



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
CAMPUS GUANAJUATO
División de Ciencias Naturales y Exactas

Evaluación de la participación de la
esfingomielinasa ácida 6 en la actividad lítica y
fagocítica de glóbulos rojos de la cepa
avirulenta Rahman de *Entamoeba histolytica*.

Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:
WANDA SHUNASHY CRUZ BENÍTEZ

Director: Dr. Luis Felipe Padilla Vaca

Codirectores: Dra. Fátima Berenice Ramírez Montiel

Dr. Luis Fernando Anaya Velázquez

Guanajuato, Gto.

Octubre 2023



Guanajuato, Gto., 20 de septiembre de 2023

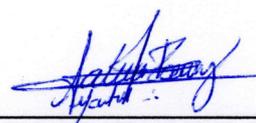
Dr. Agustín Ramón Uribe Ramírez
Director de la División de Ciencias Naturales y Exactas
Universidad de Guanajuato
Presente.

Los que suscriben, directores de la tesis "Evaluación de la participación de la esfingomielinasa ácida 6 en la actividad lítica y fagocítica de glóbulos rojos de la cepa avirulenta Rahman de *Entamoeba histolytica*" realizada por Wanda Shunashy Cruz Benítez, estudiante de la Licenciatura de Biología, hacemos constar que ha concluido la parte experimental, redacción y revisión de la tesis, por lo que autorizamos que realice los trámites correspondientes para el examen de titulación.

Atentamente



Dr. Luis Felipe Padilla Vaca



Dra. Fátima Berenice Ramírez Montiel



Dr. Luis Fernando Anaya Velázquez

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato de la Universidad de Guanajuato, bajo la dirección del Dr. Luis Felipe Padilla Vaca, de la Dra. Fátima Berenice Ramírez Montiel y del Dr. Luis Fernando Anaya Velázquez. Para la realización de dicho trabajo se contó con el financiamiento de la Universidad de Guanajuato (Proyecto 018/2023).

El jurado evaluador estuvo integrado por:

Dra. Claudia Leticia Mendoza Macías

Presidente

Dr. Israel Enrique Padilla Guerrero

Secretario

M.C. Juana López Godínez

Vocal

Dra. Suria Gisela Vásquez Morales

Sinodal suplente

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a Dios, por ser mi guía espiritual en este largo camino y ayudarme a cumplir esta gran meta de mi vida, gracias a él superé momentos difíciles y me levanté para culminar con éxito.

A mi familia, es especial a mis padres, Quintina y Sergio David por apoyarme en todo momento, por sus consejos, por su amor y apoyo incondicional, por inculcarme buenos valores y darme la mejor educación. Por enseñarme a trabajar duro para cumplir los objetivos personales y no darme por vencida. A mi hermano David, por siempre estar para mí y por los buenos momentos que hemos compartido.

A todos los profesores que me han acompañado durante mi trayectoria académica y a lo largo de mi vida, quienes me enseñaron a tener pasión por lo que uno hace, me impartieron sus conocimientos y me ayudaron en cada paso que di.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Felipe Padilla por trasmitirme su gusto por la ciencia. Gracias por permitirme adentrarme en el mundo de la ciencia y por darme la oportunidad de participar en este proyecto. Gracias por su tiempo, su confianza, sus consejos, por ser un excelente investigador y asesor.

Al Dr. Fernando Anaya por su colaboración como codirector, por instruirme una perspectiva única de la ciencia y por sus enseñanzas. Por compartirme sus experiencias tan interesantes y sus consejos.

A la Dra. Fátima Ramírez por brindarme su apoyo, sus enseñanzas y paciencia para la realización de este trabajo. Por siempre, estar dispuesta a explicarme y ser pieza clave en la realización de este proyecto. Gracias Fabe por tu tiempo y por compartir tu conocimiento conmigo.

A todo el equipo del laboratorio de Patobiología Molecular de Protozoarios Parásitos, gracias por compartir sus conocimientos conmigo y compartir momentos agradables, gracias a Fernanda y a Marcos y en especial agradezco.

A la Dra. Ángeles Rangel y a la Q.F.B. Itzel Parámo quienes me aconsejaron y me compartieron sus enseñanzas. Gracias por su apoyo y por ser personas clave en cada proyecto que se realiza en el laboratorio. Gracias por su tiempo y dedicación.

Agradezco a mis amigas por siempre estar dispuestas a escucharme y darme palabras de aliento. A Sofia y Andy por ser un gran equipo de trabajo y por siempre darme su apoyo. A Mari, Ana y Armando por su tiempo y por haber pasado excelentes momentos durante la carrera.

A mi Universidad de Guanajuato por contribuir en mi formación académica y personal, aquí he vivido todo tipo de experiencias y ha sido grato formar parte de esta gran colmena.

A todas aquellas personas que han formado parte directa e indirecta para culminación de este proyecto.

“La curiosidad es la llave que abre las puertas del conocimiento”

Benjamin Franklin

ÍNDICE GENERAL

Tabla de contenido

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Amibiasis.....	2
2.1.1 Diagnóstico.....	2
2.1.2 Tratamiento.....	3
2.2 <i>Entamoeba histolytica</i>	3
2.2.1 Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	5
2.3 Factores de virulencia de <i>E. histolytica</i>	7
2.4 Determinantes de virulencia de <i>E. histolytica</i>	8
2.5 Esfingomielinasas.....	9
2.5.1 Esfingomielinasas neutras en <i>E. histolytica</i>	9
2.5.2 Esfingomielinasas ácidas en <i>E. histolytica</i>	10
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS	14
5.1 Objetivo General.....	14
5.2 Objetivos específicos.....	14
6. METODOLOGÍA	15
6.1 Cepas de <i>E. histolytica</i>	15
6.2 Determinación de la actividad de aSMasa secretada de <i>E. histolytica</i>	15
6.3 Actividad hemolítica de amibas completas.....	15
6.4 Eritrofagocitosis.....	16
6.5 Digestión de eritrocitos.....	17
7. RESULTADOS	18
7.1 Actividad secretada de aSMasa en la cepa avirulenta Rahman de <i>E. histolytica</i> que sobreexpresa el gen <i>EhaSM6</i>	18
7.2 Actividad hemolítica de los trofozoítos de la cepa Rahman de <i>E. histolytica</i> que sobreexpresan el gen <i>EhaSM6</i>	19
7.3 Eritrofagocitosis de la cepa avirulenta Rahman de <i>E. histolytica</i> que sobreexpresan el gen <i>EhaSM6</i>	20

7.4 Digestión de eritrocitos de la cepa Rahman de <i>E. histolytica</i> sobreexpresante del gen <i>EhaSM6</i>	22
8. DISCUSIÓN.....	24
9. CONCLUSIONES.....	28
10. PERSPECTIVAS.....	29
11. BIBLIOGRAFÍA.....	30

Índice de figuras

Figura 1. Forma celular de <i>E. histolytica</i>.....	4
Figura 2. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	6
Figura 3. Gráfica de la contribución de las nSMasas en la virulencia <i>in vitro</i> de <i>E. histolytica</i>	10
Figura 4. Mecanismo de reparación de daños a la membrana plasmática mediada por aSMasa6 secretada en <i>E. histolytica</i> y su implicación en la virulencia.....	12
Figura 5. Actividad secretada de aSMasa de la cepa avirulenta Rh de <i>E. histolytica</i> que sobreexpresa el gen <i>EhaSM6</i>.....	19
Figura 6. Actividad hemolítica de los trofozoítos de la cepa Rahman de <i>E. histolytica</i> que sobreexpresa el <i>EhaSM6</i>.....	20
Figura 7. Eritrofagocitosis de las amibas de la cepa avirulenta Rahman de <i>E. histolytica</i> que sobreexpresa el <i>EhaSM6</i>.....	21
Figura 8. Digestión de eritrocitos de la cepa Rahman de <i>E. histolytica</i> que sobreexpresa el gen <i>EhaSM6</i>.....	23

1. RESUMEN

La amibiasis intestinal es una parasitosis que afecta al humano y es provocada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. Este parásito posee moléculas que participan como factores y/o determinantes de virulencia durante su proceso infectivo. Se ha descrito que las esfingomielinasas (SMasas) son enzimas que participan en el proceso patogénico del parásito. *E. histolytica* posee 6 genes que codifican para las esfingomielinasas acidas (aSMasas), las cuales se transcriben en condiciones de crecimiento basal, en donde el gen *EhaSM6* presenta la mayor expresión. La sobreexpresión del gen *EhaSM6* favorece la reparación del daño a la membrana plasmática y supervivencia de los trofozoítos ante el daño por moléculas formadoras de poros. En *E. histolytica* la sobreexpresión del gen *EhaSM6* en la cepa virulenta HM1 se ve reflejada en una mayor actividad de esfingomielinada acida secretada asociada con un incremento en las capacidades de lisis, fagocitosis y digestión de eritrocitos humanos, sugiriendo su participación como determinantes de virulencia. La sobreexpresión del mismo gen en cepas de baja virulencia (UG10 y G3) derivadas de la cepa virulencia HM1 con el mismo fondo genético, también presentó, una mayor actividad de aSMasa secretada y un incremento en la lisis, fagocitosis y digestión de los eritrocitos. Por lo que es de interés evaluar, si la sobreexpresión del gen *EhaSM6* en la cepa Rahman de baja virulencia, con diferente fondo genético, incrementa su virulencia *in vitro*. En el presente trabajo, se encontró que la sobreexpresión del gen *EhaSM6* en la cepa Rahman de baja virulencia, se reflejó en un incremento en los niveles de aSMasa secretada con respecto a su parental, pero sin alcanzar los niveles mostrados por la cepa virulenta HM1. La sobreexpresión de la aSMasa6 en la cepa avirulenta Rahman, incrementó su actividad hemolítica, así como la fagocitosis y la digestión de glóbulos rojos. Considerando toda la información obtenida, se propone que la aSMasa6 presenta una actividad dual al actuar como factor (actividad lítica) y determinante (reparación de membrana) de virulencia de *E. histolytica*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Amibiasis

La amibiasis intestinal es una parasitosis que afecta al humano y el agente etiológico de esta enfermedad es el protozooario *Entamoeba histolytica* Schudinn, 1903. De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) esta patología causa entre 40,000 y 100,000 muertes al año, siendo una de las principales causas de muerte por parasitosis alrededor del mundo (WHO, 1997; Haque, R., y col., 2003; Turkeltaub J. A., y col., 2015). La infección se encuentra relacionada a deficiencias sanitarias, donde priva el hacinamiento y el mal manejo de las aguas residuales y excretas, lo que favorece su transmisión (Martínez-Palomo y Espinosa-Cantellano, 1998). Mientras que los factores de riesgo en las naciones desarrolladas son la inmigración de personas infectadas de países en vías de desarrollo (Shirley, D. A. T., y col., 2019).

México se considera una zona endémica de amibiasis y constituye un problema de salud pública (Ximenéz, y col., 2013). En el 2021 se reportaron 113,195 casos, posicionándose en el 20° lugar dentro de las patologías con mayor prevalencia. Siendo los estados del sur (Chiapas, Oaxaca y Veracruz) los que reportaron un mayor número de casos (Dirección General de Epidemiología, 2021).

2.1.1 Diagnóstico

El diagnóstico de la infección por *E. histolytica* es uno de los objetivos más importantes en la clínica, debido a que es un importante paso para el manejo adecuado de pacientes infectados. Las técnicas para el diagnóstico de la infección van desde la detección de anticuerpos específicos de la amiba y antígenos en heces, hasta pruebas de diagnóstico molecular como la amplificación de DNA especie-específico mediante PCR convencional y PCR en tiempo real (qPCR)

(Fotedar, y col., 2007). A pesar de que existan estas técnicas, su identificación por microscopía en heces sigue siendo la prueba de detección más utilizada (Ali, I. K. M., 2015; Shirley, D. T., y col., 2018).

2.1.2 Tratamiento

Las manifestaciones clínicas de la infección amibiana pueden ser desde personas asintomáticas, hasta las que presentan síntomas incluyendo disentería y diseminación por vía sanguínea a otros órganos, siendo el absceso hepático amibiano la complicación intestinal más común (Sepúlveda y Manzo, 1986; Martínez-Palomo y Ruíz-Palacios, 1990). Actualmente no existe una vacuna para prevenir la amibiasis. El tratamiento se basa en la localización de los trofozoítos en la luz o pared intestinal o en tejidos extraintestinales. Otros factores por considerar son: la edad, severidad clínica, presencia de otros parásitos intestinales o condiciones mórbidas, etc (Botero y Restrepo, 1992). Nos referimos a condiciones mórbidas cuando dos o más enfermedades ocurren en la misma persona al mismo tiempo (NIH, 2023). La amibiasis invasiva se trata con 5- nitroimidazoles, que incluye el tinidazol y el metronidazol, siendo este último la droga de selección para el tratamiento tisular, sin embargo, puede generar efectos secundarios como náuseas, vómito, diarrea, entre otros (Dingsdag, S.A. y Huntet, N., 2018). En años recientes, se ha retomado medicamentos como la nitazoxanida para el tratamiento de la amibiasis invasiva con un nivel comparable al del metronidazol (Rossignol JF y col., 2006), así como también, se ha observado en el tratamiento con quinfamida (Ruiz y Guzmán, 1996). Además, la ultrasonografía que es usada para monitorear la regresión del absceso (Salles JM y col., 2003).

2.2 *Entamoeba histolytica*

E. histolytica es un parásito protozoario que se presenta en dos formas celulares, los quistes que son la forma infectiva y de resistencia (Figura 1A) y los trofozoítos,

que son la forma invasiva y vegetativa (Figura 1B). Los trofozoítos pueden variar de tamaño desde los 12 a 60 μm y más frecuentemente de los 15 a los 30 μm , son dinámicos y tiene una locomoción activa, debido a su ectoplasma que le permite formar pseudópodos. El trofozoítot se multiplica por fisión binaria y es muy sensible a los jugos gástricos y a los agentes externos. Su hábitat comprende la luz y pared del colon, especialmente en el ciego y recto del hospedero (Pumarola y col., 1999). Los trofozoítos carecen de las estructuras típicas presentes en los eucariotas superiores, como las mitocondrias, el aparato de Golgi y un retículo endoplásmico bien diferenciado (Ghosh y col., 1999).

El agente infectivo para humanos es un quiste tetranucleado que se libera por medio de las heces. Los quistes miden de 10 a 15 μm y se recubren por una pared de quitina de 125-150 nm de espesor, es una estructura bastante resistente a diversos factores como el jugo gástrico, calor, ácidos, proteasas del duodeno y bilis (Ravdin, 2000).

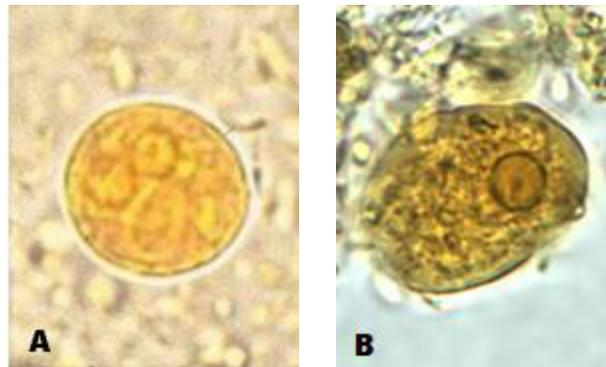


Figura 1. Forma celular de *E. histolytica*. A. Quistes (tinción con yodo, microscopio óptico de campo claro). B. Trofozoítot (tinción con yodo, microscopio óptico de campo claro) (Tomado de <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>).

2.2.1 Ciclo de vida de *E. histolytica*

El ciclo de vida se inicia con la ingesta de un quiste infeccioso en alimentos o en agua contaminada. La cubierta del quiste no es dañada por los jugos gástricos y pancreáticos, sólo reblandecida, esto permite su desenquistamiento en el intestino grueso, donde puede desarrollar la infección. Al romperse el quiste, el trofozoíto termina su proceso de división y da lugar a cuatro trofozoítos metaquísticos (Haque y col., 2003). Si el trofozoíto continúa avanzando por el colon, inicia su proceso de enquistación con la formación de un prequiste mononuclear, en el cual se inicia un proceso de división celular que da lugar a un quiste tetranuclear, en donde termina el proceso de formación de la pared del quiste y es expulsado con la materia fecal (Tanyuksel y Petri, 2003). Los trofozoítos que permanecen en el intestino grueso pueden permanecer en el lumen o invadir la mucosa intestinal y diseminarse a otros órganos, principalmente el hígado (Figura 2) (Martínez-Palomo, 1982).

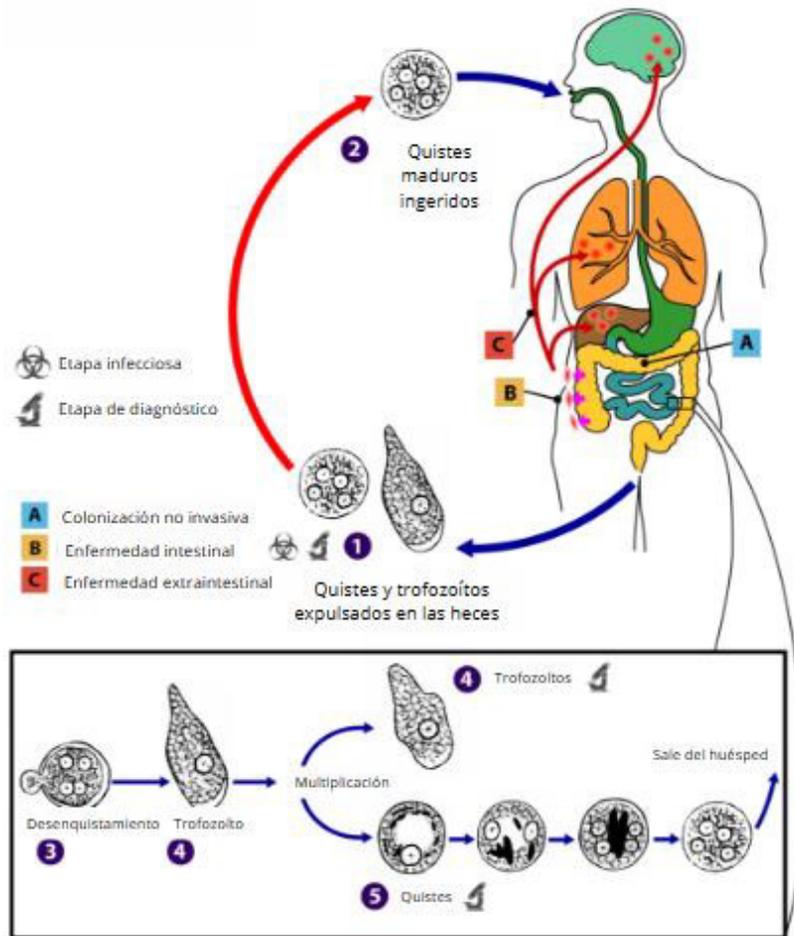


Figura 2. Ciclo de vida de *E. histolytica*. 1. Los quistes y trofozoítos se encuentran en las heces de las personas infectadas. 2. La infección por *E. histolytica* ocurre a través de la ingestión de quistes maduros provenientes de alimentos o agua contaminados. 3. El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado. 4. Los trofozoítos migran al intestino grueso y permanecen en la luz intestinal. Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria y forman quistes, ambos se transmiten por heces. 5. Los quistes pueden sobrevivir al ambiente externo (Tomado de <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>).

2.3 Factores de virulencia de *E. histolytica*

Los factores de virulencia son moléculas implicadas en el establecimiento de la patología y generalmente participan en el proceso de adhesión, colonización, invasión del tejido, evasión e inhibición de la respuesta del sistema inmune (Faust y Guillén, 2012).

Lectina Gal/GalNAc: La cual media la adhesión del parásito en la mucina, células epiteliales y bacterias, esto se debe a que la lectina de superficie Gal/GalNAc se une a los residuos de galactosa y N-acetilglucosamina (Frederick y Petri, 2005; Galván-Moroyoqui, J. M., y col., 2011). También se ha sugerido que se une a los componentes del complemento C8 y C9 evitando el ensamble del complejo de ataque a la membrana, evitando la lisis celular (Petri, 1996; Ventura-Juárez, J., y col., 2002; Singh, R. S., y col., 2016).

Amebaporos: Son proteínas que se involucran en la citotoxicidad debido a que son proteínas formadoras de poros, poseen 3 isoformas: A, B y C con diferente efectividad. Estas proteínas son capaces de lisar a una gran variedad de células diana (Andra y col., 2003).

Cisteín proteinasas: Hay 50 genes que codifican para proteínas de la familia de las cisteín proteinasas (CPs) en el genoma de *E. histolytica* (Tillack y col., 2007). La función de estas proteínas depende de su concentración y localización, pH y el ambiente del colon (Faust y Guillen, 2012; Nakada-Tsukui, y col., 2012; Faust, y col., 2015). Estas moléculas participan en la destrucción de capas celulares *in vitro*, además de tener la capacidad de degradar componentes de la matriz extracelular como la mucina, componente principal del colon (Moncada y col., 2003; Moncada y col., 2006). Están involucradas en la evasión de la respuesta inmune debido a que degradan inmunoglobulinas, componentes de la respuesta inmune humoral (Que y col., 2003; Macpherson y col., 2008; García-Nieto y col., 2008).

2.4 Determinantes de virulencia de *E. histolytica*

El término “determinantes de virulencia” describe a aquellas moléculas que están indirectamente involucradas en el proceso patogénico, las cuales pueden regular la expresión y localización de factores de virulencia, proteger al parásito durante el proceso infectivo, y que le proporcionan tolerancia al ambiente extracelular y/o confieren alta plasticidad metabólica favoreciendo su adaptación y supervivencia ante factores del hospedero (Anaya-Velázquez y Padilla-Vaca, 2011). Algunas de las moléculas que cumplen con esta función son las siguientes:

Rab GTPasas: Se cree que estas proteínas se encuentran involucradas en el tráfico vesicular, debido a que se les ha relacionado con la formación de vacuolas preflagocíticas, lisosomas, endosomas tempranos y tardíos, y transporte de factores de virulencia hacia diferentes compartimentos (Nakada-Tsukui y col., 2010; Fonseca-Rivas. 2018).

Peroxirredoxina: Son moléculas de superficie que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno y el peroxinitrito presentes en el medio. Ayudan a proteger al parásito del ataque oxidativo permitiendo así que el parásito sobreviva ante el ataque de células como macrófagos y neutrófilos (Bruchhaus y col., 1997; Olivos-García y col. 2016).

Lipofosfopéptidoglicano: Los complejos de lipofosfoglicano (GLP)-proteofosfoglicano (PPG) anclado por GPI, son una barrera física protectora de la respuesta inmune del hospedero. Se ha observado que cuando se reduce PPG en la superficie hay una disminución drástica en la supervivencia de los trofozoítos. (Campos- Rodríguez, R. y Jarillo-Luna, A. 2005).

Esfingomielinasas: Las esfingomielinasas ácidas (aSMasas) secretadas por *E. histolytica* participan en el proceso de reparación del daño a la membrana plasmática del parásito ocasionado por diferentes factores del hospedero tales como los péptidos antimicrobianos y complemento (Ramírez-Montiel y col., 2019).

2.5 Esfingomielinasas

Las SMasas son enzimas que hidrolizan a la esfingomielina (SM) presente en la cara externa de la membrana plasmática generando ceramida. Estas enzimas tienen un pH óptimo de 5 (aSMasas) o 7 (nSMasas). Diversos estímulos por estrés activan a las SMasas involucrándolas en la transducción de señales vía ceramida dando lugar a eventos biológicos como: proliferación celular, apoptosis, envejecimiento celular, etc. (Hannun y Obeid, 2008; Jenkins, R. W., y col., 2009; Nikolova-Karakashian, M. N. y Rozenova, K. A., 2010).

En algunas bacterias, las SMasas son consideradas factores de virulencia que contribuyen al proceso de infección de la célula hospedera al hidrolizar los lípidos de la membrana y provocar la lisis celular (Vargas-Villarreal, 2003; Oda, M., y col., 2010; Flores-Díaz y col., 2016).

Se ha reportado que las aSMasas en células de mamíferos promueven la endocitosis y la eliminación de lesiones en la membrana plasmática (Tam y col., 2010).

2.5.1 Esfingomielinasas neutras en *E. histolytica*

El genoma de *E. histolytica* posee tres genes que codifican para nSMasas, los cuales se expresan y produce proteínas con actividad enzimática. La función de las nSMasas en *E. histolytica* se ha evaluado en cepas que sobreexpresan los genes de estas enzimas. Se ha observado que la nSMasa3 está asociada con la muerte y lisis de células blanco, mientras que la nSMasa1 y nSMasas2 con la destrucción de monocapas celulares. Estas proteínas están asociadas principalmente a la membrana plasmática, lo que sugiere que el efecto citotóxico y citolítico es dependiente del contacto (Figura 3) (Urquieta-Ramírez, y col., 2018).

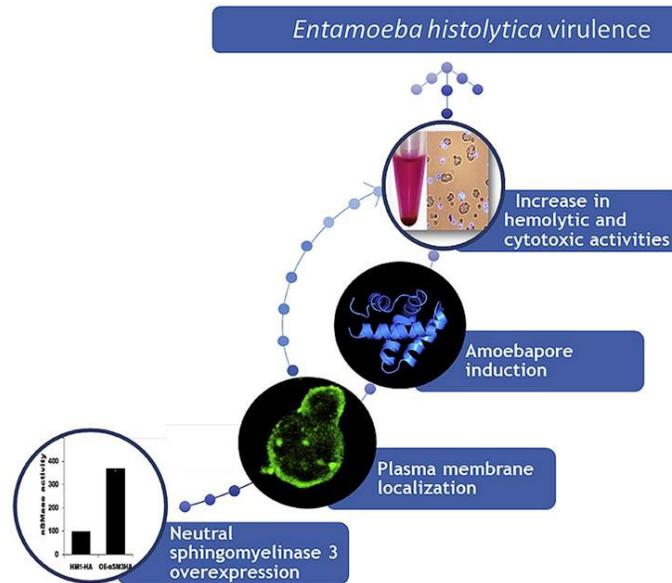


Figura 3. Gráfica de la contribución de las nSMasas en la virulencia *in vitro* de *E. histolytica* (Tomado de Urquieta-Ramírez y col.,2018).

2.5.2 Esfingomielinasas ácidas en *E. histolytica*

El genoma de *E. histolytica* ha revelado genes relacionados con el metabolismo de fosfolípidos (Loftus y col., 2005) y está reportado que las amibas sintetizan esfingolípidos como esfingomielina, ceramida-inositol y ceramida etanolamida fosfato (Aley y col., 1980; McLaughlin y Aley, 1985). Esta última está presente en la membrana plasmática de las amibas como: *Entamoeba invadens* y *Entamoeba dispar*, pero poco común en eucariotas superiores (McLaughlin y Meerovitch, 1975). Al igual que en células de mamífero, *E. histolytica* presenta en su membrana unas estructuras ricas en esfingomielina, llamadas balsas lipídicas que están asociadas con la adhesión de células blanco y pinocitosis (Laughlin y col., 2004; Mittal y col., 2008) y también son asociadas con algunos procesos de virulencia (Goldston y col., 2012). Se cree que una alta concentración de ceramida etanolamida fosfato podría estar involucrada en la plasticidad y estabilidad de las membranas de los trofozoítos, ya que interactúan con muchas proteínas a través de puentes de hidrógeno (Cerbón y Flores, 1981). La ceramida etanolamida fosfato también es resistente a la hidrólisis

y protege a los trofozoítos de sus propias proteasas y de las condiciones adversas durante el proceso de invasión tisular (Cerbón y Flores, 1981).

Recientemente, el análisis del genoma de *E. histolytica* reveló la presencia de seis genes que codifican para aSMasas, los cuales se transcriben activamente en el parásito (Mendoza-Macías y col., 2010). Detectando su actividad en sobrenadantes, y cuya secreción es estimulada por agentes que dañan la membrana plasmática amibiana (Estreptolisina y Saponina), sugiriendo que las amibas, al igual que las células de mamífero cuentan con un mecanismo de reparación de daño a la membrana plasmática mediado por aSMasas (Ramírez-Montiel, 2015).

Por otro lado, destaca el gen *EhaSM6* que es el que más se transcribe en condiciones de crecimiento basal. Se ha reportado que el daño de los trofozoítos de *E. histolytica* con una concentración subletal de la toxina estreptolisina O (SLO), induce la entrada de Ca^{2+} , lo que favorece la migración de los lisosomas a la periferia de la célula, se fusionan con la membrana y la liberación de las aSMasas al exterior de la célula. Las aSMasas secretadas producen ceramida favoreciendo la internalización de la lesión para degradación en el compartimento lisosomal. Los poros generados por el daño de membrana plasmática son rápidamente bloqueados por estructuras tipo parches formados por lisosomas y endosomas que impiden la lisis del trofozoíto e inmediatamente comienzan a internalizar la lesión. La sobreexpresión de *EhaSM6* favorece la reparación de la lesión y la supervivencia de los trofozoítos de *E. histolytica* (Figura 4) (Ramírez-Montiel y col., 2019).

El gen *EhaSM6* incrementa su expresión cuando las amibas se exponen a SLO (Ramírez-Montiel y col., 2019), mientras que el *EhaSM4* aumenta su expresión en respuesta al estrés oxidativo (Cervantes-Velázquez, 2020). Adicionalmente, se ha reportado que los niveles de expresión están asociados con la virulencia de las cepas amibianas (Rivera-Cuéllar, 2019). Además de su función como determinante de virulencia, la aSMasa6 del parásito ha sido implicada como un factor de virulencia

por favorecer la actividad hemolítica en la cepa virulenta HM1 (Ramírez-Montiel F. 2020).

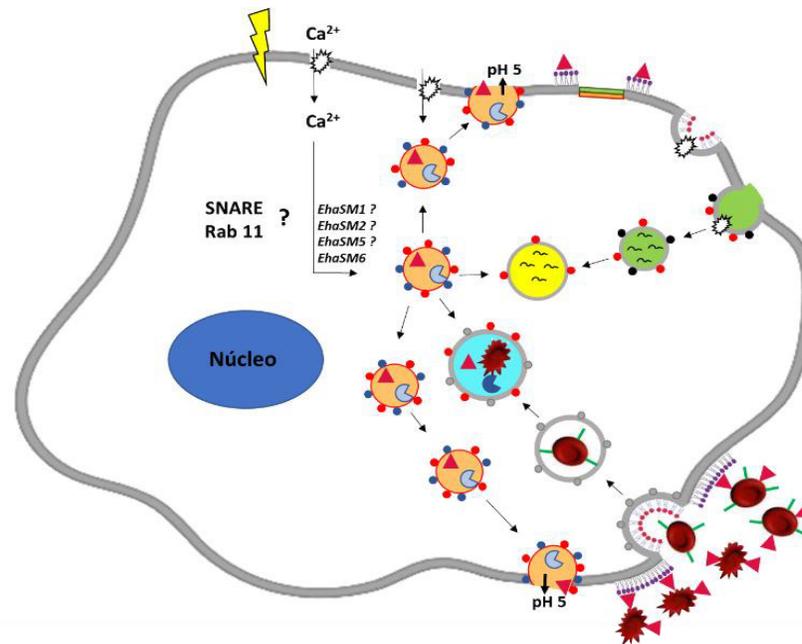


Figura 4. Mecanismo de reparación de daños a la membrana plasmática mediada por aSMasa6 secretada en *E. histolytica* y su implicación en la virulencia. El daño ocasionado en la membrana plasmática de *E. histolytica* permite la entrada de Ca^{2+} extracelular en el citoplasma. La elevación en la concentración intracelular de Ca^{2+} desencadena la exocitosis de los lisosomas los cuales vierten su contenido al espacio extracelular, entre ellos la aSMasa6. La aSMasa6 hidroliza la esfingomielina de la membrana en ceramida, lo que favorece la formación de endosomas que internalizan las lesiones. Así mismo, la aSMasa6 también está relacionada con la virulencia, ya que hidroliza a pH ácido la SM de los eritrocitos alterando su membrana plasmática causando lisis celular, o exponiendo sitios de fosfatidilserina, la cual es reconocida por la ameba para su fagocitosis, sucesivo a la internalización participa en la digestión (Ramírez-Montiel F. 2020).

3. JUSTIFICACIÓN

E. histolytica es un agente infeccioso que posee actividad de esfingomielinasa ácida, la cual hidroliza la esfingomielina presente en las membranas biológicas. Se ha descrito que esta enzima participa en el proceso de reparación del daño a la membrana plasmática del parásito, actuando como un determinante de virulencia. Por otro lado, las aSMasas también están involucradas en la actividad hemolítica de las amibas a pH ácido, actuando como un factor de virulencia. Lo anterior se ha realizado en la cepa virulenta HM-1, por lo que es de interés determinar si la sobreexpresión del gen de la aSMasa6 en una cepa avirulenta (Rahman) puede revertir su fenotipo.

4. HIPÓTESIS

La sobreexpresión del gen *EhaSM6* en la cepa avirulenta Rahman de *Entamoeba histolytica* incrementa los niveles de aSMasa secretada y las actividades hemolítica y fagocítica en esta cepa.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la sobreexpresión de la aSMasa6 sobre las actividades hemolítica y fagocítica de la cepa avirulenta Rahman de *E. histolytica*.

5.2 Objetivos específicos

- I. Determinación de la actividad de esfingomielinasa ácida secretada en la cepa Rahman sobreexpresante de la aSMasa6.
- II. Evaluar el efecto de la sobreexpresión del gen *EhaSM6* en la cepa Rahman sobre las actividades lítica, fagocítica y de digestión de eritrocitos.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cepas de *E. histolytica*.

Se utilizó la cepa no virulenta Rahman de *E. histolytica* y su sobreexpresante del gen *EhaSM6*, obtenida por nuestro grupo de investigación en el Laboratorio de Patobiología Molecular de Protozoarios Parásitos. Como referencia se utilizó la cepa virulenta HM-1:IMSS y su sobreexpresante del mismo gen. Todas las cepas se cultivaron en condiciones axénicas en el medio TYI-S-33.

6.2 Determinación de la actividad de aSMasa secretada de *E. histolytica*

Los trofozoítos amibianos se cosecharon, y ajustaron a una concentración final de 3×10^5 /pozo y se aforó cada uno de los pozos a un volumen final de 2 mL. Se incubaron a 37°C durante 2 h para favorecer su adhesión a la placa. Se lavaron las amibas y se incubaron en medio D-MEM con Ca^{2+} durante 30 min. Se tomaron los sobrenadantes y se centrifugaron a 13 000 rpm por 30 segundos. La actividad de aSMasa se midió utilizando un kit colorimétrico para evaluar la actividad secretada (Sigma-Aldrich), según las indicaciones del fabricante. La absorbancia de la sonda colorimétrica a 655 nm proporcionó información sobre la actividad de la aSMasa.

6.3 Actividad hemolítica de amibas completas

Para determinar la actividad hemolítica de amibas completas, los trofozoítos de *E. histolytica* se lavaron con el amortiguador PIPES-Tris y se ajustaron a una concentración 1×10^6 amibas/mL. Por otro lado, los eritrocitos humanos conservados en Alserver se lavaron y ajustaron a una concentración de 1×10^9 eritrocitos/mL. A

cada tubo de 1.5 mL, se adicionaron 250 μ L de la suspensión amibiana, 500 μ L de eritrocitos y 250 μ L de amortiguador PIPES-Tris. La suspensión de trofozoítos y eritrocitos se centrifugó a 13 500 rpm por 30 segundos para formar una pastilla y se incubaron a 37°C por 90 min y posteriormente se incubaron por 10 min a 4°C. Se centrifugaron a 13 500 rpm por 30 segundos y se tomaron 200 μ L del sobrenadante y se leyó a una absorbancia de 570 nm. El uso de eritrocitos humanos fue avalado por el comité de bioética con la clave CEPIUG-P30-2023.

6.4 Eritrofagocitosis

Para determinar la capacidad de las amibas para fagocitar eritrocitos, los trofozoítos de *E. histolytica* se ajustaron con medio TYI-33 sin suero a una concentración final de 1×10^6 amibas/mL y los eritrocitos humanos a una concentración 1×10^8 eritrocitos/mL. Las amibas y los eritrocitos se incubaron por separado durante 10 min a 37°C. En un tubo de 1.5 ml se interaccionaron en una proporción de 1:100 (amiba:eritrocito), se agregaron 100 μ L de amibas y 100 μ L de eritrocitos, y se incubaron a 37°C por 5, 10 y 15 min, posteriormente se adicionó agua fría para lisar los eritrocitos no fagocitados. Las amibas se centrifugaron y se lavaron con PBS-A, consecutivamente se fijaron con glutaraldehído al 5% en PBS-A y se incubó durante 30 min. Los eritrocitos fagocitados se visualizaron mediante la tinción de Novikoff, por lo cual se incubaron 30 min en oscuridad y se conservaron en PBS-A/glicerol (1/1). Por último, el conteo de eritrocitos fagocitados por amiba se realizó mediante microscopía de campo claro (Mora-Galindo y col., 1997; Lozano-Mendoza, 2015).

6.5 Digestión de eritrocitos

Para determinar la capacidad de los trofozoítos de *E. histolytica* para digerir a los eritrocitos fagocitados se ajustaron a una concentración final de 1.5×10^6 amibas/mL y los eritrocitos humanos a una concentración 1×10^8 eritrocitos/mL. Las amibas y los eritrocitos se incubaron por separado durante 10 min a 37°C , se mezclaron en una proporción de 1:100 y se incubaron durante 30 min. Para lisar los eritrocitos no fagocitados se adicionó agua fría, y las amibas se lavaron con PBS-A. Todo el proceso se realiza bajo condiciones de esterilidad. Las muestras se resuspendieron e inocularon en tubos con medio TYI-S-33 en esterilidad a 37°C durante 0, 3, 6 y 12 horas. Las amibas se cosecharon y la pastilla se resuspendió en PBS-A. Se le adicionó glutaraldehído al 5% y se incubó durante 30 min. Los eritrocitos remanentes se tiñeron mediante la tinción de Novikoff y se conservaron en PBS-A/glicerol (1/1). Finalmente, el conteo de eritrocitos fagocitados remanentes se realizó mediante microscopía de campo claro (Mora-Galindo y col., 1997; Lozano-Mendoza, 2015).

7. RESULTADOS

7.1 Actividad secretada de aSMasa en la cepa avirulenta Rahman de *E. histolytica* que sobreexpresa el gen *EhaSM6*.

Se determinó la actividad secretada de aSMasa de la cepa avirulenta Rahman que sobreexpresa el gen *EhaSM6* (Rh-SM6HA), con respecto a la cepa parental transflectada con el plásmido vacío (Rh-HA). Adicionalmente se usó como referencia a la cepa virulenta HM1-HA que se ha reportado que presenta niveles elevados de actividad secretada de aSMasa con respecto a la cepa avirulenta Rahman. En la figura 5, se muestra que la cepa HM1-HA presenta 4.6 veces mayor actividad de aSMasa secretada que la cepa Rh-HA, y la sobreexpresión del gen *EhaSM6* en la cepa avirulenta (Rh-SM6HA) incrementó 2.0 veces la actividad secretada de aSMasa con respecto a su parental. La sobreexpresión del gen *EhaSM6* en una cepa avirulenta se ve reflejado en una mayor actividad secretada de aSMasa.

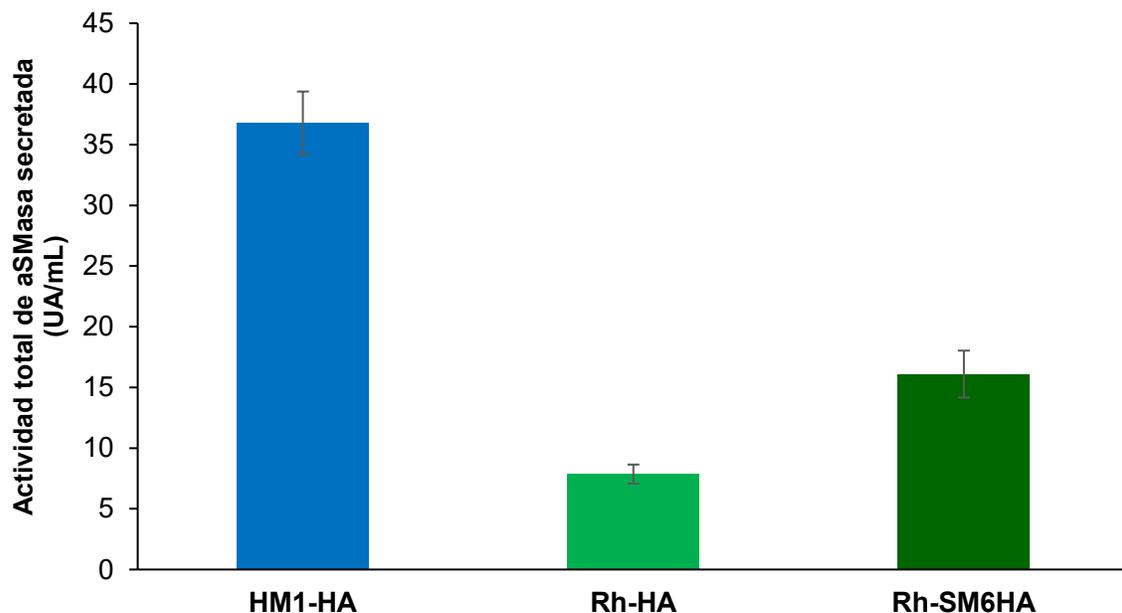


Figura 5. Actividad secretada de aSMasa de la cepa avirulenta Rh de *E. histolytica* que sobreexpresa el gen *EhaSM6*. La actividad secretada de aSMasa de las cepas HM1-HA, Rh-HA y Rh-SM6HA se determinó en los sobrenadantes después de 30 min de incubación a 37°C empleando un kit colorimétrico. Las barras presentan la desviación estándar. Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes por triplicado.

7.2 Actividad hemolítica de los trofozoítos de la cepa Rahman de *E. histolytica* que sobreexpresan el gen *EhaSM6*.

Para evaluar si la secreción de la actividad de aSMasa está relacionada con la actividad hemolítica en una cepa avirulenta de *E. histolytica*, se incubaron los trofozoítos sobreexpresantes del gen *EhaSM6* (Rh-SM6HA) con eritrocitos humanos en una proporción 1:100 y se determinó la hemoglobina liberada. Para favorecer la interacción y que se genere un gradiente de pH ácido, se centrifugaron las amibas y los eritrocitos, y la pastilla resultante se incubó a 37°C. Se empleó la cepa virulenta HM1-HA como referencia. La cepa virulenta HM1-HA presentó mayor actividad hemolítica (3.7 veces) que la cepa avirulenta Rahman. La cepa sobreexpresante (Rh-SM6HA) incrementó 2.2 veces su capacidad de lisar eritrocitos con respecto a la cepa parental (Rh-HA), sin embargo, su actividad hemolítica fue menor que la de la cepa virulenta HM1-HA (Figura 6). El incremento de la actividad hemolítica en la cepa Rh-SM6HA está relacionado con la mayor actividad de aSMasa secretada que presenta la cepa sobreexpresante.

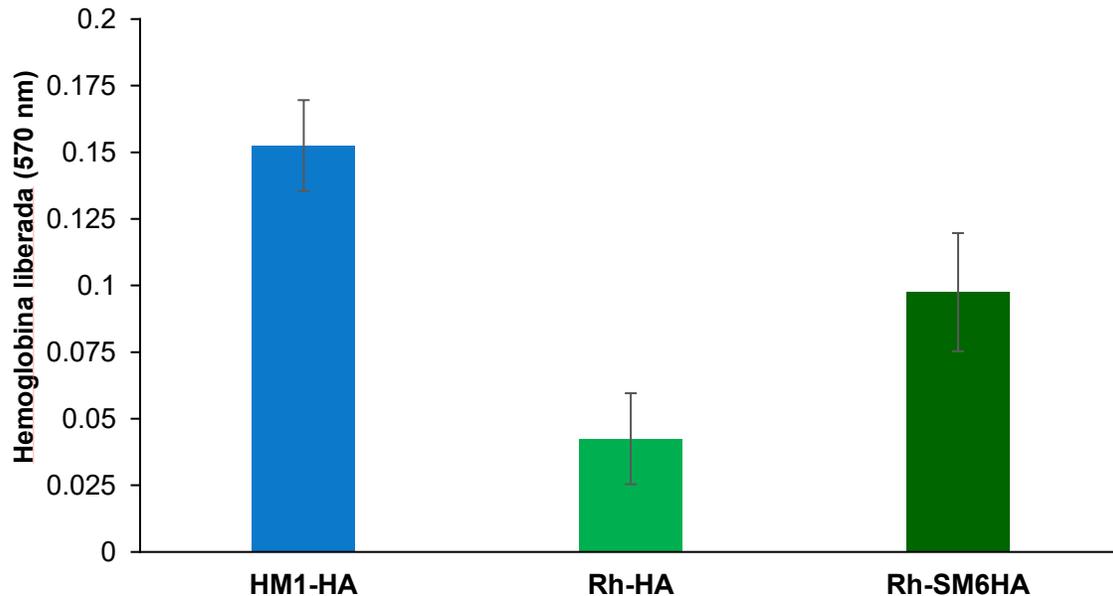


Figura 6. Actividad hemolítica de los trofozoítos de la cepa Rahman de *E. histolytica* que sobreexpresa el gen *EhaSM6*. Trofozoítos de las cepas HM1-HA, Rh-HA y Rh-SM6HA interaccionaron con glóbulos rojos humanos empaquetados en una proporción 1:100 durante 90 min a 37°C. La actividad hemolítica se determinó cuantificando la hemoglobina liberada a 570 nm. Las barras presentan la desviación estándar. Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes por triplicado.

7.3 Eritrofagocitosis de la cepa avirulenta Rahman de *E. histolytica* que sobreexpresan el gen *EhaSM6*.

Para determinar si la actividad secretada está relacionada con la capacidad para fagocitar eritrocitos humanos, se utilizó la cepa avirulenta Rahman transfectada con el gen *EhaSM6*. Se determinó la capacidad de los trofozoítos sobreexpresantes (Rh-SM6HA) para fagocitar eritrocitos humanos en una proporción 1:100. La eritrofagocitosis se determinó cuantificando los eritrocitos fagocitados a los 5, 10 y 15 min de interacción 37°C. Se empleó la cepa virulenta HM1-HA como referencia. En la figura 7, se muestra que la cepa virulenta HM1-HA fagocitó más eritrocitos que la cepa avirulenta Rahman. Mientras que la cepa sobreexpresante (Rh-SM6HA)

incrementó su capacidad para fagocitar con respecto a su parental (Rh-HA), sin embargo, su actividad fagocítica fue menor que la cepa virulenta (HM1-HA). Como se muestra a los 15 min, la cepa de referencia HM1-HA fagocitó un promedio de 7 eritrocitos, mientras que la cepa Rh-HA fagocitó un promedio de 1.9 eritrocitos, lo que representa 3.6 veces más que la cepa avirulenta (Rh-HA). La cepa sobreexpresante (Rh-SM6HA) fagocitó un promedio de 3.3 eritrocitos, lo que representa un incremento de 1.7 veces su capacidad fagocítica con respecto a su parental (Rh-HA). Esto sugiere que el incremento en la capacidad para fagocitar eritrocitos de la cepa Rh-SM6HA está relacionada con una mayor actividad de aSMasa de la cepa sobreexpresante.

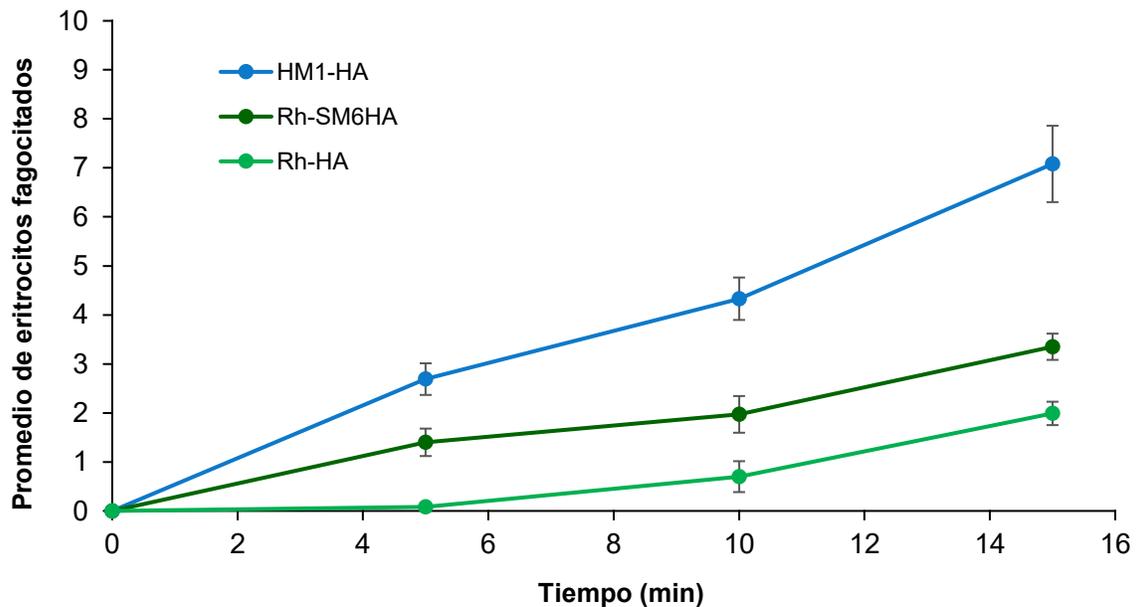


Figura 7. Eritrofagocitosis de las amibas de la cepa avirulenta Rahman de *E. histolytica* que sobreexpresa el gen *EhaSM6*. Los trofozoítos de las cepas HM1-HA, RH-HA y Rh-SM6HA se pusieron en contacto con eritrocitos humanos durante 0, 5, 10 y 15 min a 37°C. Se cuantificó el número de eritrocitos fagocitados en 100 amibas y se contaron mediante microscopía de campo claro. Las barras presentan la desviación estándar. Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes por triplicado.

7.4 Digestión de eritrocitos de la cepa Rahman de *E. histolytica* sobreexpresante del gen *EhaSM6*.

Para evaluar si la actividad de aSMasa está implicada en la capacidad para digerir glóbulos rojos humanos en una cepa avirulenta de *E. histolytica* se evaluó la capacidad para digerir eritrocitos humanos de las amibas sobreexpresantes (Rh-SM6HA) en una proporción 1:100. La digestión se determinó cuantificando el número de eritrocitos sin digerir a las 3, 6 y 12 h de incubación, después de una interacción inicial de 30 min a 37°C de fagocitosis. Es importante mencionar que, pasado el tiempo de interacción inicial se consideró como el 100% el número inicial de eritrocitos ingeridos por cepa. La cepa virulenta HM1-HA que se empleó como referencia, mostró una mayor velocidad de digestión que la cepa no virulenta Rahman. Mientras que la cepa sobreexpresante Rh-SM6HA digirió a mayor velocidad los eritrocitos en comparación con su cepa parental Rh-HA. A las 3 horas la cepa virulenta HM1-HA presentó 73.2% de eritrocitos remanentes, en comparación con el 92.9% de la cepa avirulenta Rh-HA. La cepa sobreexpresante presentó 71.6% de eritrocitos remanentes, con respecto a la cepa parental (Rh-HA). A las 6 horas, la cepa HM1-HA presentó 40.7% de eritrocitos remanentes, la cepa Rh-HA de 65.3% y la cepa sobreexpresante Rh-SM6HA de 47%. A las 12 horas, la cepa HM1-HA presentó 27% de eritrocitos sin digerir, la cepa Rh-HA de 55.2% y la cepa sobreexpresante Rh-SM6HA de 35.5% (Figura 8). Los datos sugieren que el incremento de la digestión de eritrocitos está dado por la mayor actividad de aSMasa que presenta la cepa sobreexpresante Rh-SM6HA.

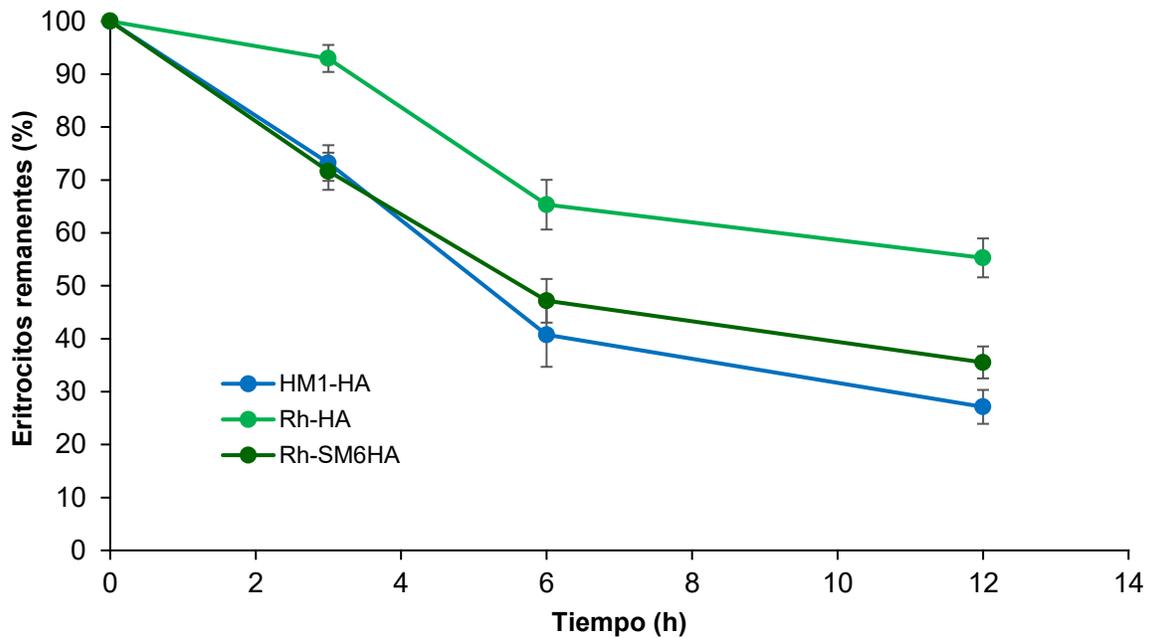


Figura 8. Digestión de eritrocitos de la cepa Rahman de *E. histolytica* que sobreexpresa el gen *EhaSM6*. La capacidad para digerir eritrocitos humanos de las cepas HM1-HA, Rh-HA y Rh-SM6HA, fue evaluado por el porcentaje de eritrocitos remanentes a las 0, 3, 6 y 12 h, después de una interacción inicial de 30 min a 37°C mediante microscopía de campo claro. Las barras presentan la desviación estándar. Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes por triplicado.

8. DISCUSIÓN

Las SMasas son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en células eucariotas como en procariotas cuya función es hidrolizar la esfingomielina presente en las membranas biológicas para obtener ceramida y fosforilcolina (J. López, 2009). En las células de mamífero, las SMasas son importantes en la regulación de diversos procesos celulares tales como respuesta a estrés, diferenciación, apoptosis y crecimiento celular (Hannun y Obeid, 2008). En particular, las aSMasas han sido involucradas en la reparación de daños a la membrana plasmática (Tam, C., y col., 2010). En *E. histolytica*, se ha descrito que la sobreexpresión del gen *EhaSM6* favorece la reparación de la membrana plasmática y supervivencia de los trofozoítos ante el daño por moléculas formadoras de poros (Ramírez-Montiel y col., 2019), mientras que la sobreexpresión del gen *EhaSM4* favorece la supervivencia de los trofozoítos cuando son expuestos a peróxido de hidrógeno o al choque térmico (Cervantes-Velázquez, 2020). La reparación del daño a la membrana plasmática de *E. histolytica* mediada por aSMasas permite clasificar a esta actividad como un determinante de virulencia debido a que protege al parásito durante el proceso infectivo, y le proporciona tolerancia al ambiente extracelular ocasionado por diferentes factores de hospedero tales como péptidos antimicrobianos, complemento y estrés oxidativo (Ramírez-Montiel y col., 2019).

Las SMasas bacterianas presentan actividad hemolítica hidrolizando la esfingomielina de la membrana de los eritrocitos (Oda y col., 2010; Flores-Díaz y col., 2016). En *E. histolytica* la sobreexpresión del gen *EhaSM6* en la cepa virulenta HM1 se ve reflejada en una mayor actividad secretada de aSMasa asociada con un incremento de la capacidad de lisis, fagocitosis y digestión de eritrocitos humanos por parte del parásito, sugiriendo su participación como un factor de virulencia (Ramírez-Montiel F, 2020). La sobreexpresión del mismo gen en cepas de baja virulencia (UG10 y G3) derivadas de la cepa virulenta HM1 con el mismo fondo

genético se ve reflejada, también, en una mayor actividad secretada de aSMasa y en un incremento en la lisis, fagocitosis y digestión de los eritrocitos, aunque el incremento de su virulencia *in vitro* es menor en comparación con la cepa parental virulenta HM1 (Rivera-Cuéllar, 2019).

Para corroborar su participación como un factor de virulencia, en el presente trabajo se evaluó la actividad de aSMasa y la virulencia en una cepa con diferente fondo genético. La cepa Rahman es una cepa no-patógena que fue aislada originalmente en Inglaterra en 1973 de un paciente asintomático (Davis y col., 2006), mientras que la cepa HM1 fue aislada en México de un paciente sintomático (Diamond y col., 1978). A diferencia de la cepa HM1, Rahman no forma abscesos hepáticos en modelos animales, presenta actividad citotóxica reducida sobre células epiteliales *in vitro* y presenta una baja eritrofagocitosis (Davis y col., 2006).

La sobreexpresión de genes en *E. histolytica* es una herramienta valiosa para determinar si un gen de interés tiene impacto en la virulencia del parásito (Meyer y col., 2016; Urquieta-Ramírez y col., 2018; Ramírez-Montiel y col., 2019), por lo que se empleó la cepa avirulenta Rahman de *E. histolytica* que sobreexpresa el gen *EhaSM6* obtenida en el grupo de trabajo, para determinar la participación de la actividad de aSMasa secretada en la virulencia *in vitro*. La cepa sobreexpresante Rh-SM6HA incremento 6.5 veces el nivel del transcrito en comparación con la cepa parental (Rahman) (Ramírez-Montiel F, 2020). El incremento en la cepa sobreexpresante está en el intervalo que se ha descrito para amibas sobreexpresantes de diferentes genes (Matthiesen y col., 2013; Meyer y col., 2016; Urquieta-Ramírez y col., 2018). La sobreexpresión de este gen en la cepa Rahman mostró un incremento de la actividad secretada aproximadamente dos veces en relación con la cepa parental, incremento similar a lo reportado para las cepas G3 y UG10 que sobreexpresan el mismo gen, pero que tienen diferente virulencia (Ramírez-Montiel, 2015; Rivera-Cuellar, 2019).

La actividad hemolítica de la aSMasa secretada en la cepa sobreexpresante Rh-SM6HA se realizó a pH neutro, donde la aSMasa no presenta actividad. Sin embargo, se reportó que, en una pastilla celular de trofozoítos, la secreción de la aSMasa, al estar en lisosomas, genera su propio microambiente ácido para su actividad enzimática y para su actividad hemolítica (Ramírez-Montiel y col., 2019; Ramírez-Montiel, 2020). Los resultados sugieren que la aSMasa6 en la cepa Rahman participa en la actividad hemolítica, independientemente del fondo genético y de la virulencia de la cepa de *E. histolytica*.

La fagocitosis es una de las principales funciones celulares que determina la virulencia de *E. histolytica* (Orozco y col., 1983). En el lumen intestinal las amibas pueden fagocitar bacterias, eritrocitos y desechos celulares que sirven como nutrientes. Las amibas al ser activamente fagocíticas de este tipo de células se han correlacionado los procesos de endocitosis con la virulencia del parásito (Orozco y col., 1983). El tratamiento con aSMasa provoca la formación de la ceramida en eritrocitos e induce la exposición de la fosfatidilserina (Lang y col., 2010), la cual actúa como una señal de fagocitosis (Pomorski y col., 2006), lo que desencadena la reorganización del citoesqueleto y la formación de un fagosoma por invaginación de membrana (Brown, 1995). Por ejemplo, se ha reportado que *E. dispar* promueve una menor exposición de la fosfatidilserina en comparación a la cepa HM1, lo cual se ve reflejado en una disminución de la fagocitosis de eritrocitos (Boettner y col., 2005). Por lo que se sugiere que a pesar del déficit de fagocitosis que presenta la cepa Rh-HA, al sobreexpresar el gen que codifica para la aSMasa6 se podría favorecer el proceso de eritrofagocitosis

Una consecuencia de la fagocitosis es la digestión de los compuestos internalizados en el fagolisosoma amibiano (Mora-Galindo y col., 2004; Okada y col., 2005). Luego de la internalización y formación de la fagolisosoma, el eritrocito podría ser degradado por proteasas ácidas (Vieira y col., 2002; Kinchen y Ravichandran, 2008; Fairn y Grinstein, 2012) y por la aSMasa (Ramírez-Montiel, 2020). De manera que, la sobreexpresión del gen *EhaSM6* pudiera estar contribuyendo la digestión de los

eritrocitos en las amibas a una mayor velocidad independiente del fondo genético. No obstante, en las cepas de diferente fondo genético podrían estar implicadas otras moléculas en el proceso de digestión.

La cepa sobreexpresante Rahman mostró un incrementó de la actividad secretada de aSMasa, como se comentó anteriormente, esto se vio reflejado en su capacidad de lisar, fagocitar y digerir eritrocitos, mientras que dichas características en la cepa parental se presentan en niveles bajos (Davis y col., 2006). Los antecedentes directos y los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren fuertemente que la aSMasa6 es un factor de virulencia *in vitro* de *E. histolytica*.

Considerando toda la información obtenida en el grupo de investigación, incluyendo los resultados del presente trabajo, la aSMasa6 presenta una actividad dual, actuando como factor (actividad lítica) y determinante (reparación de membrana) de virulencia de *E. histolytica*.

9. CONCLUSIONES

- ☞ La sobreexpresión del gen que codifica para la aSMasa6 incrementa la actividad secretada de aSMasa, independientemente del fondo genético y de la virulencia de la cepa de *E. histolytica*.

- ☞ Existe una correlación entre la actividad de aSMasa secretada y la virulencia de las cepas de *E. histolytica*.

- ☞ La sobreexpresión del gen *EhaSM6* en la cepa Rahman de diferente fondo genético, incrementó la actividad hemolítica, fagocitosis y digestión de eritrocitos, sugiriendo su participación como factor de virulencia.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar el proceso de exocitosis de lisosomas, formación de endosomas y viabilidad de la cepa Rahman en presencia de diferentes agentes perturbadores de la membrana plasmática.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión del gen que codifica para la aSMasa6 sobre la reparación del daño a la membrana plasmática en la cepa Rahman de *E. histolytica*.

11. BIBLIOGRAFÍA

Aley, S. B., Scott, W. A, Cohn, Z. A. (1980). Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 152, **391–404**.

Ali, IKM. (2015). Intestinal amebae. *Clinics in laboratory medicine.* **35, 393–422**.

Anaya-Velázquez, F., Padilla-Vaca, F. (2011). Virulence of *Entamoeba histolytica*: a challenge for human health research. *Future Microbiol* **6, 255-258**.

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

Boettner, D. R., Huston, C. D., Sullivan, J. A., Petri, W. A. (2005). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* utilize externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of erythrocytes. *Infect. Immun.* **73 (6), 3422-3430**.

Botero, D. A., & Restrepo, M. (1992). Parasitosis humana. Editorial Presencia Ltda, Bogotá, Colombia. **418 pp**.

Brown, E. J. (1995). Phagocytosis. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology,* **17(2), 109–117**.

Bruchhaus, I., Richter, S., Tannich, E. (1997). Removal of hydrogen peroxide by the 29 kDa protein of *Entamoeba histolytica*. *Biochemical Journal,* **326, 785–789**.

Campos-Rodríguez, R., Jarillo-Luna, A. (2005). The pathogenicity of *Entamoeba histolytica* is related to the capacity of evading innate immunity. *Parasite Immunology,* **27, 1–8**.

Cerbón, J., Flores, J. (1981). Phospholipid composition and turnover of pathogenic amebas. *Comp. Biochem. Physiol. B* **69, 487–492**.

Cervantes-Velázquez, Lizbeth Karina. (2020). Participación del gen *EhaSM4* en la respuesta al peróxido de hidrógeno o choque térmico en *Entamoeba histolytica*. Tesis de Maestría, División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato.

Davis, P. H., Zhang, X., Guo, J., Townsend, R. R., & Stanley, S. L. (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(6)**, 1523-1532.

Diamond, L. S., Harlow, D. R., Cunnick, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **72:431–432**.

Dingsdag, S. A., Hunter, N. (2018). Metronidazole: an update on metabolism, structure-cytotoxicity and resistance mechanisms. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. **73**, 265–279.

Fairn, G. D., & Grinstein, S. (2012). How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends in immunology*, **33(8)**, 397–405.

Faust, D. M., & Guillen, N. (2012). Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes and Infection*, **14(15)**, 1428-1441.

Faust, D. M., & Guillen, N. (2015). Cell-Surface molecules as virulence determinants in *Entamoeba histolytica*. Amebiasis. *Springer Japan*. (pp. 243-262).

Flores-Díaz, M., Monturiol-Gross, L., Naylor, C., Alape-Girón, A., Flieger, A. (2016). Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **80:597–628**.

Fonseca-Rivas, Karen Alejandra. (2018). Análisis de la sobreexpresión del gen *ehRab8B* sin intrón en *Entamoeba histolytica* y su efecto sobre la virulencia *in vitro*".

Tesis de Maestría. Universidad de Guanajuato. División de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Biología.

Fotedar, R., Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J., & Harkness, J (2007). Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clinical Microbiology Reviews*. **20(3)**, 511-532.

Frederick, J. R, Petri, Jr. WA. (2005). Roles for the galactose-/N-acetylgalactosamine- binding lectin of *Entamoeba* in parasite virulence and differentiation. *Glycobiology*. **15**, 53R-59R.

Galván-Moroyoqui, J. M., del Carmen Domínguez-Robles, M., Meza, I. (2011). Pathogenic bacteria prime the induction of Toll-like receptor signalling in human colonic cells by the Gal/GalNAc lectin Carbohydrate Recognition Domain of *Entamoeba histolytica*. *International journal for parasitology*. **41**, 1101–1112.

García-Nieto, R. M., Rico-Mata, R., Arias-Negrete, S., Avila, E. E. (2008). Degradation of human secretory IgA1 and IgA2 by *Entamoeba histolytica* surface-associated proteolytic activity. *Parasitology International*, **57:417–423**.

Ghosh, S. K., Field, J., Frisardi, M., Rosenthal, B., Mai, Z., Rogers, R., & Samuelson, J. (1999). Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infection and immunity*, **67(6)**, 3073–3081.

Goldston, A. M., Powell, R. R., & Temesvari, L. A. (2012). Sink or swim: lipid rafts in parasite pathogenesis. *Trends in parasitology*, **28(10)**, 417–426.

Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews Molecular cell biology*. **9(2)**, 139-150.

Haque, R., Huston, C. D., Hughes, M., Houpt, E., Petri, Jr. WA. (2003). Amebiasis. *New England journal of medicine*, **348**,1565–1573.

J. López, D. (2009) Actividades esfingomielinasa bacterianas y de mamíferos, Caracterización y efectos estructurales en membranas. Disertación doctoral.

Jenkins, R. W., Canals, D., & Hannun, Y. A. (2009). Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cellular signalling*, **21(6)**, 836-846.

Kinchen, J. M., & Ravichandran, K. S. (2008). Phagosome maturation: going through the acid test. *Nature reviews Molecular cell biology*, **9(10)**, 781.

Lang, F., Gulbins, E., Lang, P. A., Zappulla, D., & Föller, M. (2010). Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **26(1)**, 21-28.

Laughlin, R. C., McGugan, G. C., Powell, R. R., Welter, B. H., Temesvari, L. A. (2004). Involvement of raft-like plasma membrane domains of *Entamoeba histolytica* in pinocytosis and adhesion. *Infect. Immun.***72**:5349-5357.

Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U. C., 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., ... Hall, N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*, **433(7028)**, 865–868.

Lozano-Mendoza, Janeth. (2015). Análisis comparativo de dos cepas de *Entamoeba histolytica* genéticamente relacionadas que presentan diferente virulencia. Tesis de Doctorado. Universidad de Guanajuato. División de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Biología.

Macpherson, A. J., McCoy, K. D., Johansen, F. E., Brandtzaeg, P. (2008). The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal immunology*, **1**:11.

Martínez-Palomo, A. (1982). The biology of *Entamoeba histolytica*. *Research Studies Press* (John Wiley & Sons Ltd.).

Martínez-Palomo, A., Espinosa Cantellano, M. (1998). Intestinal amoebae. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*, **5**, 157–177.

Martínez-Palomo, A., Ruíz-Palacios, G. (1990). Amebiasis. McGraw-Hill, Inc.

Matthiesen, J., Bär, A-K., Bartels, A-K., Marien, D., Ofori, S., Biller, L., Tannich, E., Lotter, H., Bruchhaus, I. (2013). Overexpression of specific cysteine peptidases confers pathogenicity to a nonpathogenic *Entamoeba histolytica* clone. *mBio* **4(2):e00072-13**.

McLaughlin, J., & Meerovitch, E. (1975). The surface and cytoplasmic membranes of *Entamoeba invadens* (Rodhain 1934)--II. Polypeptide and phospholipid composition. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, **52(4)**, 487–497.

McLaughlin, J., Aley, S. (1985). The Biochemistry and Functional Morphology of the *Entamoeba*. *J. Protozool.* **32**, 221–240.

Mendoza-Macías, C. L., Barrios-Ceballos, M. P., Anaya-Velázquez, F., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., Padilla-Vaca, F. (2010). *Entamoeba histolytica*: Molecular cloning and characterization of a novel neutral sphingomyelinase. *Exp. Parasitol.* **125**: 279-285.

Meyer, M., Fehling, H., Matthiesen, J., Lorenzen, S., Schuldt, K., Bernin, H., ... & Roeder, T. (2016). Overexpression of differentially expressed genes identified in nonpathogenic and pathogenic *Entamoeba histolytica* clones allow identification of new pathogenicity factors involved in amoebic liver abscess formation. *PLoS Pathogens*, **12(8)**, e1005853.

Mittal, K., Welter, B.H. Temesvari, L.A. (2008). *Entamoeba histolytica*: lipid raft are involved in adhesion of trophozoites to host extracellular matrix components. *Exp. Parasitol.* **120:127-134.**

Moncada, D., Keller, K., Ankri, S., Mirelman, D., Chadee, K. (2006). Antisense inhibition of *Entamoeba histolytica* cysteine proteases inhibits colonic mucus degradation. *Gastroenterology*, **130, 721–730.**

Moncada, D., Keller, K., Chadee, K. (2003). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. *Infection and Immunity*, **71, 838–844.**

Mora-Galindo, J., Anaya-Velázquez, F., Ramírez-Romo, S., González-Robles, A. (2004). *Entamoeba histolytica*: correlation of assessment methods to measure erythrocyte digestion, and effect of cysteine proteinases inhibitors in HM-1: IMSS and HK-9: NIH strains. *Experimental parasitology*, **108,89–100.**

Mora-Galindo, J., Gutiérrez-Lozano, M., Anaya-Velazquez, F. (1997). *Entamoeba histolytica*: kinetics of hemolytic activity, erythrophagocytosis and digestion of erythrocytes. *Archives of medical research*, **28,200–201.**

Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Husain, A., & Nozaki, T. (2010). Conservation and function of Rab small GTPases in *Entamoeba*: annotation of *E. invadens* Rab and its use for the understanding of *Entamoeba* biology. *Experimental parasitology*, **126(3), 337- 347.**

Nakada-Tsukui, K., Tsuboi, K., Furukawa, A., Yamada, Y., Nozaki, T. (2012). A novel class of cysteine protease receptors that mediate lysosomal transport. *Cellular Microbiology*, **14,1299–1317.**

NIH. (2023). La comorbilidad. *National Institute on Drug Abuse.*

Nikolova-Karakashian, M. N., Rozenova, K. A. (2010). Ceramide in stress response. In: *Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules*. Springer, pp. 86–108.

Oda, M., Takahashi, M., Matsuno, T., Uoo, K., Nagahama, M., et al. (2010). Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, 1798,1073–1080.

Okada, M., Huston, C. D., Mann, B. J., Petri, W. A., Kita, K., & Nozaki, T. (2005). Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic Cell*, 4(4), 827-831.

Olivos-García, A., Saavedra, E., Nequiz, M., Santos, F., Luis-García, ER., et al. (2016). The oxygen reduction pathway and heat shock stress response are both required for *Entamoeba histolytica* pathogenicity. *Current Genetics*, 62, 295–300.

Orozco, E., Guarneros, G., Martinez-Palomo, A., & Sanchez, T. (1983). *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *Journal of Experimental Medicine*, 158(5), 1511-1521.

Petri, W. J. (1996). Amebiasis and the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin: from lab bench to bedside. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res*. 44(2),24.

Pomorski, T., & Menon, A. K. (2006). Lipid flippases and their biological functions. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(24), 2908-2921.

Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J. Á., Piedrola-Angulo, G. (1999). *Microbiología y parasitología médica*. 2. Salvat.

Que, X., Kim, S-H., Sajid, M., Eckmann, L., Dinarello, C. A., et al. (2003). A surface amebic cysteine proteinase inactivates interleukin-18. *Infection and immunity*, 71:1274–1280.

Ramírez-Montiel, F., Mendoza-Macias, C., Andrade-Guillen, S., Rangel-Serrano, A., Paramo-Perez, I., Rivera-Cuellar, P. E., España-Sánchez, B. L., Luna Bárcenas, G., Anaya-Velázquez, F., Franco, B., Padilla-Vaca, F. (2019). Plasma membrane damage repair is mediated by an acid sphingomyelinase in *Entamoeba histolytica*. *PLoS pathogens*, **15(8)**, e1008016.

Ramírez-Montiel, Fátima Berenice. (2015). Caracterización de la actividad de esfingomielinasa ácida secretada por *Entamoeba histolytica*. Tesis de Maestría. Universidad de Guanajuato. División de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Biología.

Ramírez-Montiel, Fátima Berenice. (2020). Reparación del daño a la membrana plasmática mediado por la esfingomielinasa ácida en *Entamoeba histolytica* y su impacto en la virulencia. Tesis de Doctorado. Universidad de Guanajuato. División de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Biología.

Ravdin, J. (2000). Amebiasis. *Tropical Medicine: Science and Practice, series editors G.* (Vol. 2). Imperial College Press.

Rivera-Cuellar, Paris Emmanuel. (2019). Efecto de la sobreexpresión de la esfingomielinasa ácida 6 en la reparación de la membrana plasmática y en la virulencia de distintas cepas de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Maestría, División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato.

Rossignol J, EL-GOHARY YM. (2006). Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, **24:1423–1430**.

Ruiz, E. T., & Guzmán, R. V. (1996). Eficacia comparativa entre quinfolida y metronidazol en el tratamiento de la amibiasis luminal. *Acta médica - Escuela Superior de Medicina. IPN*, **31(121)**, 53-58.

Salles, J. M., Moraes, L. A., Salles, M. C. (2003) Hepatic amebiasis. *Braz J Infect Dis*, 7 (2), 96-110.

Sepúlveda, B., Manzo, NT-G. (1986). Clinical manifestations and diagnosis of amebiasis. *Amebiasis: Human Parasitic Diseases*, 169–187.

Shirley, D. A. T., Watanabe, K., Moonah, S. (2019). Significance of amebiasis: 10 reasons why neglecting amebiasis might come back to bite us in the gut. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13, 1–11

Shirley, D. T., Farr, L., Watanabe, K., & Moonah, S. (2018). A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis. *Open forum infectious diseases*, 5(7),161.

SINAVE, DGE, Salud. Información Epidemiológica de Morbilidad. Anuario de Morbilidad 2021 (2021). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. México.

Singh, R. S., Walia, A. K., Kanwar, J. R., & Kennedy, J. F. (2016). Amoebiasis vaccine development: A snapshot on *E. histolytica* with emphasis on perspectives of Gal/GalNAc lectin. *International journal of biological macromolecules*. 91, 258-268.

Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M. C., Flannery, A., et al. (2010). Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *Journal of Cell Biology*, 189, 1027–1038.

Tanyuksel. M., Petri. WA. Jr. (2003). Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev*. 16, 713-29.

Tillack, M., Biller, L., Irmer, H., Freitas, M., Gomes, M. A. Tannich, E., Bruchhaus, I. (2007). The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics*, **8** p. 170.

Turkeltaub, J. A., McCarty, T. R., Hotez, P. J. (2015). The intestinal protozoa: emerging impact on global health and development. *Curr Opin Gastroenterol.***31,38–44.**

Urquieta-Ramírez, L., Ramírez-Montiel, F., Andrade-Guillén, S., Páramo-Pérez, I., Rangel-Serrano, Á., Reyes-Cortés, R., Franco, B., Mendoza-Macías, C. L., Anaya-Velázquez, F., Padilla-Vaca, F. (2018). Contribution of neutral sphingomyelinases to in vitro virulence of *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology* **194:38-44.**

Vargas-Villarreal, J., Mata-Cárdenas, B. D., Deslauriers, M., Quinn, F. D., Castro-Garza, J., Martínez-Rodríguez, H. G., & Said-Fernández, S. (2003). Identification of acidic, alkaline, and neutral sphingomyelinase activities in *Mycobacterium tuberculosis*. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, **9(6)**, 225–230.

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. *Canadian journal of microbiology*, **48,123–131.**

Vieira, O. V., Botelho, R. J., & Grinstein, S. (2002). Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochemical Journal*, **366(3)**, 689-704.

World Health Organization. (1997). World Health Organization/Pan American Health Organization/UNESCO report of a consultation of experts on amoebiasis. *Wkly. Epidemiol.*

Ximenéz, C., Morán, P., & Ramiro, M. (2013). ¿Es la amibiasis un problema de salud pública? *Ciencia*, **64(2)**, 16-25.