amibiana a oxígeno



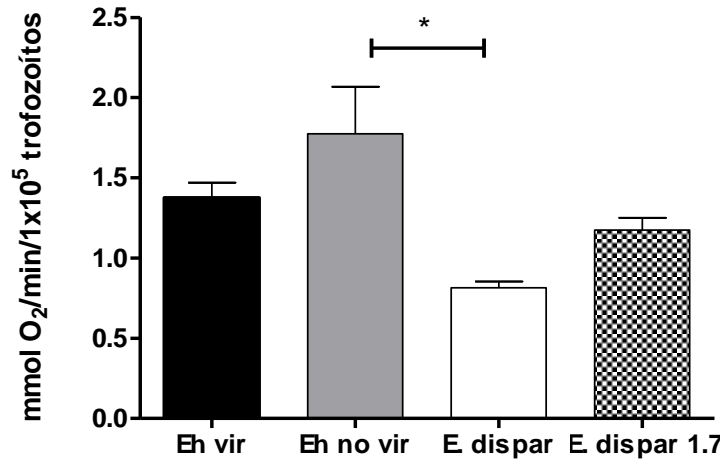
**Figura 12. Efecto PEG-catalasa en la resistencia amibiana a oxígeno.** Un millón de amibas fueron incubadas en medio de cultivo (control), PBS-O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub>), y PBS-O<sub>2</sub> previamente preincubadas con 700 unidades/ mL de PEG-catalasa (permeable) durante 15 minutos (PEG-CAT). En **Eh no vir**, PEG-cat incrementó su resistencia a oxígeno en niveles similares al de **Eh vir**. Sin embargo, este efecto no se observa en **E. dispar**. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes y se graficó el error estándar. Prueba ANOVA de dos vías con post-prueba estadística de Bonferroni. Significancia \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001.

## 7.8 Expresión amibiana de Eh34 Y Eh29



**Figura 13. Expresión de Eh34 y Eh29.** Mediante inmunoelectrotransferencia en lisados amibianos se determinó la expresión de Eh29 y Eh34. En **Eh vir** y **Eh no vir** los anticuerpos anti-Eh29 reconocen una proteína de ~30 kDa y en ***E. dispar*** una de ~32kDa. Además el dímero de ambas proteínas también es reconocido. Estas diferencias son compatibles con la secuencia de DNA reportada para ambas especies (Tachibana and Cheng, 2000). Por otra parte, en ambas especies, el anticuerpo Eh34 reconoció solo una proteína de ~34 kDa. Este análisis fue realizado con el programa Quantity One de BIORAD considerando la expresión de actina en cada amiba como 100%. En la tabla se muestran los resultados cuantitativos (porcentaje) de la expresión de Eh29 y Eh34 siendo **Eh vir** > **Eh no vir** > ***E. dispar***. Se consideró la expresión de **Eh vir** como 100%.

## 7.9 Consumo de Oxígeno



**Figura 14. Consumo ambiental de oxígeno.** El consumo de O<sub>2</sub> por **Eh vir** y **Eh no vir** no mostró diferencias significativas. En cambio el consumo por **E. dispar** fue menor ya sea con 1 ó 1.7 millones. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos y se graficó el error estándar. Prueba ANOVA de una vía con post-prueba estadística de Bonferroni. \* p < 0.05

## 8. DISCUSIÓN

Hasta la fecha no existe ningún modelo animal que reproduzca la amibiasis intestinal causada por *E. histolytica*. Sin embargo, el absceso hepático amibiano experimental en hámster (AHAH) es el modelo más utilizado para estudiar esta enfermedad, debido a la gran similitud con lo que ocurre en humanos (Tsutsumi and Shibayama, 2006). En los estadios iniciales del AHAH, los trofozoítos de amibas Eh vir, Eh no vir y *E. dispar* generan una intensa respuesta inflamatoria constituida por leucocitos polimorfonucleares, principalmente. Posteriormente algunas amibas Eh vir sobreviven y proliferan hasta causar la muerte del hospedero. Contrario a esto, Eh no vir y *E. dispar* desaparecen del hígado de hámster en menos de 24 h. El conocimiento detallado de los mecanismos que impiden la sobrevivencia de Eh no vir y de *E. dispar*, revelará las moléculas clave de *E. histolytica* que permiten su sobrevivencia en los tejidos. Además, lo anterior permitirá el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Las moléculas que podrían ser las principales causantes de la eliminación de Eh no vir y *E. dispar* del hígado de hámster son: oxígeno, ROS, NO y complemento. Se ha propuesto que la resistencia a algunas de estas moléculas puede ser determinante para la virulencia y/o patogenicidad del parásito (Olivos et al., 2005). De las moléculas ROS generadas por la respuesta inflamatoria (superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es el que potencialmente puede participar en la eliminación de Eh no vir y *E. dispar*, debido a su gran capacidad de difundir a través de las membranas biológicas y a que: 1) el superóxido al ser una molécula cargada no puede atravesar con facilidad la membrana de las amibas y por



consecuencia generar daño, 2) el radical hidroxilo presenta limitada difusión, debido a que es una molécula muy reactiva que reacciona inmediatamente en el sitio en donde se genera y su formación depende de la presencia de metales, generalmente Fe y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por lo antes mencionado decidimos analizar si la resistencia ambiental al oxígeno y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desempeñan un papel importante en la eliminación de Eh no vir y *E. dispar* del hígado de hámster.

Se sabe que *E. histolytica* es capaz de tolerar hasta 5% de oxígeno (Band and Cirrito, 1979) en condiciones *in vitro* y su resistencia a este gas se ha relacionado con su virulencia (Olivos-García et al., 2004) sin embargo, se desconoce si esta resistencia se correlaciona con su patogenicidad. Por otra parte, una hora después que Eh vir, Eh no vir y *E. dispar* son inyectadas en el hígado de hámster, se confrontan con concentraciones tóxicas de oxígeno que oscilan entre 4 y 14% (Nauck et al., 1981). A este tiempo estas concentraciones de oxígeno parecen no causarles daño ya que las tres amibas se encuentran bien conservadas (**Figura 2**). Contrario a esto, después de aproximadamente 24 h sólo Eh vir es capaz de sobrevivir hasta la muerte del animal (**Figura 3**). En condiciones *in vitro* la exposición ambiental a 1h de hiperoxia, tuvo efecto citotóxico moderado en Eh no vir y fue completamente letal en *E. dispar*; sólo en tiempos prolongados de cultivo (**Figura 5**). Debido a que las concentraciones de oxígeno utilizadas en los experimentos *in vitro* no son fisiológicas, decidimos exponer las amibas a la concentración de oxígeno encontrada en la cavidad peritoneal de hámsters que al igual que la rata y ratón puede ser de aproximadamente 6% (Renvall and Niinikoski, 1975). Para esto introducimos las amibas en unas cámaras de plástico cubiertas con una membrana con poros de 5 µm y ésta la colocamos dentro del

peritoneo de un hámster leucopénico. Este procedimiento presenta dos ventajas: 1) la membrana permite el libre intercambio de gases y evita la salida de las amibas, lo cual permite su análisis inmediato y 2) la ausencia de células inflamatorias evita el bloqueo de los poros de la membrana e interferencia de ROS inflamatorio. En estas condiciones y de manera similar a los experimentos *in vitro*, ~6% de oxígeno fisiológico fue tóxico para Eh vir y Eh no vir y completamente letal sólo para *E. dispar* (**Figura 6**). Contrario a esto, la resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue similar en Eh vir, Eh no vir y *E. dispar* tanto en concentraciones subletales o letales (**Figura 8**). Esto sugiere, que la resistencia al estrés causado por oxígeno puede ser más relevante que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la sobrevivencia de Eh vir en el hígado de hámster. Al igual que todos los microorganismos micro-anaeróbicos, en *E. histolytica* los centros Fe-S de algunas proteínas de su vía glucolítica son extremadamente sensibles a la oxidación por oxígeno, ROS y NO (Olivos-García., et. al. 2012) Al ser la glucólisis una fuente de energía y de poder reductor (electrones), una falla en ésta podría provocar la muerte de la amiba. Para evitar esto *E. histolytica* cuenta con un eficiente sistema enzimático de reducción de oxígeno, ya sea de forma divalente que genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o tetravalente cuando produce H<sub>2</sub>O (**Imagen 3**). Además, la toxicidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la evita con Eh29 (Bruchhaus et al., 1997) que a diferencia de catalasa no regenera oxígeno y su actividad es 2000 veces mayor al de otros sistemas como el de *Saccharomyces* (Bruchhaus et al., 1997). Se sabe que *E. histolytica* produce una FeSOD sin embargo, debido a que hasta la fecha no se ha descrito una enzima que catalíticamente reduzca el oxígeno de forma monovalente, es posible que su principal función sea la de reducir el superóxido producido por auto-oxidaciones. Debido a que se sabe que Eh34 (Bruchhaus et

al., 1998) y Eh29 son las principales enzimas encargadas de la reducción de oxígeno y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente, decidimos determinar su expresión en Eh vir, Eh no vir y en *E. dispar*. Encontramos una correlación entre la expresión de Eh34 y la resistencia amibiana al oxígeno (Eh vir>Eh no vir>*E. dispar*) (**Figura 13 y Figura 4**). Además, esta expresión también correlaciona con la actividad productora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de los lisados amibianos, sin embargo después de 90 min de hiperoxia dicha actividad se reduce en las tres amibas; en Ehvir y Eh no vir a niveles similares pero superiores al de *E. dispar* (**Figura 10**). Debido a que el consumo de oxígeno por los trofozoítos amibianos fue similar entre Eh vir y Eh no vir es posible que la regulación de la actividad de Eh34 este determinada por el estado redox intracelular; la inhibición de la actividad Eh34 durante la hiperoxia refuerza esta propuesta. El bajo consumo de oxígeno observado en *E. dispar* (**Figura 14**) se puede explicar por los bajos niveles de expresión y actividad de Eh34 (**Figura 13 y Figura 10**) y probablemente por los bajos niveles de la enzima FDP que transforma el oxígeno en H<sub>2</sub>O (Vicente et al., 2012). Por otra parte a pesar de que la expresión de Eh29 fue: Eh vir>Eh no vir>*E. dispar* (**Figura 13**), la actividad reductora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de los lisados amibianos fue igual en Eh no vir y *E. dispar* pero menor al de Eh vir (**Figura 11**). Contrario a la actividad productora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, esta actividad no se modificó después de la hiperoxia. Estos resultados sugieren que la mayor actividad detoxificante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecto de la que lo produce, evita una intoxicación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno durante la reducción de oxígeno. Como ya hemos mencionado, a pesar de las diferencias en la expresión de Eh29 en Eh vir, Eh no vir y *E. dispar* su resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno fue muy similar (**Figura 8 y Figura 9**). La correlación entre la expresión de Eh 29 y la resistencia amibiana a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

exógeno es controversial (Choi et al., 2005; Davis et al., 2006). A pesar de estas discrepancias, lo que es claro es que la capacidad de generación de  $H_2O_2$  en Eh vir, Eh no vir y *E. dispar* a partir de la reducción de oxígeno es inferior al de su capacidad detoxificante de  $H_2O_2$ . Esto sugiere que el mantenimiento de una hipoxia intracelular es la principal función de la vía de reducción de oxígeno. Nuestros resultados no son compatibles con lo reportado en la literatura, en la que aislados de *E. histolytica* muestran mayor resistencia a 5mM de  $H_2O_2$  respecto a *E. dispar* (Choi et al., 2005) y *E. histolytica* HM-1: IMSS expuesta durante 9 h a 0.8 mM de  $H_2O_2$  presenta una muerte del 50% (Nandi et al., 2010). Sin embargo, estos autores no tomaron en cuenta el efecto tóxico del oxígeno ambiental.

Por otra parte, la incapacidad de PEG-cat de inhibir la toxicidad del oxígeno sobre *E. dispar*, demuestra que el oxígeno es el principal responsable de su susceptibilidad a este gas. En cambio, debido a que PEG-cat incrementó la resistencia de Eh no vir a oxígeno en niveles similares a los de Eh vir (**Figura 12**), los mecanismos de su susceptibilidad pueden depender de la capacidad de reparación de los daños causados por el  $H_2O_2$  endógeno o por otras vías detoxificantes. En este sentido se ha observado que a diferencia de la Eh vir, la exposición de Eh no vir a hiperoxia causa una inhibición irreversible de la enzima PFOR de la glucólisis que contiene centros Fe-S (Ramos-Martinez et al., 2009). La inhibición irreversible de PFOR inhibe el flujo de la glucólisis. Esto a su vez disminuye el poder reductor necesario para el mantenimiento de la hipoxia intracelular y al mismo tiempo los bajos niveles de ATP producen acidificación citoplasmática, que alteran la permeabilidad celular y finalmente causan la muerte.

Finalmente, nuestros resultados sugieren que durante las etapas iniciales de la invasión amibiana a los tejidos, el mantenimiento de una hipoxia intracelular en niveles apropiados para la actividad metabólica y probablemente la capacidad de reparación de los daños causados por  $H_2O_2$ , son condiciones necesarias para su sobrevivencia. Después de esta etapa la importancia de vía reductora de oxígeno es secundaria ya que la inflamación crea un ambiente local de hipoxia y las células que rodean a los parásitos no producen ROS.

## 9. CONCLUSIÓN

La actividad de la vía reductora de oxígeno de *Entamoeba histolytica* está relacionada con su patogenicidad, mas no con su virulencia.

## APÉNDICE

### A. Preparación de reactivos

#### Stock de fosfatos

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.15 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.15 M

Llegar a un pH final de 7.2

#### Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

Stock de Fosfatos	100 mL
NaCl	14.41 g

Aforar a un volumen de 1L con agua desionizada

#### APS

Persulfato de amonio	50 mg
----------------------	-------

Disolver en 500 µL de agua desionizada. Preparar al momento

#### Buffer pH 8.8 (Tris/HCl)

Tris 1.5 M	18.15 g
------------	---------

Aforar a un volumen de 100 mL con agua desionizada y ajustar el pH con HCl

#### Buffer pH 6.8 (Tris/ HCl)

Tris 0.5 M	6.0 g
------------	-------

Aforar a un volumen de 100 mL con agua desionizada y ajustar el pH con HCl

#### Gel separador (para 4 geles al 12%)

H <sub>2</sub> O	4.8 mL
Glicerol	3.2 mL
Buffer pH 8.8 (Tris/HCl)	6.0 mL
SDS 10%	240 µL
Acrilamida	9.6 mL
Persulfato (APS)	100 µL
TEMED	20 µL (adicionar al final)

### **Gel compactador (para 4 geles al 12%)**

H <sub>2</sub> O	6.0 mL
Buffer pH 6.8 (Tris/HCl)	2.5 mL
Acrilamida	1.3 mL
SDS 10%	100 µL
Persulfato (APS)	50 µL
TEMED	16 µL (adicionar al final)

### **Buffer de muestra**

H <sub>2</sub> O	3.8 mL
Buffer pH 6.8 (Tris/HCl)	1.0 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS 10%	1.6 mL
Azul de Bromofenol	0.5%(w/vol)

### **Buffer corrida sin SDS**

Tris 25 mM	3.03 g
Glicina 192 mM	14.41 g
Llevar a un volumen de 1 L con agua desionizada	

### **Buffer corrida con SDS**

Tris 25 mM	3.03 g
Glicina 192 mM	14.41 g
SDS 10%	10 mL
Llevar a un volumen de 1 L con agua desionizada	

### **Buffer para transferencia**

Tris 25 mM	3.03 g
Glicina 192 mM	14.41 g
Metanol 20%	200 mL
Llevar a un volumen de 1 L con agua desionizada	

## TBST

NaCl 150 mM	8.77 g
Tris-HCl pH 7.4	10 mL
Tween 20 0.005%	50 µL

## Solución de diaminobezidina

Tris 0.1 M	6 mL
Diaminobemzidina	15 mg
Imidazol 10 mM	40.8 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	300 µL (adiconar al final)

Llevar a un volumen de 60 mL con agua desionizada y colocar 20 mL en cada membrana

### ***B. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford***

#### **• Curva Estándar**

1. Etiquetar los tubos Eppendorf como se muestra en la tabla 1, después añadir las cantidades señaladas de H<sub>2</sub>O y Albumina (BSA).

Tabla 1. Curva Estándar

Tubo	H <sub>2</sub> O (µL)	Albumina (µL)
<b>1 (blanco)</b>	1000	0
<b>2</b>	800	200
<b>3</b>	600	400
<b>4</b>	400	600
<b>5</b>	100	900

2. Colocar en otra serie de tubos 1 mL de reactivo de Bradford y adicionar 20 µL de su tubo correspondiente de la tabla 1. Homogenizar completamente.

Tubo	Reactivo Bradford	H <sub>2</sub> O/ Albumina
1'	1 mL	20 µL
2'	1mL	20 µL
3'	1 mL	20 µL
4'	1mL	20 µL
5'	1 mL	20 µL



3. Realizar la lectura de absorbancia con un espectrofotómetro a una longitud de 595 nm
4. Reactivos

**BSA.** mg BSA/mL H<sub>2</sub>O. Se pesan 2.1 mg de BSA y se disuelve en 2.1 mL de H<sub>2</sub>O

**Reactivo de Bradford.** Dilución 1:5 del Reactivo de Bradford en H<sub>2</sub>O

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Almeida, C.C., Romao, C.V., Lindley, P.F., Teixeira, M., and Saraiva, L.M. (2006). The role of the hybrid cluster protein in oxidative stress defense. *The Journal of biological chemistry* 281, 32445-32450.
2. Andersson, J.O., Hirt, R.P., Foster, P.G., and Roger, A.J. (2006). Evolution of four gene families with patchy phylogenetic distributions: influx of genes into protist genomes. *BMC evolutionary biology* 6, 27.
3. Band, R.N., and Cirrito, H. (1979). Growth response of axenic *Entamoeba histolytica* to hydrogen, carbon dioxide, and oxygen. *The Journal of protozoology* 26, 282-286.
4. Braga, L.L., Ninomiya, H., McCoy, J.J., Eacker, S., Wiedmer, T., Pham, C., Wood, S., Sims, P.J., and Petri, W.A., Jr. (1992). Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of clinical investigation* 90, 1131-1137.
5. Brandt, H., and Tamayo, R.P. (1970). Pathology of human amebiasis. *Human pathology* 1, 351-385.
6. Bruchhaus, I., Richter, S., and Tannich, E. (1997). Removal of hydrogen peroxide by the 29 kDa protein of *Entamoeba histolytica*. *The Biochemical journal* 326 ( Pt 3), 785-789.
7. Bruchhaus, I., Richter, S., and Tannich, E. (1998). Recombinant expression and biochemical characterization of an NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. *The Biochemical journal* 330 ( Pt 3), 1217-1221.
8. Choi, M.H., Sajed, D., Poole, L., Hirata, K., Herdman, S., Torian, B.E., and Reed, S.L. (2005). An unusual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack. *Molecular and biochemical parasitology* 143, 80-89.
9. Davis, P.H., Zhang, X., Guo, J., Townsend, R.R., and Stanley, S.L., Jr. (2006). Comparative proteomic analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. *Molecular microbiology* 61, 1523-1532.
10. Espinosa-Cantellano, M., and Martinez-Palomo, A. (2000). Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clinical microbiology reviews* 13, 318-331.

11. Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Ali, V., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. (2010). Two atypical L-cysteine-regulated NADPH-dependent oxidoreductases involved in redox maintenance, L-cystine and iron reduction, and metronidazole activation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *The Journal of biological chemistry* 285, 26889-26899.
12. Ladas, S.D., Karamanolis, G., and Ben-Soussan, E. (2007). Colonic gas explosion during therapeutic colonoscopy with electrocautery. *World journal of gastroenterology : WJG* 13, 5295-5298.
13. Leippe, M., Andra, J., Nickel, R., Tannich, E., and Muller-Eberhard, H.J. (1994). Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Molecular microbiology* 14, 895-904.
14. Lo, H., and Reeves, R.E. (1980). Purification and properties of NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology* 2, 23-30.
15. Long-Krug, S.A., Fischer, K.J., Hysmith, R.M., and Ravdin, J.I. (1985). Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. *The Journal of infectious diseases* 152, 536-541.
16. Montfort, I., Perez-Tamayo, R., Gonzalez Canto, A., Garcia de Leon, M.C., Olivos, A., and Tello, E. (1993). Role of cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* on the cytopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes in vitro. *The Journal of parasitology* 79, 98-105.
17. Montfort, I., Perez-Tamayo, R., Perez-Montfort, R., Gonzalez Canto, A., and Olivos, A. (1994). Purification and immunologic characterization of a 30-kDa cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology research* 80, 607-613.
18. Nandi, N., Sen, A., Banerjee, R., Kumar, S., Kumar, V., Ghosh, A.N., and Das, P. (2010). Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Microbiology* 156, 1926-1941.
19. Nauck, M., Wolfle, D., Katz, N., and Jungermann, K. (1981). Modulation of the glucagon-dependent induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase and tyrosine aminotransferase by arterial and venous oxygen concentrations in hepatocyte cultures. *European journal of biochemistry / FEBS* 119, 657-661.
20. Olivos-Garcia, A., Nequiz-Avendano, M., Tello, E., Martinez, R.D., Gonzalez-Canto, A., Lopez-Vancell, R., Garcia de Leon, M.C., Montfort, I., and Perez-

- Tamayo, R. (2004). Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. *Experimental and molecular pathology* 77, 66-71.
21. Olivos, A., Ramos, E., Nequiz, M., Barba, C., Tello, E., Castanon, G., Gonzalez, A., Martinez, R.D., Montfort, I., and Perez-Tamayo, R. (2005). *Entamoeba histolytica*: mechanism of decrease of virulence of axenic cultures maintained for prolonged periods. *Experimental parasitology* 110, 309-312.
  22. Outten, F.W., and Theil, E.C. (2009). Iron-based redox switches in biology. *Antioxidants & redox signaling* 11, 1029-1046.
  23. Petri, W.A., Jr., Joyce, M.P., Broman, J., Smith, R.D., Murphy, C.F., and Ravdin, J.I. (1987). Recognition of the galactose- or N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba histolytica* by human immune sera. *Infection and immunity* 55, 2327-2331.
  24. Ramos-Martinez, E., Olivos-Garcia, A., Saavedra, E., Nequiz, M., Sanchez, E.C., Tello, E., El-Hafidi, M., Saralegui, A., Pineda, E., Delgado, J., *et al.* (2009). *Entamoeba histolytica*: oxygen resistance and virulence. *International journal for parasitology* 39, 693-702.
  25. Renvall, S., and Niinikoski, J. (1975). Intraperitoneal oxygen and carbon dioxide tensions in experimental adhesion disease and peritonitis. *American journal of surgery* 130, 286-292.
  26. Tachibana, H., and Cheng, X.J. (2000). *Entamoeba dispar*: cloning and characterization of peroxiredoxin genes. *Experimental parasitology* 94, 51-55.
  27. Tannich, E., Bruchhaus, I., Walter, R.D., and Horstmann, R.D. (1991). Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. *Molecular and biochemical parasitology* 49, 61-71.
  28. Tsutsumi, V., and Shibayama, M. (2006). Experimental amebiasis: a selected review of some in vivo models. *Archives of medical research* 37, 210-220.
  29. Vicente, J.B., Ehrenkaufer, G.M., Saraiva, L.M., Teixeira, M., and Singh, U. (2009). *Entamoeba histolytica* modulates a complex repertoire of novel genes in response to oxidative and nitrosative stresses: implications for amebic pathogenesis. *Cellular microbiology* 11, 51-69.

30. Vicente, J.B., Tran, V., Pinto, L., Teixeira, M., and Singh, U. (2012). A detoxifying oxygen reductase in the anaerobic protozoan *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic cell* 11, 1112-1118.
31. Willhoeft, U., Buss, H., and Tannich, E. (2002). The abundant polyadenylated transcript 2 DNA sequence of the pathogenic protozoan parasite *Entamoeba histolytica* represents a nonautonomous non-long-terminal-repeat retrotransposon-like element which is absent in the closely related nonpathogenic species *Entamoeba dispar*. *Infection and immunity* 70, 6798-6804.