



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA
SALUD

“ANÁLISIS *IN VITRO* DE LA INTERACCIÓN ENTRE *Entamoeba histolytica* CON CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA DE HÁMSTER EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LOS NEUROTRANSMISORES DEL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO (ACETILCOLINA Y ADRENALINA)”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

M. EN C. FABIOLA DEL ROCÍO VILLALOBOS GÓMEZ.
Matrícula 2123800833

Directores de tesis

DR. MARIO GARCÍA LORENZANA
DR. JAVIER VENTURA JUÁREZ

Asesor de Tesis

Dr. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZÁLEZ

El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Exelencia de CONACyT (PNPC) y cuenta con el apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93. (001480).

M en C. Fabiola del Rocío Villalobos Gómez alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana agradece la beca otorgada por CONACYT de Agosto de 2012 a Agosto de 2016 con CVU

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó:

Fabiola del Rocío Villalobos Gómez, el día 4 de Junio del 2019.

JURADO


DR. MARIO GARCÍA LORENZANA

Cotutor

Profesor Titular, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa


DR. JAVIER VENTURA JUÁREZ

Cotutor

Profesor Titular, Universidad Autónoma de Aguascalientes


DR. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZÁLEZ

Asesor

Universidad Nacional Autónoma de México, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga


DR. EMILIO DOMÍNGUEZ SALAZAR

Sinodal

Profesor Titular, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa


DRA. NORMA EDITH LÓPEZ DÍAZ GUERRERO,

Sinodal

Profesor Titular, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

DEDICATORIA

A MI ESPOSO NOÉ ARTURO DE LUNA MARTÍNEZ

Por que sin tí, esto no hubiera sido posible, por que siempre estuviste conmigo en cada experimentos, en cada desvelada, reímos, lloramos nos enojamos, mil gracias por todo, te amo.....

MIS HIJOS NOÉ MAURICIO Y ANAPAUULA DE LUNA VILLALOBOS

Por ser las personitas que mueven mi mundo ya que por ellos concluí esta etapa, soy muy afortunada de tenerlos, los amo...

A MI PADRES y HERMANOS

Por que siempre han creído en mí, y son mi mejor ejemplo, gracias por ser y estar siempre en cada logro de mi vida, los amo...

*A MI TÍA AMPARO GÓMEZ VELA Y LA DRA. ROSARIO CAMPOS
ESPARZA †*

Gracias por todo su apoyo y por darme la dicha de haberlas conocido....

Agradecimientos

Al Dr. Javier Ventura Juárez por ser mi amigo, mi guía y mi apoyo, no tengo palabras suficientes para agradecer que siempre estuvo conmigo.

Al Dr. Mario García Lorenzana por haberme aceptado como su estudiante, ya que sin él esto no hubiera sido posible.

Al Dr. Galileo por que siempre me dió su apoyo y siempre estuvo conmigo en esta etapa de mi vida.

. Así mismo, agradezco a los Doctores, Rogelio Salinas Gutiérrez, Martín Humberto Muñoz Ortega y Manuel Ávila Blanco, a la Dra. Patricia Talamás, al Dr. Alfonso Olivos, al Dr.Emilio Domínguez y a la Dra. Norma Edith gracias por su apoyo, valiosas aportaciones y enseñanzas en el desarrollo de este trabajo.

Al apoyo proporcionado por la beca del CONACYT

MUCHAS, MUCHAS GRACIAS.....

La presente investigación se realizó en:



Laboratorio de Ciencias Morfológicas, Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes.



Universidad Nacional Autónoma de México, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad, Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Cd. de México



Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN, Cd. de México

Índice

RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
1 ANTECEDENTES.....	13
1.1 Entamoeba histolytica.....	13
1.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONOMÍA.....	13
1.1.2 MORFOLOGÍA Y BIOLOGÍA.....	14
1.1.3 CICLO DE VIDA.....	15
1.1.4 LECTINA 220 kDa.....	16
1.2 SISTEMA NERVIOSO.....	16
1.2.1 SNA Y REGULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN.....	18
1.2.2 EL SISTEMA NERVIOSO PARASIMPÁTICO (SNP) (COLINÉRGICO).....	18
1.2.3 EL SISTEMA NERVIOSO SIMPÁTICO (SNS) (ADRENÉRGICO).....	19
1.3 CÉLULAS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA AGUDA (NEUTRÓFILOS Y MACRÓFAGOS) Y SUS RECEPTORES A NEUROTRANSMISORES.....	19
1.3.1 PROCESO INFLAMATORIO EN EL ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO.....	22
1.3.2 NEUTRÓFILOS.....	22
1.3.3 MACRÓFAGOS.....	23
1.4 CITOCINAS.....	26
1.4.1 TGF- β	26
1.4.2 IL1.....	28
1.4.3 IL-10.....	29
1.4.4 TNF- α	29
1.4.5 IFN- γ	30
1.5 MECANISMOS DE REGULACIÓN EN EL PROCESO DE INFLAMACIÓN <i>E. histolytica</i>	31
1.5.1 TLR4.....	32
1.5.2 NF- κ B.....	32
1.5.3 STAT3.....	33
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	36
3. HIPOTESIS.....	37
4. OBJETIVO GENERAL.....	38
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
5.1. CULTIVO DE <i>Entamoeba histolytica</i>	39
5.2. LECTINA DE 220 kDa.....	39
5.3 OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS Y NEUTRÓFILOS POR EL MÉTODO DEFICOLLE HISTOPAQUE PARA OBTENCIÓN DE NEUTRÓFILOS.....	40
5.4 SEPARACIÓN DE CÉLULAS CON PERLAS.....	40
5.5 CUANTIFICACIÓN DE VIABILIDAD DE NEUTRÓFILOS Y MACRÓFAGOS.....	41
5.6 INTERACCIÓN DE LAS CÉLULAS.....	41
5.7 ELISA.....	42
5.8 INMUNOFLUORESCENCIA.....	42
5.9 INTENSIDAD MEDIA FLUORESCENCIA EN PÍXELES.....	43
5.10 MÉTODO ESTADÍSTICO.....	44
6. RESULTADOS.....	45
6.1 OBTENCIÓN DE LECTINA 220 kDa DE <i>Entamoeba histolytica</i>	45
6.2 VIABILIDAD DE MACRÓFAGOS Y NEUTRÓFILOS.....	45
6.3 ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS Y NEUTRÓFILOS.....	47

6.4 ELISA	47
6.4.1 EFECTO DE LA LECTINA DE 220 kDa DE <i>E. histolytica</i> Y LOS NEUROTRANSMISORES SOBRE LA SECRECIÓN DE IFN- γ EN MACRÓFAGOS Y NEUTRÓFILOS	49
6.4.2 EFECTO DE LA LECTINA DE 220 kDa DE <i>E. histolytica</i> Y LOS NEUROTRANSMISORES SOBRE LA SECRECIÓN DE IL-1 β EN MACRÓFAGOS Y NEUTRÓFILOS	49
6.4.3 EFECTO DE LA LECTINA DE 220 kDa DE <i>E. histolytica</i> Y LOS NEUROTRANSMISORES SOBRE LA SECRECIÓN DE TNF- α EN MACRÓFAGOS Y NEUTRÓFILOS	51
6.4.4 EFECTO DE LA LECTINA DE 220 kDa DE <i>E. histolytica</i> Y LOS NEUROTRANSMISORES SOBRE LA SECRECIÓN DE IL-10 EN MACRÓFAGOS Y NEUTRÓFILOS	51
6.5 FLUORESCENCIA	56
6.5.1 EXPRESIÓN DE MÁCROFAGOS CON NF κ -B	56
6.5.2 EXPRESIÓN DE MÁCROFAGOS CON TLR4	57
6.5.3 EXPRESIÓN DE MÁCROFAGOS CON STAT-3	57
6.5.4 EXPRESIÓN DE NEUTRÓFILOS CON TLR4	58
6.5.5 EXPRESIÓN DE NEUTRÓFILOS CON NF κ B	58
6.5.6 EXPRESIÓN DE NEUTRÓFILOS CON STAT-3	58
7. DISCUSIÓN	61
8. CONCLUSIONES	67
9. LITERATURA	68
10. ANEXOS	76

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	15
Figura 2. Diagrama de Interacción de la amiba con células inflamatorias	35
Figura 3. Tabla de cuantificación de citocinas	48
Figura 4. Inmunofluorescencia de mecanismos de activación en macrófagos y neutrófilos	59

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Viabilidad de macrófagos y neutrófilos (MTT)	46
Gráfica 2. Activación de macrófagos y neutrófilos	47
Gráfica 3. Producción de IFN- γ por macrófagos y neutrófilos	50
Gráfica 4. Producción de IL-1 β por macrófagos y neutrófilos	52
Gráfica 5. Producción de TNF- α por macrófagos y neutrófilos	54
Gráfica 6. Producción de IL-10 por macrófagos y neutrófilos	56
Gráfica 7 Mecanismos de Activación en macrófagos y neutrófilos	60

Abreviaturas

Acetilcolina	ACh
Factor de Crecimiento Transformante Beta	TGF- β
Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	NF-kB
Interleucina 1 Beta	IL-1 β
Interleucina 10	IL-10
Interferón gamma	IFN- γ
Kilodaltones	kDa
Lectina 220	L220
Receptor tipo Toll	TLR4
Transductor de señal y activador de la transcripción 3	STAT 3
Sistema Nervioso Autónomo	SNA

Resumen

La Neuroinmunorregulación de la inflamación es un campo del conocimiento que inicia su exploración. *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) provoca una respuesta inflamatoria en el hospedero en la que los macrófagos y neutrófilos son la primera línea de defensa. El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de la lectina de 220 kDa (L220) de *E. histolytica* sobre la estimulación de macrófagos y neutrófilos humanos, especialmente sobre la secreción de citocinas y la relación agonista o antagonista de estas células con neurotransmisores. Las células humanas se pusieron en contacto con L220, epinefrina, nicotina, esmolol y bromuro de vecuronio (BV). Las concentraciones de IL-1 β , IFN- γ , TNF- α e IL-10 se determinaron mediante ELISA a las 4 h de interacción. L220 estimula a macrófagos para secretar IL-1 β e IL-10, este efecto fue modulado a la baja por el Bromuro, L220 y epinefrina estimularon la secreción de IFN- γ e IL-1 β , tal como lo hizo L220, esmolol y nicotina para TNF- α e IL-10 en los macrófagos. En los neutrófilos, la secreción de IL-1 β fue inducida por L220 y L220-esmolol a las 8h, mientras que la secreción de TNF- α fue inducida por la L220 y L220-BV. En resumen, los macrófagos y neutrófilos en contacto con L220 responden a través de la activación de los TLR, NF- κ B y STAT3. Además, dicha respuesta puede ser modulada por los neurotransmisores del sistema colinérgico y los receptores adrenérgicos en las células inmunes.

Abstract

Neuroimmunoregulation of inflammation is a field of knowledge that begins its exploration. *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) provokes an inflammatory response in the host in which macrophages and neutrophils are the first line of defense. The aim of this study was to analyze the effect of the 220 kDa lectin of *Entamoeba histolytica* on stimulation of human macrophages and neutrophils, especially the secretion of cytokines and its relation with neurotransmitters. Human cells were interacted with L220, epinephrine, nicotine, esmolol and vecuronium bromide (VB). The concentrations of IL-1 β , IFN- γ , TNF- α and IL-10 were determined by ELISA at 4 h of interaction. L220 stimulates macrophages to secrete IL-1 β and IL-10, this effect was modulated downwards by VB, L220 and epinephrine stimulated the secretion of IFN- γ and IL-1 β , as did L220, esmolol and nicotine for TNF- α and IL-10 in macrophages. In neutrophils, the secretion of IL-1 β was induced by L220 and L220-esmolol at 8 h, while the secretion of TNF- α was induced by L220 and L220-BV. In summary, macrophages and neutrophils in contact with L220 respond through the activation of TLR, NF κ -B and STAT3. In addition, this response can be modulated by the neurotransmitters of the cholinergic system and the adrenergic receptors in the immune cells.

INTRODUCCIÓN

La Neuroinmunorregulación de la inflamación es un campo del conocimiento que inicia su exploración. El proceso inflamatorio que ocurre durante la amibiasis está bien caracterizado y se sabe que los neutrófilos y los macrófagos son células efectoras importantes en la defensa del hospedero contra *E. histolytica*. La función inmune innata de éstas células, establecen una respuesta pro-inflamatoria mediante las citocinas IL-1 β , IL-8, IFN- γ y TNF- α , o bien, una respuesta anti-inflamatorias través de IL-10 y TGF- β . En las respuestas anteriores se involucra la activación de TLR's, NF κ -B y STAT's, que pueden ser moduladas por los neurotransmisores acetilcolina, adrenalina y noradrenalina del sistema nervioso autónomo (SNA) sobre los receptores colinérgicos y adrenérgicos en las células inmunes (Rosas-Ballina, M., and Tracey, K.J. 2009). Se sabe al respecto que en hámsteres vagotomizados se indujo una respuesta tisular más enérgica mediante la formación de colágena que evita la diseminación de los parásitos, concomitante con aumento de IL-10 e IFN- γ y disminución de macrófagos.

Otro aspecto importante es el descubrimiento de que el SNA puede influir en las células de la respuesta inmune, ya sea activándolas o induciendo un estado de inmunosupresión dependiendo de la vía nerviosa participante (simpático o parasimpático) y del entorno en que se encuentren (Muñoz- Ortega *et al.*, 2011).

1 ANTECEDENTES

1.1 *Entamoeba histolytica*

La amibiasis es causada por *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), que es un protozoo parásito extracelular de humanos, por lo cual Schaudinn en 1903, le dio el nombre a la amiba que hace daño al hombre y la denominó *E. histolytica* para diferenciarla de la no patógena *Entamoeba coli*. En 1903, Huber también descubrió las formas quísticas de dos especies en el intestino humano y dio a la especie patógena el nombre técnico de *E. histolytica*. En 1961, Diamond elaboró un medio de cultivo que permitió que el parásito sobreviviera sin necesidad de otro microorganismo, este medio axénico ha facilitado la investigación sobre las cepas patógenas de *E. histolytica* (Diamond, 1961)

1.1.1. CLASIFICACIÓN Y TAXONOMÍA

Del género *Entamoeba* existen siete especies que se localizan en el hombre: *histolytica*, *dispar*, *coli*, *gingivalis*, *moshkovskii*, *hartmanni* y *polecki*. El nombre de “amiba” proviene de microorganismos que cambian de forma, los que fueron descritos por Rosel Van Rosenhof en 1755 pero no fue hasta 1839 se creó el género *Amoeba* por Ehrenberg (Barell, 2002).

E. histolytica pertenece al subphylum *sarcodina*, superclase *rhizopoda* de protozoos formadores de pseudópodos, clase *lobosea*, orden *amoebidae*, familia *entamoebidae*, género *Entamoeba* y especie *histolytica* (Martínez-Palomo, 1987).

1.1.2 MORFOLOGÍA Y BIOLOGÍA

El género *Entamoeba* se distingue por su estructura nuclear, caracterizada por un núcleo vesicular, con un pequeño gránulo central o excéntrico conocido como cariosoma y un anillo granular o continuo, formado por nucleoproteínas, que limitan la membrana nuclear, y al cual se refieren comúnmente como cromatina nuclear periférica (Ravdin *et al.*, 1990). Algunas especies de amibas comparten hábitat y características morfológicas, lo que hace difícil su identificación, como *E. hartmanni* y *E. histolytica* que son muy parecidas y se diferencian de primera instancia por el tamaño. Además, *E. histolytica* y *E. dispar* son morfológicamente iguales y solamente pueden ser diferenciadas por: 1) análisis isoenzimático, 2) con anticuerpos monoclonales específicos y 3) por PCR (Romero, 2008).

Estrictamente, debe denominarse amibiasis a la enfermedad producida en seres humanos por amibas de la especie *E. histolytica* (Almendras *et al.*, 2006). Esta definición excluye de forma implícita otras situaciones que pueden ser confundidas con esta entidad. En primer lugar, no deben considerarse amibiasis las infecciones por otras especies de amibas (*Entamoeba coli*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba hartmanni*, *Iodamoeba butschlii*), ya que no ocasionan enfermedad (Clark *et al.*, 2000). Sin embargo, su detección en heces es un dato de interés ya que indica el consumo de agua o alimentos contaminados. En segundo lugar, las amibas de vida libre como *Naegleria fowleri*, varias especies de *Acanthamoeba* y *Balamuthia mandrillaris* provocan cuadros clínicos muy diferentes de la amibiasis, con una patogenia y una clínica específica (meningoencefalitis primaria amibiana, encefalitis granulomatosa amibiana y queratitis por *Acanthamoeba* (Tanyuksel y Petri, 2003), por lo que tampoco se deben considerar formas de amibiasis.

1.1.3 CICLO DE VIDA.

El ciclo de vida de *E. histolytica* es relativamente sencillo (figura 1). La infección inicia con la ingesta de quistes (capaces de resistir el pH gástrico) provenientes de agua o alimentos contaminados con materia fecal. En el intestino delgado ocurre el desenquistamiento que consiste en la división del quiste tetranucleado que da origen a ocho núcleos (estado metaquístico transitorio). Después, la división citoplásmica continúa y emergen ocho trofozoítos, que se dirigen al intestino grueso para colonizarlo, ahí se alimentan de bacterias y restos celulares; finalmente, los trofozoítos pueden enquistarse completando el ciclo(Ravdin y Kelsall, 1994).

En la mayoría de los individuos infectados, *E. histolytica* habita como comensal en el intestino grueso pero en otros casos este parásito puede invadir el intestino y otros órganos, dependiendo de la susceptibilidad del paciente y de los factores de patogenicidad del parásito (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).

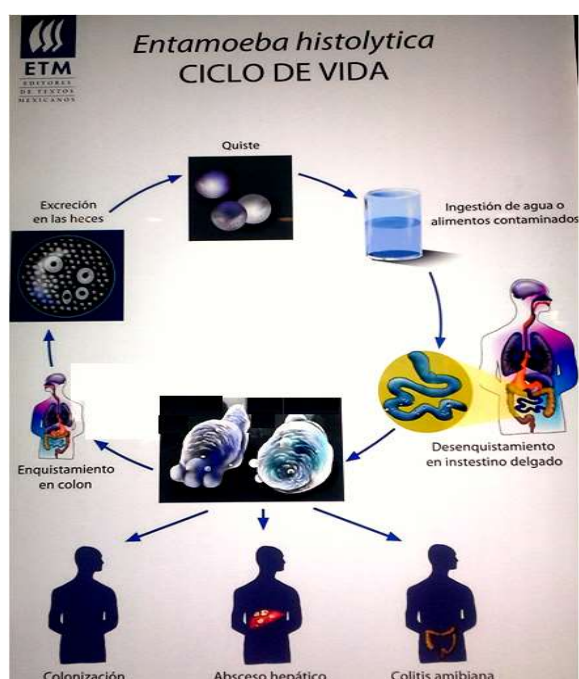


Figura 1: Esquemmatización del ciclo biológico directo de *E. histolytica* y cada uno de sus estadios(Tay-lara, 2000).

1.1.4 LECTINA 220 kDa. (L220)

E. histolytica, tiene entre otras, una glicoproteína de 220 kDa en su membrana que participa en el proceso de adhesión a las células huésped. Esta proteína con propiedades de lectina contiene 9% de carbohidratos y es rico en residuos hidrofóbicos. Por otra parte, se ha demostrado que L220 puede participar en fenómenos de adhesión. Puede unirse a monocapas fijas de células MDCK, inhibiendo la fijación de trofozoitos (Talamás-Rohana, *et al.*, 1995) Esta glicoproteína es muy inmunogénica, pudiendo generar altos niveles de anticuerpos, puede suprimir la proliferación de células T en el bazo y los ganglios linfáticos de ratones inmunizados (Talamás-Rohana *et al.* 1995). También es capaz de regular a la baja algunas citoquinas proinflamatorias, como IL-5, IL-6, INF- γ y TNF- α , por lo tanto, puede inducir una respuesta antiinflamatoria en leucocitos seleccionados (Bekker-Mendez *et al.* 2006). La proteína de 220 kDa aglutina eritrocitos humanos y la aglutinación se inhibe por concentraciones micromolares de ácido hialurónico, quitina, productos derivados de la quitina(quitotriosa) y anticuerpos de la proteína purificada. La proteína de 220 kDa es reconocida por un anticuerpo de membrana pero no por anticuerpos de otras fracciones subcelulares. Por lo tanto, se sugiere que esta proteína de 220 kDa con propiedades de lectina es un componente de la membrana plasmática y podría ser un "receptor" de moléculas envuelta en células y /o ataque de la matriz. (Rosales-Encina JL1 *et al.*, 1987).

1.2 SISTEMA NERVIOSO

El conocimiento de la interacción entre las funciones del sistema inmune y del sistema nervioso data desde 1940 en donde se aceptó que la interacción del

hipotálamo con la corteza suprarrenal puede llevar a un estado de inmunosupresión mediante los glucocorticoides, conocimiento que actualmente se usa en la medicina para controlar diversos procesos inflamatorios sistémicos. En el 2007 se realizó una vagotomía subdiafragmática a ratas Wistar machos adultos, para saber si el nervio vago está implicado en la mediación de la estimulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA). Para esto, se emplearon agonistas colinérgicos muscarínicos y nicotínicos (carbacol y nicotina), sugiriendo que el carbacol evoca una respuesta considerable de corticosterona por la estimulación de los receptores muscarínicos colinérgicos centrales (Bugajski *et al.*, 2007). Otro mecanismo de inmunoneuroregulación es a través de las citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α sobre el Sistema Nervioso Central y el eje hipotálamo-pituitario-adrenal que aumentan la secreción de ACTH y corticosterona (Dunn and Swiergiel, 2008).

Los glucocorticoides producidos por la corteza adrenal, que son parte del eje hipotálamo-pituitario-adrenal, presentan un efecto inmunosupresor (Berczi *et al.*, 2000). Además, éstos participan en el procesamiento de la información sensorial, como se observa en la enfermedad de Alzheimer (Vallés *et al.*, 2014). Existen evidencias de que las células inmunes pueden establecer contacto con las terminaciones nerviosas dentro de los órganos y tejidos linfoides como ganglios, bazo, amígdalas y timo en donde reconocen a los antígenos. (Del Rey *et al.*, 2008). Se sabe que algunas hormonas y neurotransmisores comparten segundos mensajeros intracelulares, factores de transcripción y mecanismos post-transcripcionales, situación que permite una mutua modulación de sus efectos a nivel intracelular. Por otra parte, las diversas células inmunes como macrófagos y neutrófilos expresan varios receptores para un

determinado agente neuroendocrino que se modifica después de su activación (Bancos *et al.*, 2015).

1.2.1 SNA y regulación de la inflamación

El sistema nervioso central (SNC) regula la respuesta inmune innata a través de rutas hormonales y neuronales. Los sistemas nerviosos simpático (SNS) y parasimpático (SNP) modulan la respuesta al estrés neuroendocrino y generalmente inhiben la respuesta inmune innata en los niveles sistémicos y regionales, mientras que el sistema nervioso periférico tiende a amplificar las respuestas inmunes innatas locales. Estos sistemas trabajan juntos para activar la respuesta inmune innata amplificando las respuestas inflamatorias locales que contienen o eliminan a los patógenos invasores, y posteriormente, para detener la inflamación y restaurar la homeostasis del huésped. El SNC puede ser considerado como parte integral de la respuesta inflamatoria del sistema inmune innato en su fase aguda ante patógenos (Sternberg, 2006).

El SNC posee células inflamatorias innatas como la microglía que son macrófagos modificados, los cuales tienen una función importante en la recepción y propagación de señales inflamatorias. Recientemente se ha postulado que el sistema inmune y el proceso inflamatorio participan de forma activa en la pérdida neuronal descrita en enfermedades del SNC agudas (infarto cerebral) y crónicas (esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer) (Cuenca-López, M.D *et al.*, 2010; Quatrini *et al.*, 2018).

1.2.2 El Sistema Nervioso Parasimpático

El SNP es una división del sistema nervioso autónomo que consiste en fibras nerviosas proyectadas desde la porción craneal y sacra del sistema nervioso central

hacia las células nerviosas en los ganglios. La porción craneal del SNP, esta representado por el nervio vago que inerva a las visceras de la región toracoabdominal, quien de forma aferente reconoce señales del tejido inflamado mediante citocinas pro-inflamatorias producidas localmente, dicha señal la conduce hacia neuronas hipotalámicas para analizar la señal y emitir una respuesta que es transmitida mediante la rama simpática o parasimpática eferente hacia el órgano dañado (Dunn and Swiergiel, 2008). Por su parte, la región sacra del SNP la representan fibras que se distribuyen en los vasos sanguíneos, glándulas y órganos internos principalmente pelvianos. Las funciones del parasimpático incluyen, entre otras, la disminución del gasto cardíaco, aumento de la glucogénesis hepática, contracción de la vesícula biliar, secreción de insulina y jugos gástricos, la dilatación de los vasos sanguíneos periféricos y contracción de los bronquios, constricción pupilar y estimulación del peristaltismo en el tubo digestivo (Sternberg, 2006).

1.2.3 El sistema nervioso simpático

El SNS es la otra división del sistema nervioso autónomo, consiste de fibras que se proyectan desde el sistema nervioso central a la cadena ganglionar simpática (a los lados de la médula espinal en la región toracolumbar) desde donde inervan a los órganos blanco, como: corazón, riñones, intestino, bazo, glándulas, etcétera. En general, los nervios simpáticos dilatan la pupila, constriñen los vasos sanguíneos periféricos e incrementan el gasto cardíaco (Tortora and Derrickson, 2018).

1.3 Células de la respuesta inflamatoria aguda (neutrófilos y macrófagos) y sus receptores de neurotransmisores.

Los neutrófilos desempeñan un papel central en la defensa del huésped contra los microorganismos invasores, y durante la amebiasis, su estimulación con las citocinas IFN- γ y TNF- α o LPS desencadenan su actividad amebicida, mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Otro mecanismo activador de neutrófilos y macrófagos son su estimulación con acetilcolina (neurotransmisor parasimpático), éste tiene la capacidad de unirse a los receptores nicotínicos y muscarínicos. Cada uno de éstos presenta varias subunidades que heterodimerizan en las células y tejidos específicos para los diferentes efectos colinérgicos. Hay receptores colinérgicos en células inmunes, pero sólo los receptores nicotínicos regulan específicamente algunos efectos anti-inflamatorios en macrófagos y neutrófilos (Rosas-Ballina and Tracey, 2009).

Dentro de los receptores colinérgicos, principalmente expresados en macrófagos y neutrófilos, está el nicotínico $\alpha 7$ que se caracteriza por ser mediador en la modulación de la neurotransmisión incluyendo la respuesta a la nicotina (Gahring *et al.*, 2010). Este receptor participa en los sistemas no neuronales periféricos que favorece la respuesta anti-inflamatoria y su actividad puede variar dependiendo donde y que tipo de célula lo expresa. Además, entre sus funciones también está la defensa del hospedero en varios tejidos incluyendo la piel (Gahring *et al.*, 2010). Se ha demostrado la expresión del receptor $\alpha 7$ en queratinocitos, mediante hibridación *in situ*, en respuesta a la nicotina. También, se ha demostrado que la nicotina incrementa la adherencia de célula-célula de un cultivo de queratinocitos (Grando, 2006; Kurzen *et al.*, 2004). El estímulo de este receptor sobre macrófagos, inhibe la activación del Factor nuclear kappa-potenciador de cadena ligera de células B activadas (NF- κ B) inhibiendo a su vez la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (Ley *et al.*, 2010). Además de esto, también se afecta o se

inhibe a Janus kinase 2(JAK2) y de esta manera se inicia la acción de factores anti-inflamatorios como el Transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) y el Supresor de señalización de citocinas 3(SOCS3). Durante la fase de inflamación, las fibras colinérgicas liberan acetilcolina, que inhibe la producción de TNF- α de macrófagos. La acetilcolina inhibe la producción excesiva de citocinas pro-inflamatorias al contacto con un antígeno(Borovikova *et al.*, 2000). Durante las infecciones y en paralelo con la respuesta de fase aguda, se activa el SNS, que incluye la liberación masiva de sus neurotransmisores, las catecolaminas adrenalina y noradrenalina, hacia la circulación general (Sternberg, 2006). La adrenalina moviliza las células inmunitarias en la sangre, así como la especificidad del estrés inducido por esta movilización y el tráfico de leucocitos en sangre (Dhabhar *et al.*, 2012). La adrenalina es un potente activador de macrófagos, regula el incremento de la producción del NF- κ B, en una respuesta inflamatoria aguda a través de la participación de α_2 -adrenoreceptores (Flierl *et al.*, 2009).

La noradrenalina estimula a los macrófagos y a los neutrófilos (Grisanti *et al.*, 2011), y se sugiere que la adrenalina tiene un papel fisiológico importante como mediador de estrés o señal de peligro en la estimulación de la respuesta inmune innata durante el estrés (Giraldo *et al.*, 2010). Por otra parte, la norepinefrina estimula la fagocitosis de los neutrófilos a través de la vía adrenérgica y temporalmente tiene un papel inmunomodulador en la cicatrización de heridas cutáneas a través de alteraciones en la fagocitosis de neutrófilos lo cual puede representar una diana terapéutica de la respuesta inmune innata (Gosain *et al.*, 2009).

1.3.1 Proceso inflamatorio en el absceso hepático amibiano

Cuando *E. histolytica* invade los tejidos del ser humano se enfrenta a diferentes mecanismos letales de la respuesta inmune innata, incluyendo el complemento del plasma, el óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno de los macrófagos, además de enzimas como la mieloperoxidasa de los neutrófilos (Chávez-Munguía *et al.*, 2012). Cuando el parásito pasa las barreras naturales del organismo, invade intestino, hígado, pulmones y cerebro (Anaya-Velázquez and Padilla-Vaca, 2011).

1.3.2 Neutrófilos

Los neutrófilos juegan un papel central en el sistema de inmunidad innata (Nathan, 2006). Durante la amibiasis invasiva, son incapaces de matar a las amibas de cepas virulentas, ya que *E. histolytica* puede lisarlos *in vitro*, aun a una relación de 3,000 PMNs por cada trofozoíto (Ravdin and Guerrant, 1981). Los neutrófilos emplean tres estrategias antimicrobiales: a) fagocitosis, envuelven por inmersión y subsecuentemente elimina al microbio en compartimentos especializados, b) desgranulación y liberación de moléculas antimicrobiales como elastasa, catepsina G y mieloperoxidasa, c) la formación de trampas extracelulares (Neutrophil Extracellular Traps=NETs) (Amulic *et al.*, 2012; Brinkmann *et al.*, 2010a), consiste en la formación de estructuras en red de ADN y proteínas por neutrófilos activados, en donde los NETs pegan, desarman y matan patógenos extracelularmente (Vergara, 2008). Los NETs son estructuralmente fibras, probablemente nucleosomas, constituidas mayormente por ADN, con incrustaciones de péptidos y enzimas antimicrobianas como elastasa, catepsina G y mieloperoxidasa, así como histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4. La formación de los NETs es diferente de la apoptosis celular, de hecho ocurre en los

primeros 10 minutos después de la activación, lo suficientemente rápido como para no confundir con un mecanismo apoptótico. Por eso, la formación de NETs por neutrófilos es un tercer mecanismo de muerte celular que no es necrosis ni es apoptosis sino NETOSIS (Brinkmann *et al.*, 2010a).

Estudios *in vitro* reportan que la actividad amebicida de neutrófilos humanos, estimulados por IFN- γ , y/o TNF- α y macrófagos destruyen a los trofozoítos de *E. histolytica* (Denis and Chadee, 1989; Pacheco-Yépez *et al.*, 2011; Salata *et al.*, 1987). Se conoce también, que IFN- γ y TNF- α son capaces de estimular la actividad amebicida de linfocitos T derivados de médula ósea de ratón y de macrófagos peritoneales (Pacheco-Yépez *et al.*, 2011).

En general, se sabe que los neutrófilos de hámster son incapaces de limitar la invasión amibiana, incluso, se ha propuesto que éstos participan en la destrucción de los tejidos del huésped usando factores novedosos como los NETs (Brinkmann *et al.*, 2010b).

1.3.3 Macrófagos

Son células residentes fagocíticas en tejidos linfoides y no linfoides, están equipados con una amplia gama de moléculas de superficie que reconocen receptores de patógenos y fagocitan e inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias. Estas células desempeñan papeles cruciales en la inmunidad innata y adaptativa y son importantes células efectoras en la eliminación de los microorganismos (Chawla *et al.*, 2011). Los macrófagos/monocitos presentan varios receptores de reconocimiento de patógenos (CD4, CD14, CD16a, CD23, CD25, CD29, CD30, CD31, CD32, CD36, CD40, CD49, CD49d, CD49e, CD49f, CD54, CD62, CD64, CD68, CD74, CD80, CD86, CD88, CD89, CD102, CD153, CD105, CD162, CD273, CD275 y CD280) que hacen

eficiente la fagocitosis e inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL1- α , IL-8, TNF- α , INF- γ) (Geissmann *et al.*, 2010). Los macrófagos son las células efectoras dominantes de las fases tardías de la respuesta inmune innata, (uno o dos días después de la infección). Tienen una vida más prolongada que los neutrófilos y, a diferencia de estos, no están totalmente diferenciados y pueden dividirse en el sitio de la inflamación donde pueden especializarse en macrófagos activados. Los macrófagos activados clásicamente (M1) inducidos por IFN- γ y/o TNF- α muestran un fenotipo tipo TH1, son efectores pro-inflamatorios y tienen funciones bactericidas, mientras que los macrófagos activados alternativamente (M2), caracterizados por su baja secreción de IL12, incluye por lo menos tres fenotipos diferentes: 1)M2a (inducido por IL-4, o IL-13 o IL-21), M2b (inducido por complejos inmunes y receptores agonistas de TLR's o IL-1) y M2c (inmunosupresivo inducido por IL-10, TGF- β , o glucocorticoides). Algunas investigaciones también consideran que el M2b y M2c son regulados por macrófagos (Liu and Yang, 2013; Martinez *et al.*, 2009) que exhiben un fenotipo tipo Th2 y están involucrados en la resolución de la inflamación y reparación del tejido. Aunque este modelo clasifica los fenotipos de activación observados, es importante considerar que subestima la actividad *in vivo* donde existe una alta diversidad de estados de macrófagos activados que emergen en respuesta a diferentes estímulos y ambientes, son influenciados por su heterogeneidad y conforman una serie de activación (Corre *et al.*, 2007). La estimulación de los macrófagos puede ser múltiple, ya que pueden tener actividad amebicida cuando son activados *in vitro* por IFN- γ , factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y lipopolisacaridos (Mosser, 2003). *E. histolytica* causa lisis directa en los macrófagos y otras células, por lo tanto, la infección se asocia con la alteración en la función de los macrófagos. Varios estudios *in vivo* e *in vitro* han evidenciado la

alteración de la función efectora y accesoria de los macrófagos, los cuales se vuelven refractarios a la activación por IFN- γ y LPS. Ésta reduce la capacidad de presentar antígenos a linfocitos T por disminución en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad II (Campbell and Chadee, 1997). Los linfocitos son responsables de la activación de macrófagos y la consecuente transferencia de resistencia contra los patógenos (Martinez *et al.*, 2009). Esto muestra que el IFN- γ producido por las células Th1 activa a los macrófagos para una actividad antimicrobiana (Liu and Yang, 2013).

Los macrófagos pueden constituir una defensa contra la amiba, pues se ha descrito que su actividad amebicida inducida por TNF α e IFN- γ , emplean mecanismos como el óxido nítrico, sin embargo, éstos no son capaces de evitar la invasión amibiana en un modelo *in vivo* (Chadee *et al.*, 1985; Seydel *et al.*, 2000; Ventura-Juárez *et al.*, 2003; Villalba-Magdaleno *et al.*, 2011). Por otra parte, resultados previos en el modelo del absceso hepático amibiano experimental en hámster (AHA), han mostrado que la eliminación del sistema nervioso parasimpático (vagotomía) indujo una respuesta de rechazo tisular más energética hacia las amibas mediante la formación de una barrera de colágena, con incremento de los niveles de IL-10 e IFN- γ *in situ* y disminución de los macrófagos (Muñoz-Ortega *et al.*, 2011). Por otra parte, el factor inhibidor de la migración de macrófagos de mamíferos (MIF) es una citocina proinflamatoria que desempeña un papel importante en la exacerbación de una amplia gama de enfermedades inflamatorias, incluyendo colitis. Se identificó un homólogo del gen MIF en el genoma de *E. histolytica*, el cual se expresa como una proteína de 12-kDa localizada en el citoplasma de trofozoítos, planteando la cuestión de si *E. histolytica* (EhMIF) tiene actividad proinflamatoria similar a la de MIF de los mamíferos (Moonah *et al.*, 2014).

1.4 Citocinas

Las citocinas son péptidos señales, proteínas o glicoproteínas que son secretadas por muchos tipos de células, incluyendo linfocitos, células epiteliales, endoteliales y del músculo liso. Éstas pueden potenciar o inhibir la respuesta inflamatoria a patógenos, a moléculas no propias y a toxinas (Yiu *et al.*, 2012).

Las citocinas se producen de forma inmediata aproximadamente de 15 a 30 minutos tras el contacto de las células implicadas en las respuestas inmunes innatas con un agente extraño. Los monocitos y macrófagos activados son la principal fuente de estas moléculas, aunque también pueden ser producidas por linfocitos y fibroblastos activados. Las citocinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica (Hernández and Alvarado, 2001).

Las citocinas se clasifican en cinco familias: 1) Factores transformadores de la diferenciación celular (TGF- β), 2) Interleucinas (IL-1 α , IL-8 e IL-10), 3) Factores estimuladores de colonias, 4) Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y 5) Interferón gamma (IFN- γ). Las citocinas son moléculas solubles inmunomoduladoras clasificadas también como pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Las citocinas proinflamatorias son IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ que poseen una acción relevante como elementos promotores de la inflamación, contribuyendo al inicio de la respuesta inmune adaptativa y las antiinflamatorias son IL-10, IL-4 y TGF- β que modulan la respuesta inflamatoria (Kindt *et al.*, 2007).

1.4.1 TGF- β

TGF- β es una proteína multifuncional implicada en el control de la proliferación y

la diferenciación, así como en otras funciones en diversos tipos celulares. La desregulación de la activación y de la ruta de señalización del TGF- β 1 puede desencadenar apoptosis, por lo tanto, juega un papel importante en el control del sistema inmune y muestra diferentes actividades en diferentes tipos de células, o en diferentes estadios de desarrollo de la célula. La mayoría de las células inmunes (leucocitos) secretan TGF- β 1 (Letterio and Roberts, 1998).

El efecto del TGF- β 1 en macrófagos y monocitos es predominantemente supresor, pudiendo inhibir la proliferación de estas células y evitar así la producción de especies reactivas de oxígeno, como el anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Lin et al., 1995). TGF- β 1 actúa como un quimioatrayente, dirigiendo una respuesta inmune sobre algunos patógenos, macrófagos y monocitos, los cuales responden a bajos niveles de TGF- β 1 (Yiu et al., 2012). Además, la expresión de citocinas incluyendo IL-1 β , TNF- α , IL-10 y la fagocitosis por macrófagos puede verse incrementada por la acción del TGF- β 1 (Wahl et al., 2006). Los ligandos de la superfamilia TGF- β inician sus efectos celulares por la unión de receptores de alta afinidad de la superficie celular, incluyendo el tipo I (se activa con kinasa 1-7) y receptores de tipo II que en conjunto constituyen la única familia conocida como receptores cinasa serina /treonina. La señalización de la superfamilia de TGF- β está regulada en todos los niveles. TGF- β 1 se sintetiza y se secreta en la matriz extracelular como una proteína precursora inactiva que consta de un péptido señal, la latencia asociada al péptido en el dominio (LAP) y al TGF- β 1 maduro. Se cree que en la activación de TGF- β 1 participa la hendidura proteolítica de LAP. Esta hendidura es inducida por condiciones ambientales ácidas o proteasas extracelulares, incluyendo trombospondina-1, plasmina, catepsina-D, matriz metaloproteinasas 2 y 9, y la furina convertasa. También, hay evidencia que las

integrinas participan en la activación de TGF- β en ausencia de la hendidura proteolítica. El dominio LAP de TGF- β tiene una secuencia RGD que media la unión a integrinas. Se demostró que la integrina α -v β -6, participa en activación de TGF- β 1 y la α -v β -8 activa TGF- β 1 a través de un mecanismo dependiente de la membrana tipo 1 de la matriz metaloproteínasa MT1-MMP (Gordon and Blobel, 2008).

1.4.2 IL-1 β

IL-1 β es una citocina producida por múltiples estirpes celulares, principalmente por macrófagos activados. Se produce en grandes cantidades como respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés, es liberada por los macrófagos, monocitos y células dendríticas en respuesta al factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Además, tiene efectos biológicos en células endoteliales (inflamación y coagulación), hipotálamo (fiebre), hipófisis (secreción de ACTH) e hígado (síntesis de proteínas de fase aguda) y media la respuesta innata precoz ante las infecciones virales (Thomson and Lotze, 2003). Sus principales componentes son IL-1 α e IL-1 β . La IL-1 β es secretada a la circulación e interacciona con dos tipos de receptores: Tipo I: se encuentran sobre la mayoría de las células del cuerpo y parece ser el mediador de las respuestas clásicas de la IL-1 y Tipo II: se encuentran sobre linfocitos B, neutrófilos, monocitos y células de la médula ósea (Pirog *et al.*, 2010). IL-1 β tiene la capacidad de detectar y activar señales de peligro (Velázquez *et al.*, 2012). El inflamosoma ocupa un papel importante en la respuesta inflamatoria, se ha encontrado que todos los inflamosomas activan e inducen la secreción de IL-1 α (Wang *et al.*, 2014). Inflamosoma-caspasa 1 dependiente, libera IL-1 α e IL-1 β que es independiente de la caspasa-1 con actividad catalítica, definiendo un modo de acción para la caspasa 1. El inflamosoma está involucrado en la patología de numerosas enfermedades crónicas

inflamatorias tales como diabetes y gota; el antagonista de IL-1 α puede ser beneficioso en el tratamiento de estos trastornos(Groß *et al.*, 2012).

1.4.3 IL-10

IL-10 es también conocida como factor de inhibición de la síntesis de citocinas proinflamatorias(CSIF), por lo que es una citocina antiinflamatoria que inhibe macrófagos activados, también la secretan macrófagos activados, linfocitos T reguladores y células no linfoides (ej. queratinocitos, en general la producen todo tipo de células epiteliales).IL-10 inhibe la producción de IL-12 y TNF por macrófagos activados. Mientras que la IL-12 es un estímulo esencial para la secreción de IFN- γ y un inductor de las reacciones de la inmunidad innata y celular frente a microorganismos intracelulares. IL-10 actúa regulando de forma negativa todas estas reacciones; de hecho, IL-10 se descubrió como inhibidor de la producción de IFN- γ . IL-10 estimula la proliferación de células B humanas en cultivo, pero se desconoce la importancia fisiológica de esta acción (Thomson and Lotze, 2003). Además, IL-10 se une a dos cadenas de receptores IL-10R1 e IL-10R2. En 1993 el receptor IL-10R1 se identificó en ratón y en humano por clonación basado en su afinidad por IL-10(Ho *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994). La familia de las citocinas de IL-10 activa la vía de señalización de las Jak-STAT y STAT 3 es la llave del factor de transcripción que va del citosol al núcleo (Ouyang *et al.*, 2011; Takeda *et al.*, 1999).

1.4.4 TNF- α

Es el mediador principal de la respuesta inflamatoria aguda frente a las bacterias Gram negativas y a otros organismos infecciosos. En abscesos amibianos ocasionados

por *E. histolytica*, el efecto inmune del sistema colinérgico induce cambios en la producción de colágeno incrementando la producción de TNF- α (Sánchez-Alemán *et al.*, 2014) y de igual manera el TNF- α es responsable de muchas de las complicaciones sistémicas de las infecciones graves. La principal fuente celular de TNF- α son los macrófagos activados por LPS bacteriano, células T estimuladas por antígeno, células NK y mastocitos. La principal función del TNF- α es el reclutamiento de neutrófilos y monocitos en los focos de infección y la activación de estas células para erradicar microorganismos (Pacheco-Yépez *et al.*, 2011).

El TNF- α es una citocina de 17 kDa prototípica inflamatoria producida por varios tipos de células, incluyendo neuronales y gliales en el sistema nervioso central. El TNF- α se une a receptores TNF-R1 y TNF-R2 los cuales desencadenan la activación de otras citocinas que desempeñan funciones importantes en el desarrollo del dolor (Chen *et al.*, 2013). Hallazgos recientes han sugerido que el TNF- α puede actuar directamente sobre las neuronas aferentes primarias para inducir hipersensibilidad al dolor (Jin and Gereau, 2006).

1.4.5 IFN- γ

El IFN- γ es una citocina importante porque participa en la regulación de la respuesta inmune. En la inmunidad innata el IFN- γ juega un papel importante en el absceso hepático amebiano inducido en ratones SCID (alteración dirigida al gen del receptor de IFN- γ) (Seydel *et al.*, 2000). Los linfocitos T y las células NK activadas producen este tipo de interferón (Pestka *et al.*, 2004), así como las células NK activadas (Bernabei *et al.*, 2001; Calcagni and Elenkov, 2006). El IFN- γ es producido por las células Th1 y envía leucocitos al punto de infección dando como resultado una

inflamación. También estimula a macrófagos para eliminar bacterias que han sido fagocitadas (Kindt *et al.*, 2007). En la inmunidad adaptativa, los linfocitos T sintetizan IFN- γ en respuesta al reconocimiento del antígeno y su síntesis aumenta por la IL-12 y la IL-18. El receptor del IFN- γ está formado por dos polipéptidos homólogos estructuralmente que pertenecen a la familia del receptor de citocinas tipo II, denominados IFN γ R1 e IFN γ R2. El IFN- γ se une a IFN γ R1 e IFN γ R2, induce la heterodimerización lo cual se asocia a las kinasas JAK1 y JAK2, respectivamente (Abbas *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2013). La activación de estas enzimas da lugar a la fosforilación y dimerización de STAT1 a las secuencias GAS de las regiones reguladoras de varios genes y a la transcripción de los genes IFNs tipo I. Los genes inducidos por el IFN- γ codifican para diversas moléculas que participan en la potenciación de la respuesta inmune adaptativa y en la función efectora de los macrófagos. Diferentes genes sensibles a IFN- γ son activados por STAT1 o por STAT1 actuando junto con otros factores de transcripción, como el factor de respuesta al IFN-1 (IRF-1) y el transactivador de la clase II, que en sí mismos son inducidos por STAT1 (Abbas *et al.*, 2008).

1.5 Mecanismos de regulación del proceso inflamatorio ante *E. histolytica*

Los receptores tipo Toll (TLR) son una familia de 10 receptores que participan en el reconocimiento de patógenos a través de patrones moleculares conservados: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10 (Takeuchi and Akira, 2010). Los TLRs reconocen una variedad de ligandos, incluyendo a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) en unión a la inmunidad innata y adaptativa (Mogensen, 2009; Takeda and Akira, 2005). Estos receptores activan las

vías de transducción de señales, los cuales inducen la expresión de una variedad de genes de la respuesta inmune que promueven la respuesta inflamatoria a través de citocinas, así como el reclutamiento y la activación de los macrófagos, células dendríticas y antígenos específicos de linfocitos(Akira, 2003).

1.5.1 TLR4

El TLR4 es una proteína que está en humanos como receptor superficial en monocitos/macrófagos, células dendríticas, mieloides, mastocitos, linfocitos B y epitelio intestinal, es activado por lipopolisacaridos de las bacterias Gram negativas y tiene un papel importante en el sistema inmune innato(Buwitt-Beckmann *et al.*, 2006; Kawai and Akira, 2009). Este receptor es abundante en placenta y en una sub-población de monocitos y de igual manera se ha encontrado en la superficie del epitelio de ovarios normales y de tumores ováricos(Woods *et al.*, 2011). Los TLR, son el primer paso en la respuesta inflamatoria frente a patógenos, *E histolytica*, tiene una molécula de superficie con las características de un PAMP(Patrón Molecular Asociado a Patógenos). Esta molécula, que se denomina lipopeptidofosfoglicano (LPPG), se reconoce a través de TLR2 y TLR4e impiden el desarrollo del absceso hepático amebiano (Wong-Baeza *et al.*, 2010).

1.5.2 NF-kB.

El NF-kB es un complejo proteico que controla la transcripción de DNA, se encuentra en casi todo tipo de células animales y está implicado en respuestas celulares a estímulos por estrés, citocinas, radicales libres, radiación ultravioleta, LDL,

y antígenos bacterianos y virales (Albensi and Mattson, 2000; Freudenthal *et al.*, 1998; Meffert *et al.*, 2003). *E. histolytica* induce una respuesta inflamatoria y secreta abundantemente proteinasa de cisteína 5 (CP5) que estimula respuestas pro-inflamatorias mediada por NFκ-B. Regula la adhesión mediada por integrinas en las células del colon y representa un nuevo mecanismo en el que los trofozoítos de *E. histolytica* desencadenan una respuesta inflamatoria en la patogénesis de la amebiasis intestinal (Hou *et al.*, 2010).

1.5.3 STAT3

La proteína STAT3 pertenece a la familia de proteínas STAT. En presencia de citocinas y de factores de crecimiento, las proteínas STAT son fosforiladas por un receptor asociado a tirosina cinasas, lo que les permite formar un homodímero o heterodímero que se translocan al núcleo donde actúan como activadores de la transcripción (Silva, 2004). STAT3 actúa como mediador de la expresión de diversos genes en respuesta a determinados estímulos celulares y así juega un papel importante en multitud de procesos celulares tanto anti-apoptóticos como proliferativos (Yang *et al.*, 2007). STAT3 juega un papel importante en la tumorigénesis a través de la regulación positiva de genes implicados en la lucha contra la apoptosis, la proliferación y la angiogénesis. En el caso del carcinoma hepatocelular, los tratamientos farmacológicamente seguros y eficaces pueden bloquear la activación de STAT3 (Subramaniam *et al.*, 2013). Otras de las funciones de STAT3 son la estimulación de la proliferación de linfocitos B, y activación, diferenciación y crecimiento de monocitos (Levy and Lee, 2002). La interacción de los trofozoítos de *E. histolytica* con colágeno de tipo I y calcio induce una señalización desde la membrana a los núcleos que involucra algunos factores de

transcripción inducibles, lo cual facilita la invasión al huésped (Cruz-Vera *et al.*, 2003).

Estas vías de señalización activadas por *E. histolytica*, intervienen en el proceso de inflamación para la activación de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. El descubrimiento de la vía antiinflamatoria colinérgica, es un mecanismo por el cual el nervio vago (elemento fundamental que comunica el sistema nervioso parasimpático craneal con las vísceras torácicas y abdominales) modula la inflamación y evidencia una conexión entre el sistema nervioso autónomo y el sistema inmune (Rosas-Ballina and Tracey, 2009). La desregulación del NF- κ B está asociado con una variedad de enfermedades humanas, por ejemplo amibiasis, incluyendo enfermedades inflamatorias crónicas y cancer (Didonato J.A *et al.*, 2012). El lipopeptidofosfoglicano (LPPG) es un complejo de macromoléculas de la superficie de *E. histolytica* conocido como PAMP ya que es reconocido por el receptor TLR4 (Vivanco-Cid *et al.*, 2007).

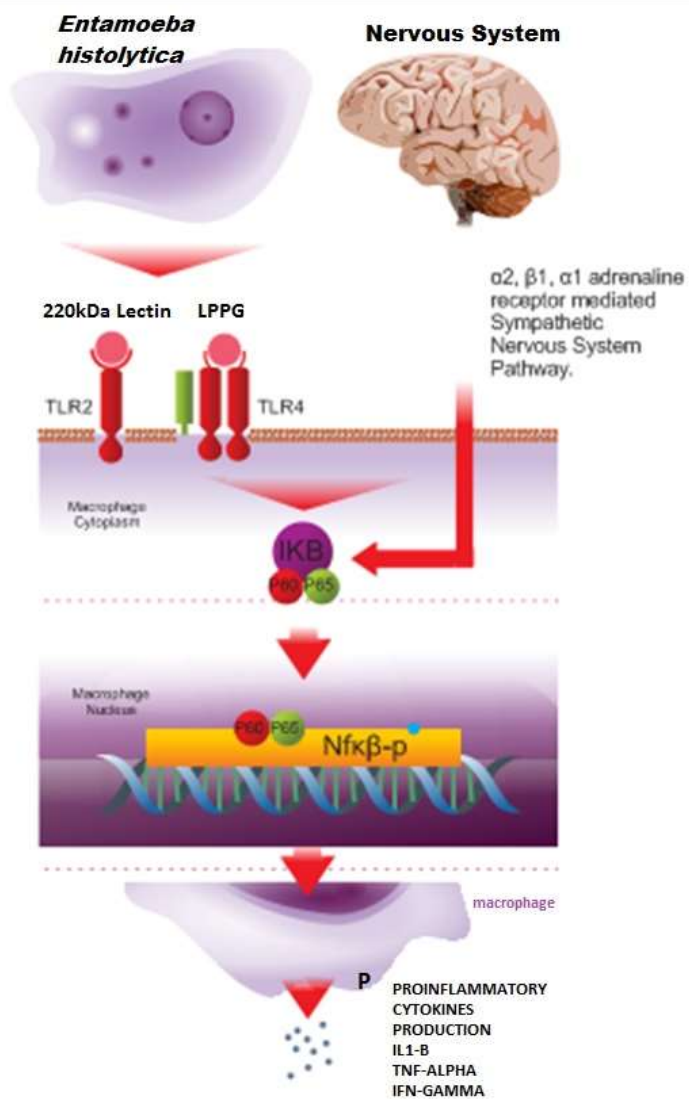


Figura 2. Esquema que muestra la interacción de *E. histolytica* con macrófagos y sus vías de activación para la producción de citocinas proinflamatorias

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Pueden los neurotransmisores regular la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IFN- γ y TNF- α) y anti-inflamatorias (IL-10), así como sus mecanismos intracelulares de activación, en neutrófilos y macrófagos expuestos a L220 KDa de *E. histolytica in vitro*?

3. HIPOTESIS

Los neurotransmisores adrenérgicos estimularán la producción de citocinas proinflamatorias en macrófagos y neutrófilos expuestos *in vitro* a L220 KDa de *E. histolytica* a través de TLR4 y NF- κ B, mientras que la acetilcolina estimulará la producción de citocinas anti-inflamatorias en este mismo escenario a través de STAT3.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto *in vitro* de neurotransmisores del sistema nervioso autónomo sobre la expresión de citocinas pro- y anti-inflamatorias, así como sus mecanismos intracelulares de activación, en macrófagos y neutrófilos humanos incubados con L220 kDa de *E. histolytica*.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Incubar macrófagos y neutrófilos humanos en presencia de L220 KDa de *E. histolytica* para determinar la concentración en sobrenadantes de IL-1 β , IFN- γ , IL-10 y TNF- α a 0,0.5, 4 y 8 horas por ELISA.
- Incubar macrófagos y neutrófilos humanos expuestos a L220 KDa de *E. histolytica* en presencia de epinefrina, esmolol, nicotina y bromuro de vecuronio para determinar la concentración en sobrenadantes de IL-1 β , IFN- γ , IL-10 y TNF- α a 0,0.5, 4 y 8 horas por ELISA.
- Analizar la activación de TLR4, NF κ -B y STAT3 en macrófagos y neutrófilos humanos expuestos a L220 KDa de *E. histolytica* en presencia de epinefrina, esmolol, nicotina y bromuro de vecuronio mediante inmunofluorescencia.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 CULTIVO DE *E. histolytica*

Los trofozoitos de *E. histolytica* fueron cultivados en condiciones axénicas a 36°C en un medio que contiene 7 mL de medio de cultivo TYI-S-33(Diamond, 1961), enriquecido con 1 mL de suero bovino adulto (Microlab SU-120) inactivado por 2 h a 37°C, 200 µL de vitaminas (Microlab M-2310) y 100 µL de antibac (Microlab MC-110). Además, se agregaron aproximadamente 0.5×10^6 amibas a cada tubo.

5.2 LECTINA DE 220 KDa.

Los trofozoitos de *E. histolytica* fueron lisados en Tris-HCl 50mM a un pH 6.8 conteniendo Tritón X-100 al 5 % más los siguientes inhibidores de proteasas N-ethylmaleimide (NEM) (5mM), N-tosyl-L-lisine chloromethyl ketone hydrochloride (TLCK) (5mM), Phenyl methanesulfonyl fluoride (PMCF) 5 mM, Iodoacetamida (3mM), Leupeptina (5 µM) y Aprotinina (0.1 µM), durante toda la noche. El lisado fue centrifugado $19,200 \times g$ por 30 min a 4 °C.

La purificación de la proteína de L220 kDa fue por cromatografía con Sepharosa 4B, descrita por Rosales Encina *et al.* 1987 y por electroelución. La identificación de la electroelución fue confirmada por inmunoblotting con el anticuerpo policlonal anti-L220.

El péptido de L220 fue generado por el método N-chlorosuccinimide-urea descrito por Lischwe and Ochs, la lectina de 220 kDa fue corrida en un gel preparativo de acrilamida al 5%, la banda de 220 kDa fue cortada y lavada en agua para comenzar a separar la lectina del gel mediante electroelución. Para determinar la pureza se requirió un ensayo que mida la cantidad de la proteína específica relativa a la cantidad

de proteínas totales, se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) un gel desnaturizante que separa las proteínas en función de su tamaño, es el utilizado con mayor frecuencia debido a que es fácil, económico y funciona para cualquier proteína (Ritchie, 2012)

5.3 MACROFAGOS Y NEUTRÓFILOS POR MÉTODO POR FICOLL E HISTOPAQUE PARA OBTENCIÓN DE NEUTRÓFILOS.

Las células se obtuvieron de estudiantes donadores voluntarios del laboratorio de Ciencias Morfológicas y de paquetes sanguíneos del Departamento de Donadores Voluntarios de la clínica 1 del IMSS de Aguascalientes. Las células se separaron a través de gradientes de densidad con Percoll e Histopaque, obteniendo dos halos blancos. Se trabajó con 16 tubos de ensaye colocando 2.5 ml de Histopaque-1119 marca Sigma–Aldrich y con mucho cuidado se agregaron otros 2.5 ml de Lymphoprep 1.077 marca Axis-Shield PoC AS. Finalmente, se agregaron 5 ml de sangre del paquete de glóbulos blancos de los donadores y se centrifugó a 2500 rpm por 45 min. En cada tubo hubo la separación de los dos halos blancos corresponden a la parte superior a las células mononucleares (macrófagos –monocitos) y en la parte inferior a los granulocitos (neutrófilos). Una vez separados los halos, se juntaron en un tubo de ensaye para hacer lavados de 5 min a 1500 rpm con PBS.

5.4 SEPARACIÓN DE CÉLULAS CON PERLAS

Una vez teniendo las células separadas macrófagos y neutrófilos, a los macrófagos les agregaron las perlas de separación CD14 de la marca Miltenyi biotec para separar macrófagos de linfocitos mediante el uso de columnas LS Miltenyi Biosec Lot No. 5090109141 y un magneto celular.

5.5 CUANTIFICACIÓN DE VIABILIDAD DE NEUTRÓFILOS Y MACRÓFAGOS

Con método de MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide marca Sigma-Aldrich cat M2128) se trabajó con aproximadamente 300,000 células por ml, se colocaron en cajas de cultivo de ELISA (96 pozos marca Corning Incorporated cat 3524) con medio RPMI, macrófagos y aparte neutrófilos (300,000 cel, por ml. por pozo) en tiempos de 0,1,6,12,24 y 48, una vez transcurrido el tiempo se le agregó la solución de MTT 0.4 mg por pozo, pasada una hora en incubación con MTT se hizo un lavado con PBS IX y se adicionó 200 µl de DMSO (dimetilsulfóxido marca Sigma-Aldrich cat D1435) por pozo para diluir el MTT. La densidad óptica se leyó en un espectrofotómetro a 595 nm.

5.6 INTERACCIÓN DE CÉLULAS

En cada pozo de la caja de cultivo se agregaron 300,000 macrófagos ó neutrófilos por 1 ml de medio RPMI. A los pozos que contienen los macrófagos se les agregó 0.3µl de MCSF (Peprotech cat. 300-25) e IL3 (Peprotech cat. 200-03) durante 48 hrs a 37°C, transcurrido el tiempo se comenzó con las interacciones en los tiempos de 0.30 min, 4 y 8 horas. Se trabajó con triplicas de las células con Medio RPMI (M) Medio + L220 2 µl por pozo (ML), Medio+ L220 + Epinefrina en una concentración de 10^{-5} M (MLE), Medio + L220 + Esmolol 10^{-5} M (MLES), Medio+L220+ Bromuro 10^{-5} M (MLB), Medio+L220+Nicotina 10^{-5} M (MLN) y las triplicas de cada tratamiento correspondiente. Al terminar las interacciones se dejaron incubar el tiempo correspondiente a cada experimentos, para después tomar el sobrenadante de cada pozo y se guardó a -20°C para posteriormente realizar la prueba de ELISA y a las células que quedaron en el fondo del pozo de cultivo se fijaron en Paraformaldehído al 2.5% en PBS para la realización de la Inmunofluorescencia.

5.7 ELISA

Se emplearon 4 kits de ELISA de la marca Peprotech para identificar citocinas de humano IFN- γ (Peprotech cat. 900-k27), IL-10 (Peprotech cat. 900- k21), IL1- β (Peprotech cat. 900-k47) y TNF- α (Peprotech cat. 900-k25). Se forró la placa con el anticuerpo de captura en una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Se agregó el buffer de bloqueo 1% de BSA. Se agregó el estándar y las muestras 100 μl , se forró la placa con el anticuerpo de detección en una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, se agregó la avidina peroxidasa 1:2000 del mismo kit de ELISA y se agregó el ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) para determinarse la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro iMark™ Microplate Absorbance Reader (catalog #168-1130) marca BIO-RAD.

5.8 INMUNOFLUORESCENCIA.

Una vez realizadas las interacciones, se removió el cubreobjetos de la caja de cultivo que contiene las células fijadas con paraformaldehído al 4% (marca Sigma-Aldrich), se decantó el paraformaldehído y las células se lavaron con Tritón X-100 0.1% en PBS IX 3 veces durante 5 minutos. Para después bloquear las uniones inespecíficas con suero fetal Bovino al 5% en Tritón X-100 0.1% en PBS durante 1 hr a temperatura ambiente. En el pozo correspondiente se realizó una doble inmunofluorescencia, se les agregó el primer anticuerpo Mouse anti-TLR4 abcam (ab22048). El anticuerpo se diluyó en albúmina Sérica Bovina (BSA) al 5 % en tritón X-100 0.1%+PBS. Se incubaron las células con 200 μl del anticuerpo primario 1:100 durante toda la noche a 4°C; después, se le agregó el anticuerpo secundario Goat anti-Mouse IgG+ rodamina Alexa Fluor 594 (Invitrogen cat A 11005). Se utilizó en una dilución

1:1000 y el anticuerpo se diluyó en Suero Fetal Bovino al 5% en PBS durante 2 hr a 37°C. Transcurrido el tiempo al mismo pozo se le agrega otro primer anticuerpo Rabbit anti- NF-KB p65 fosforilado (cat S536) diluido 1:100. El anticuerpo se diluyó en albúmina Sérica Bovina (BSA) al 5 % en tritón X-100 0.1%+PBS. Se incubaron las células con 200µl del segundo anticuerpo primario 1:100 durante toda la noche a 4°C. Después se le agregó el anticuerpo secundario Goat anti-Rabbit IgG+ fluoresceína Alexa Fluor 488 (Invitrogen cat A 1100). Se utilizó en una dilución 1:1000 y el anticuerpo se diluyó en Suero Fetal Bovino al 5% en PBS durante 2 hr a 37°C. Se lavó con PBS 3 veces por 5 minutos y agregó Hoechst 1X por 10 minutos. Se lavó el pozo con PBS 1X para finalmente sacar el cubreobjeto del pozo y cubrirlo con una gota de glicergel. A otros pozos se les agregó el anticuerpo primario Rabbit anti-STAT 3 abcam (ab83805). El anticuerpo se diluyó en albúmina Sérica Bovina (BSA) al 5 % en tritón X-100 0.1%+PBS. Se incubaron las células con 200µl. del anticuerpo primario 1:100 durante toda la noche a 4°C. Después se le agrega el anticuerpo secundario Goat anti-Rabbit IgG + fluoresceína Alexa Fluor 488 (Invitrogen cat A 1100). Se utilizó en una dilución 1:1000 y el anticuerpo se diluyó en Suero Fetal Bovino al 5% en PBS durante 2 hr a 37°C. Se lavó con PBS 3 veces por 5 minutos y agregar Hoechst 1X por 10 minutos. Se lavó el pozó con PBS 1X para finalmente sacar el cubreobjeto del pozo y cubrirlo con una gota de glicergel.

5.9 INTENSIDAD MEDIA FLUORESCENCIA EN PÍXELES.

Se trabajó con el Programa Análisis de Imágenes Imagen J se abrió la imagen a analizar en el mismo Programa, se activó la función de herramienta Pixel Inspección. El inspector de píxeles muestra los valores de una zona cuadrada alrededor de la posición actual del cursor en forma de tabla los valores se actualizan en tiempo real

cuando el ratón se arrastra sobre la imagen. Es útil para examinar cómo un filtro cambia los datos de píxeles. En la tabla de valores de píxel, columnas y encabezados de fila (X & posiciones y) se expresó en coordenadas de píxeles. La dirección del eje "y" se determinó por invertir coordenadas de valor de Y. La posición central se imprimió en rojo (valor x, y). La Escala de grises se numera en escalas de grises de 8 y 16 bits. Puede ser cruda [por defecto], calibrada, o hexadecimal (Hex). La lectura RGB fue numérica, R, G, B los tres, el valor de gris o escala de grises. El valor de escala de grises medio se determinó por los factores de ponderación indicados en Editar. Las tablas se copiaron como valores delimitados por tabuladores. Se realizó el análisis Estadístico con el Programa GraphPad Prisma, se obtuvo el error estándar y se analizaron los datos con la prueba de T de student con un valor de significancia de $p < 0.05$.

5.10 MÉTODO ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico de los datos consistió en construir una base de datos con las absorbancias, esas absorbancias se transformaron en concentraciones en pg/ml, dichas cantidades en picogramos de citocinas, se sometieron a tratamiento estadístico mediante el tratamiento cúbico polinomial (Herman et al, 2008). Previamente se hizo la prueba de Normalidad de los Datos y de base con línea, se aplicó a los Tratamientos la prueba de Kruskal Wallis, posteriormente se realizó una prueba post hoc de Kruskal-Nemenyi, con un valor de significancia estadística de $p < 0.05$. Para un análisis integral de la producción de citocinas en los ensayos de este tipo, los gráficos correspondientes se realizan con base a su expresión de los datos los cuales son normalizados respecto al control, y se expresó como porcentaje de concentración en relación al control.

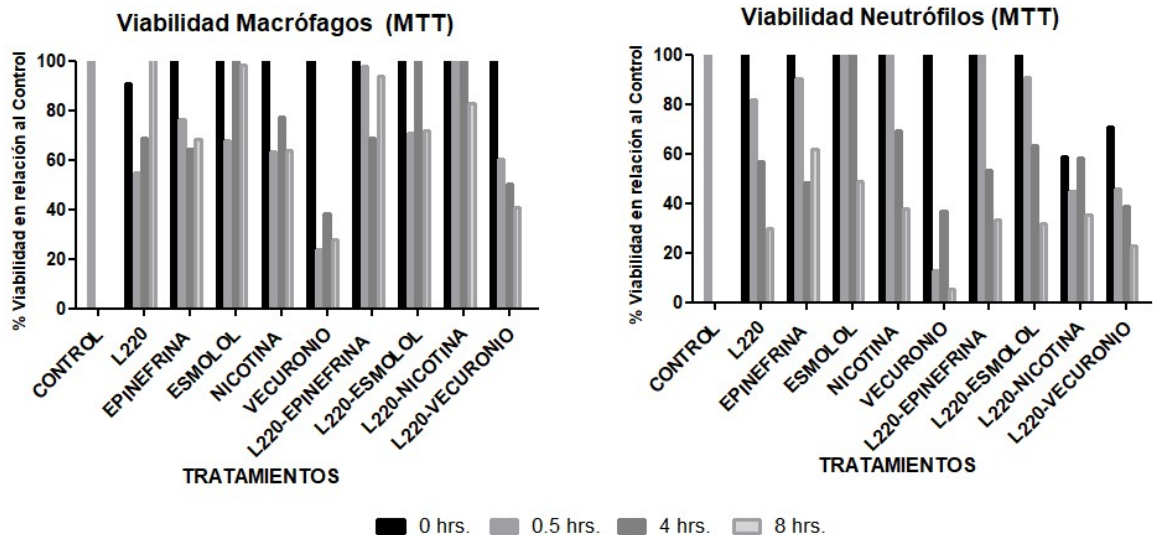
6. RESULTADOS

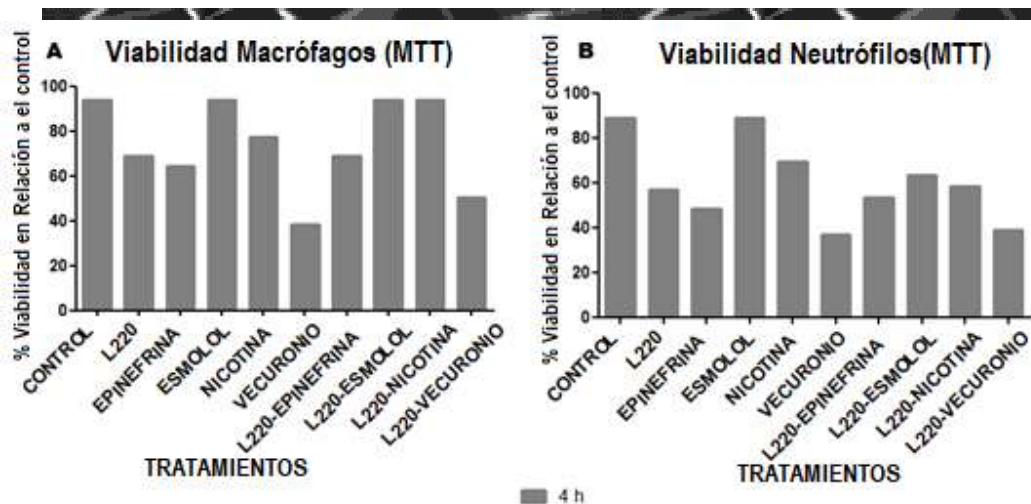
6.1 Obtención de lectina 220 kDa de *E. histolytica*

A partir de 10×10^7 trofozoítos en fase de crecimiento logarítmico, mediante el método de cromatografía y electroelución se obtuvo una concentración de $0.853 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de la L220 kDa purificada de *E. histolytica*.

6.2 Viabilidad de macrófagos y neutrófilos

Se trabajaron con 300,000 células (macrófagos y neutrófilos) por pozo, manteniendo una viabilidad del 90%, comprobado con azul tripano y MTT (reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), siendo las 4 horas en donde se ve un incremento constante (Gráfica1).

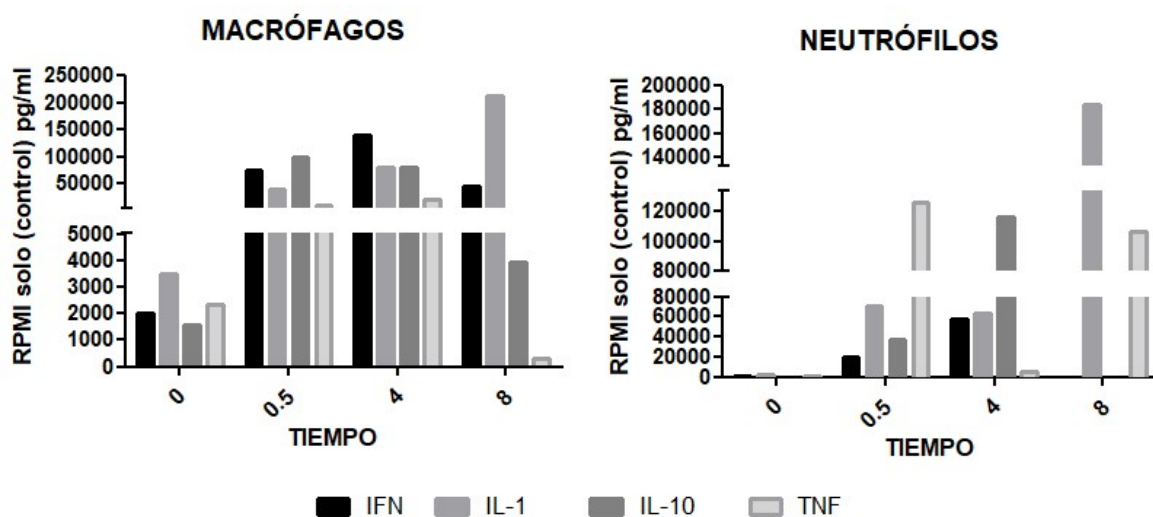




Gráfica 1. Porcentaje de viabilidad de macrófagos y neutrófilos cultivados en RPMI solo (control) y en tratamientos con L220 y neurotransmisores a las 4 h de interacciones mediante el ensayo de Viabilidad con MTT. (A) La viabilidad de los macrófagos estimulados por L220, epinefrina, nicotina, L220-epinefrina fue menor en un 60-70%, adicionalmente, cuando se estimuló con vecuronio así como con L220-vecuronio, la viabilidad disminuyó hasta 40-50%. Sin embargo, cuando entra en contacto con esmolol, L220-esmolol, así como L220-nicotina, la viabilidad no cambió durante el período de tiempo del estudio. (B) Los neutrófilos perdieron hasta un 55% de viabilidad cuando entraron en contacto con L220, epinefrina, nicotina, L220-epinefrina, L220-esmolol y L220-nicotina; cuando se incubaron con vecuronio y L220-vecuronio, la viabilidad disminuyó al 40%. Los tratamientos con esmolol no redujeron la viabilidad de los neutrófilos

6.3 Activación de macrófagos y neutrófilos.

Los macrófagos madurados y neutrófilos se incubaron con L220, epinefrina, esmolol, nicotina, bromuro de vecuronio y sus co-incubaciones: L220-epinefrina, L220-esmolol, L220-nicotina, L220-bromuro de vecuronio, a tiempos de 0, 0.5, 4 y 8 h. En las anteriores condiciones y al término de cada período, se tomaron los sobrenadantes celulares y se cuantificaron las citocinas IL-1 β , INF- γ , TNF- α e IL-10 (Gráfica 2 y Tabla 1).



Gráfica 2. Macrófagos y neutrófilos en interacción con citocinas en diferentes tiempos, se observa un incremento constante de IFN- γ e IL-1 β en macrófagos a diferencia de neutrófilos que fue aumentando según pasaba el tiempo.

IFN-γ Macrófagos										
TIEMPO	CONTROL	LECTINA	L-E	L-ES	L-N	L-B	EPINEFRINA	ESMOLOL	NICOTINA	VECURONIO
0	*2018.12	1979.77	1876.07	2079.52	1670.10	2139.06	2044.43	2044.04	*1839.01	1862.49
0.5	75707.28	111959.48	78643.14	113016.54	106232.00	98300.04	43668.81	70697.82	45365.99	65732.59
4	139335.54	159492.70	168009.27	123328.10	107403.04	76045.04	121134.52	104549.49	41411.42	94169.75
8	46582.60	83989.27	69987.58	60333.97	96800.90	78782.33	32575.28	36455.12	2834.88	40232.81
IFN-γ Neutrófilos										
TIEMPO	CONTROL	LECTINA	L-E	L-ES	L-N	L-B	EPINEFRINA	ESMOLOL	NICOTINA	VECURONIO
0	666.09	1004.20	521.12	1176.23	627.47	777.32	544.01	540.09	439.50	794.36
0.5	20147.26	20370.55	5331.02	37005.26	57.92	67751.54	44196.23	19434.64	4805.36	9.88
4	57136.13	72325.28	50684.90	13908.78	20294.48	20736.88	746.97	2589.02	44464.46	18679.92
8	29.95	7.64	0.02	100.26	7.83	38.19	11.47	12.44	6.60E-07	3.15E-05
IL-1β Macrófagos										
TIEMPO	CONTROL	LECTINA	L-E	L-ES	L-N	L-B	EPINEFRINA	ESMOLOL	NICOTINA	VECURONIO
0	3496.79	3118.54	3328.89	3003.09	3022.96	4154.78	4246.61	3207.97	3266.10	3760.73
0.5	39402.40	96178.27	96979.37	46480.90	45594.22	45077.72	501.03	289.12	21.83	2470.14
4	80890.97	145844.53	39123.02	153380.13	6037.42	49209.28	47405.74	1439.83	50121.86	108592.72
8	213051.73	284608.05	275145.09	301411.55	237087.97	157185.36	203428.23	196118.72	220283.75	139874.74
IL-1β Neutrófilos										
TIEMPO	CONTROL	LECTINA	L-E	L-ES	L-N	L-B	EPINEFRINA	ESMOLOL	NICOTINA	VECURONIO
0	2699.72	1890.93	2074.33	2817.04	1946.66	2363.15	2797.10	1522.50	2827.33	2805.08
0.5	70904.63	92889.39	90577.02	94826.93	98279.41	52412.74	98263.28	45820.92	4389.55	442.82
4	63679.90	95096.91	5251.89	23557.25	150.44	2153.68	168.53	93168.13	94103.25	756.42
8	184752.86	151995.24	136989.37	141312.33	138913.65	137166.96	139711.09	96613.14	139154.65	93911.61
IL-10 Macrófagos										
TIEMPO	CONTROL	LECTINA	L-E	L-ES	L-N	L-B	EPINEFRINA	ESMOLOL	NICOTINA	VECURONIO
0	1569.24	908.37	866.80	1328.68	431.03	1326.73	1280.45	1292.96	2765.80	1486.64
0.5	98395.76	130588.75	39278.59	209757.03	112243.45	87648.85	127798.95	73704.95	87964.17	58160.64
4	79701.45	145245.49	*175006.48	128506.23	1.62	*0.0005307	45090.92	456.87	43622.97	46743.53
8	*3952.86	& 42903.80	577.37	1.01	*105321.24	2.86E-08	\$4.435E-13	42744.01	90163.70	18.91
IL-10 Neutrófilos										
TIEMPO	CONTROL	LECTINA	L-E	L-ES	L-N	L-B	EPINEFRINA	ESMOLOL	NICOTINA	VECURONIO
0	0.0003519	3.40E-06	9.06E-07	1.73	0.092335	24.87	0.07	8.81E-06	434.51	0.000145
0.5	37229.18	201.51	41761.40	20.52	16820.94	104.75	1.07	452.56	48087.56	9.06
4	115766.51	228728.61	49529.38	132946.48	54022.16	137818.65	173322.06	68677.24	97209.22	42841.52
8	3.71E-05	28309.70	7.70E-13	44040.391	5.85E-20	8.65E-18	1.65E-16	1528.9279	2.32E-14	8.78E-15
TNF-α Macrófagos										
TIEMPO	CONTROL	LECTINA	L-E	L-ES	L-N	L-B	EPINEFRINA	ESMOLOL	NICOTINA	VECURONIO
0	*2340.00	2332.52	1995.36	2483.55	1337.87	*2590.64	1920.08	1749.33	1947.32	*1724.44
0.5	10897.88	49.10	86389.89	48978.81	1.76	2.04	28.90	47.93	56.85	7.18
4	& 22350.61	37012.26	75385.51	36528.19	& 1.412	& 2.165	105.56	29.14	28.56	20.45
8	287.21	34728.60	854.57	849.85	16.83	1214.02	0.04	36760.90	1923.79	1.26
TNF-α Neutrófilos										
TIEMPO	CONTROL	LECTINA	L-E	L-ES	L-N	L-B	EPINEFRINA	ESMOLOL	NICOTINA	VECURONIO
0	288.52	370.31	7.70	& 922.388	5.69	150.16	28.74	& 1.081	379.57	6.99
0.5	125962.16	130383.48	141726.38	145816.10	81831.20	120911.61	125060.55	137950.55	57662.60	52417.63
4	4881.02	42529.99	3740.64	36881.29	1746.22	49231.80	793.55	201.53	11718.45	334.41
8	106839.01	172321.85	127253.02	172142.11	124522.10	123847.96	128516.19	95812.93	68704.12	116323.87

Figura 3. Tablas de cuantificación de citocinas. Los promedios se expresan en pg / ml obtenidos de cada citocina por técnica de ELISA fueron 3 experimentos individuales y en cada prueba se hizo por triplicado. * = P < 0.05 & = P > = 0.05

LECTINA-EPINEFRINA = L-E; LECTINA-ESMOLOL=L-ES; LECTINA-NICOTINA=L-N; LECTINA-VECURONIO =L-B

6.4 ELISA

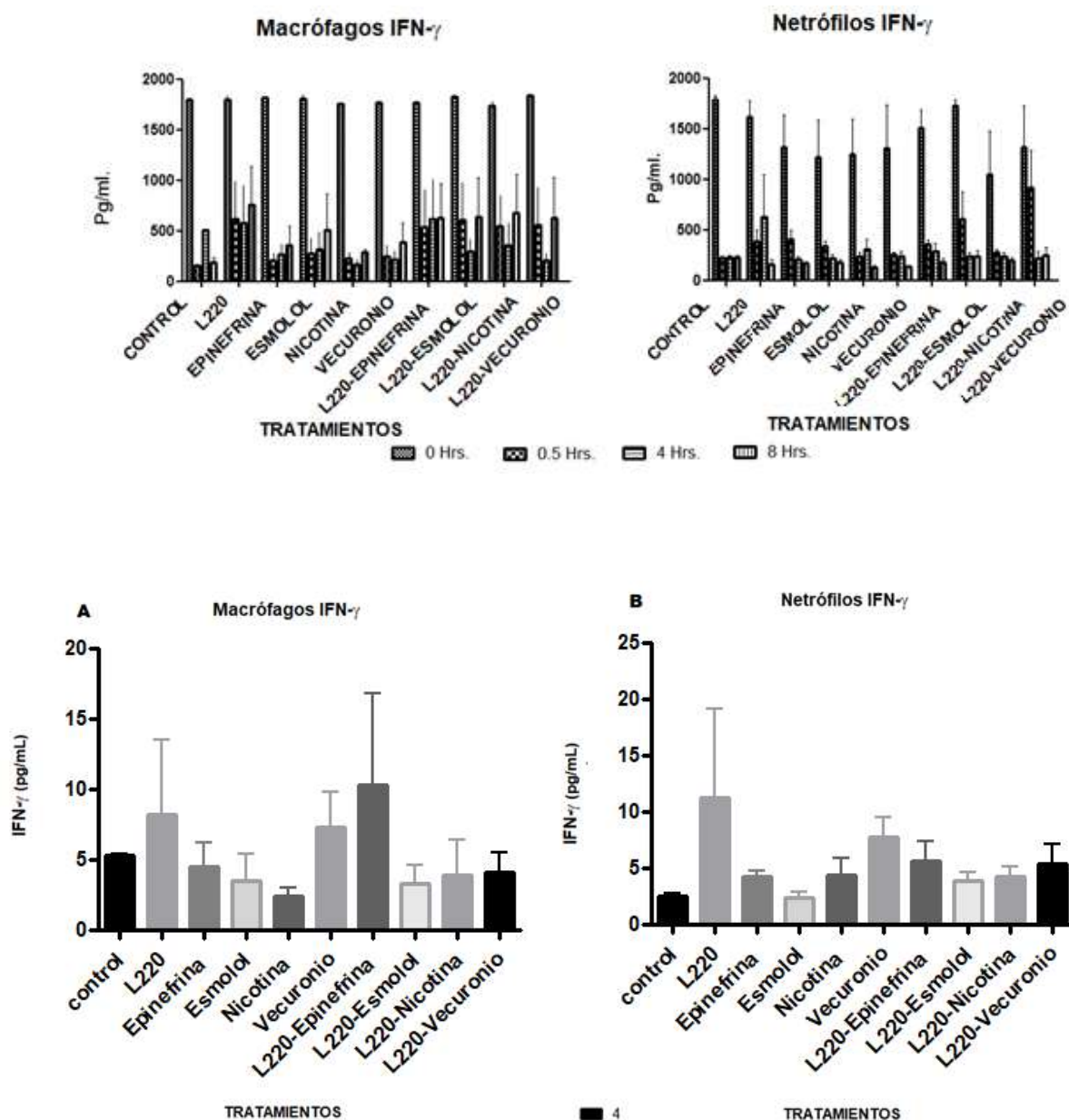
6.4.1 Efecto de la lectina de 220 kDa de *E. histolytica* y los neurotransmisores sobre la secreción de IFN- γ en macrófagos.

L220 tuvo un efecto estimulador constante y ascendente sobre la producción de IFN- γ en macrófagos a 0.5, 4h y 8h, a su vez, la epinefrina, esmolol y bromuro de vecuronio no tuvieron este efecto estimulador; Por su parte, la nicotina inhibió la secreción de IFN- γ desde las 0.5, 4 y 8 h, comparado con el tiempo 0 h y con su antagonista Bromuro de vecuronio. Las combinaciones de lectina-epinefrina, lectina-esmolol, lectina nicotina y lectina-vecuronium bromide estimularon ligeramente la secreción de INF gama a las 0.5 h, sin embargo, a las 4 h se inhibió la secreción, y nuevamente, a las 8 h se observó estimulación de dicha secreción (Gráfica 3). En las gráficas de 4 horas la secreción de IFN- γ fue generada por L220 y L220-epinefrina, sin embargo, esmolol, epinefrina, nicotina y vecuronio disminuyeron la secreción de esta citocina. Las combinaciones de L220 con neurotransmisores no tuvieron efecto sobre la función secretora de los macrófagos.

6.4.2 Efecto de la lectina de 220 kDa de *E. histolytica* y los neurotransmisores sobre la secreción de IFN- γ en neutrófilos.

La epinefrina y L220-esmolol tuvieron efecto secretor del INF- γ únicamente a las 0.5 h y a las 8 h respectivamente; por su parte, la combinación L220-bromuro estimuló la secreción de INF- γ por los neutrófilos únicamente a la 0.5 h; la nicotina y el bromuro de vecuronio inhibieron la secreción en todos los tiempos, la mezcla L220-epinefrina indujo inhibición a las 0.5 y 8 h; la mezcla L220-nicotina inhibió la secreción en todos

los tiempos (Gráfica 3). A las 4 horas, L220 indujo secreción de IFN- γ , los neurotransmisores y las mezclas de neurotransmisores con L220 no tuvieron efecto sobre la función secretora de IFN- γ (Gráfica 3).



Gráfica 3. Producción de IFN- γ por macrófagos y neutrófilos a las 4 h de cultivo. (A) La producción de IFN- γ en macrófagos se estudió en 3 experimentos independientes por triplicado en cada placa. La producción de IFN- γ tiende a aumentar bajo el estímulo de L220. Por otro lado, los neurotransmisores no modificaron de forma significativa la expresión de IFN- γ . (B) La producción de IFN- γ por neutrófilos fue inducida claramente por L220. Por el contrario, los

neurotransmisores no modificaron de forma significativa la producción de esta citocina en los neutrófilos. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba Kruskal mc posthoc y Kruskal Nemenyi. La significancia estadística se consideró con $p \leq 0.05$.

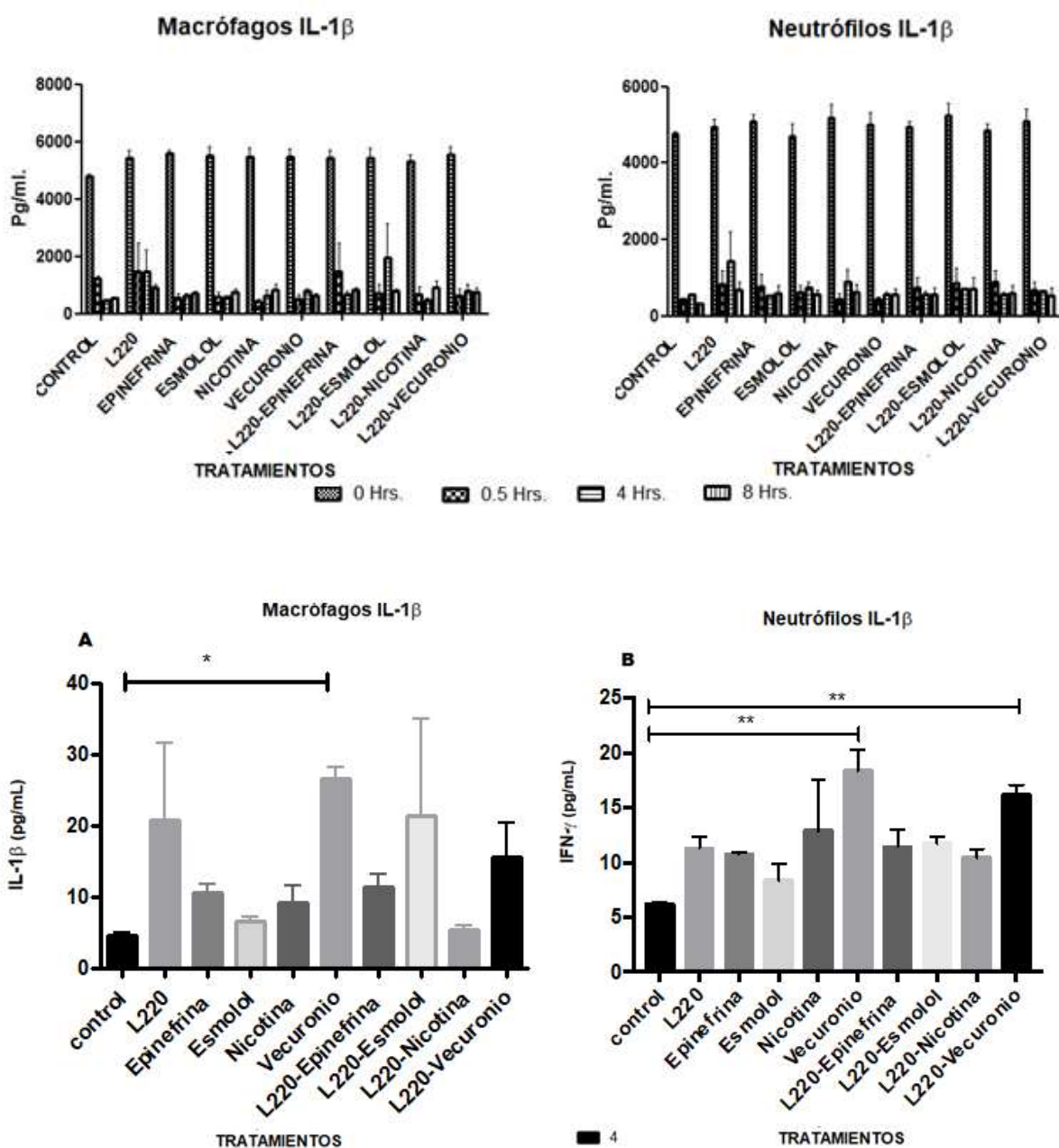
6.4.3 Efecto de la lectina de 220 kDa de *E. histolytica* y los neurotransmisores sobre la secreción de IL-1 β en macrófagos.

L220 estimuló la secreción de IL-1 β en macrófagos. La lectina tuvo un efecto estimulador sobre la secreción de IL-1 β de manera constante pero descendente con respecto al tiempo, pues a las 0.5 h, los macrófagos presentaron mayor producción de IL-1 β en contacto con L220. La epinefrina tuvo un efecto inhibitorio de la secreción a las 0.5 h, mientras que a las 4 y 8 h se recuperó dicha secreción. El esmolol que es un antagonista beta 1 adrenérgico, inhibió la secreción a las 0.5 y 4h, recuperándose a las 8h. La nicotina por su parte, también inhibió la secreción de IL-1 β a los 0.5 y a las 4 h, recuperándose a las 8h; el antagonista nicotínico Bromuro Vecuronio no modificó la secreción de IL-1 β en macrófagos a los distintos tiempos del estudio en comparación con L220 y el control. En las gráficas de 4 horas, L220 tuvo un efecto estimulante sobre la secreción de IL-1 β en macrófagos. La IL-1 β fue provocada por L220 y L220-esmolol, como puede verse, el esmolol tiene una tendencia a aumentar el efecto estimulador de L220 sobre la secreción de esta citocina (Gráfica 4)

6.4.4 Efecto de la lectina de 220 kDa de *E. histolytica* y los neurotransmisores sobre la secreción de IL-1 β en neutrófilos.

L220, epinefrina, L220-epinefrina, L220-esmolol y L220-nicotina tuvieron efecto estimulador de la secreción de IL-1 β a las 0.5 h, posteriormente, solo se observó que L220 indujo la secreción de IL-1 β en neutrófilos, por otro lado, epinefrina, nicotina y

bromuro de vecuronio inhibieron la secreción de IL-1 β a las 4h; el bromuro de vecuronio inhibió la secreción a las 0.5 y 4 h, a las 8 h no se observó efecto alguno. Finalmente, la mezcla lectina-bromuro de vecuronio no tuvo efecto sobre la secrecion de IL-1 β en los neutrófilos (Gráfica 4).



Gráfica 4. Producción de IL-1 β por macrófagos y neutrófilos a las 4 h de cultivo. (A) La producción de IL-1 β en macrófagos se estudió en 3 experimentos independientes por triplicado

en cada placa. La producción de IL-1 β aumentó de forma significativa en respuesta a L220, mientras que el esmolol potenció este efecto. (B) La producción de IL-1 β en neutrófilos fue inducida claramente por L220, mientras que el bromuro de vecuronio inhibió esta respuesta. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba Kruskal mc posthoc y Kruskal Nemenyi. La significancia estadística se consideró con $p \leq 0.05$.

6.4.5 Efecto de la lectina de 220 kDa de *E. histolytica* y los neurotransmisores

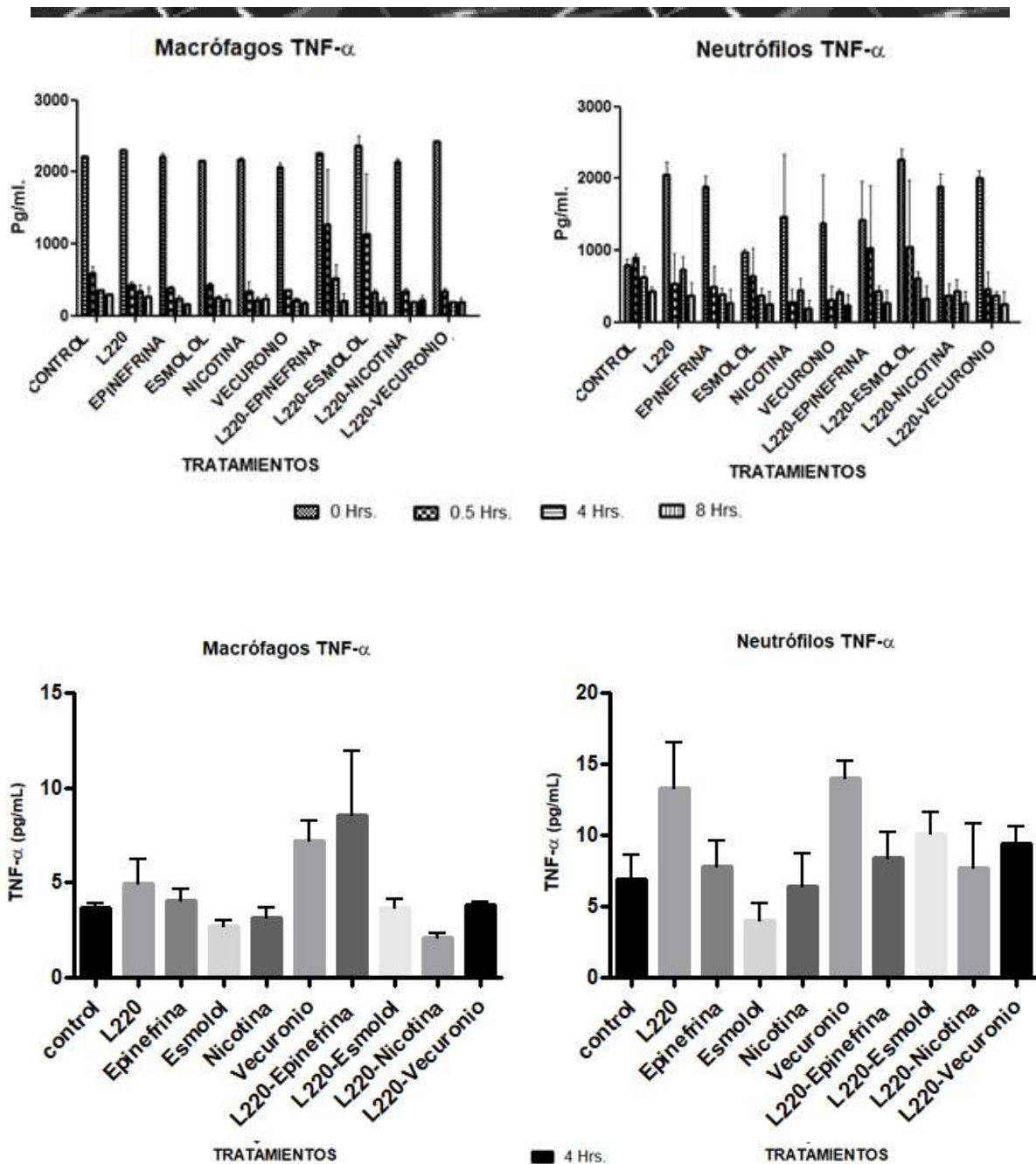
sobre la secreción de TNF- α en macrófagos.

L220 y neurotransmisores no tuvieron efecto en la producción de TNF- α en macrófagos. Solamente hubo secreción de TNF- α por los macrófagos a las 8 hrs en presencia de lectina y esmolol. La nicotina, bromuro de vecuronio, lectina-nicotina y lectina-bromuro de vecuronio no tuvieron efecto en la secreción de TNF en todos los tiempos estudiados (Gráfica 5).

6.4.6 Efecto de la lectina de 220 kDa de *E. histolytica* y los neurotransmisores

sobre la secreción de TNF- α en neutrófilos.

L220 y neurotransmisores estudiados no tuvieron efecto sobre la secreción de TNF- α en neutrófilos en comparación con el control a las 4 h. La nicotina, epinefrina y los antagonistas esmolol y bromuro de vecuronio no tuvieron efecto sobre la secreción de TNF- α con respecto al control (Figura 5).



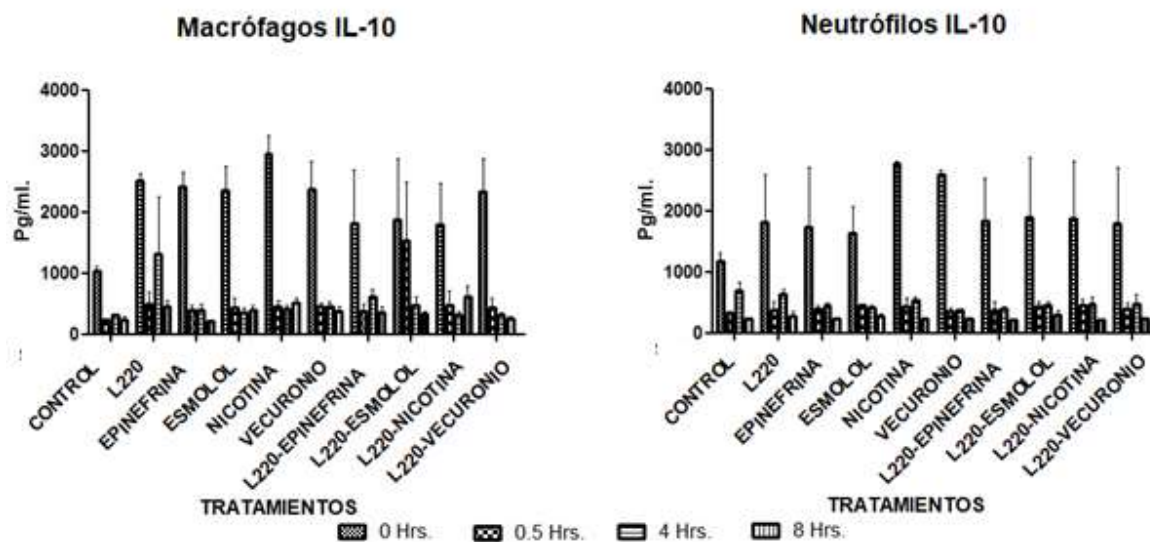
Gráfica 5. Producción de TNF- α por macrófagos y neutrófilos a las 4 h de cultivo. (A) La producción de TNF- α en macrófagos se estudió en 3 experimentos independientes por triplicado en cada placa. En macrófagos, la producción de TNF- α no fue modificada en respuesta a L220 ni en presencia de los neurotransmisores. (B) En neutrófilos, la producción de TNF- α no fue modificada en respuesta a L220 ni en presencia de los neurotransmisores. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba Kruskal mc posthoc y Kruskal Nemenyi. La significancia estadística se consideró con $p \leq 0.05$.

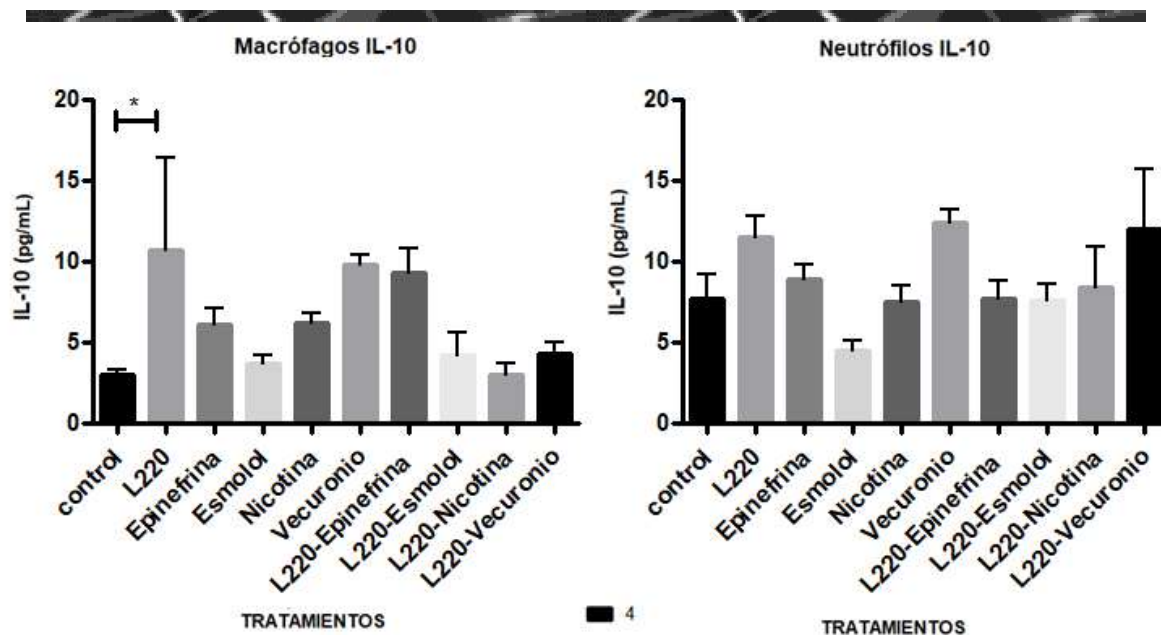
6.4.7 Efecto de la lectina de 220 kDa de *E. histolytica* y los neurotransmisores sobre la secreción de IL-10 en macrófagos.

El mayor efecto secretor lo tuvo la nicotina y la lectina-nicotina sobre la secreción de la IL-10. L220 solo provocó un ligero efecto estimulante sobre la secreción de IL-10 en macrófagos a las 4 h, sin embargo, el vecuronio inhibió la función secretora de IL-10 de L220 en el mismo tiempo (Gráfica 6).

6.4.8 Efecto de la lectina de 220 kDa de *E. histolytica* y los neurotransmisores sobre la secreción de IL-10 en neutrófilos.

L220 y L220-esmolol estimularon sobresalientemente la secreción de IL-10 a las 8 h (Figura 6). L220 y los neurotransmisores no tuvieron ningún efecto sobre la secreción de IL-10 en los neutrófilos en comparación con el control a las 4 h (Gráfica 6).





Gráfica 6. Producción de IL-10 por macrófagos y neutrófilos a las 4 h de cultivo. (A) La producción de IL-10 en macrófagos se estudió en 3 experimentos independientes por triplicado en cada placa. En macrófagos, la producción de IL-10 fue estimulada únicamente en respuesta a L220 pero no por los neurotransmisores. (B) En neutrófilos, la producción de IL-10 no fue modificada en respuesta a L220 ni en presencia de los neurotransmisores. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba Kruskal mc posthoc y Kruskal Nemenyi. La significancia estadística se consideró con $p \leq 0.05$.

6.5 FLUORESCENCIA

MACRÓFAGOS

6.5.1 EXPRESIÓN DE NFκ-B

L220 indujo disminución de la activación del NFκ-B a los 0.5 y 4h, la epinefrina no indujo cambios, mientras que esmolol tuvo el efecto activador a las 0.5 y 4h, al igual que el bromuro de vecuronio a los 0.5 y 8 h; por otra parte, la lectina-nicotina disminuyó considerablemente la expresión de NFκ-B a las 4 y 8 h.

6.5.2 EXPRESIÓN DE TLR4

L220 indujo mayor expresión de TLR4 en macrófagos a las 0 y 0.5 h de interacción, posteriormente observamos disminución a las 4 y 8 h. La epinefrina estimuló a las 4 hrs ligeramente dicha expresión. Por otra parte, el esmolol mostró mayor efecto sobre la expresión de TLR4 en macrófagos a las 4 y 8 h.

La nicotina y el bromuro de vecuronio no tuvieron efecto sobre la expresión de TLR4 en macrófagos.

6.5.3 EXPRESIÓN DE STAT3.

L220 estimuló la activación de STAT3 a las 8h, mientras que epinefrina y esmolol lo hicieron a tiempo mas temprano (0.5 h). La nicotina mostró un efecto estimulador sobresaliente a las 8h, bromuro de vecuronio estimulo a las 4 y 8 h.

Observamos que la lectina y el esmolol estimularon la expresión de TLR4 en macrófagos en los primeros tiempos, este aumento de la expresión desde las 0.5h,

coincide con la liberación temprana de las citocinas proinflamatorias INF- γ e IL-1 β , sin embargo, el NF κ -B se vió activado por el esmolol a las 0.5 y 4 h, mientras que el bromuro de vecuronio solo lo hizo a las 0.5 h. Por otro lado, el factor de transcripción STAT-3 se vió activado por la presencia de nicotina en mayor cantidad a las 8 h, lo cual coincide con mayor liberación de IL-10 por los macrófagos.

L220, epinefrina y esmolol indujeron mayor activación de STAT-3 a las 0.5 h, el efecto mas homogéneo se observó a las 8 hrs con todos los agonistas y antagonistas, sobresaliendo mas con la nicotina, lo cual se correlaciona con la liberación de IL-10 a

este tiempo, por su parte, el bromuro de vecuronio tuvo un efecto activador de STAT-3 a las 4 y 8h.

NEUTRÓFILOS

6.5.4 EXPRESIÓN DE TLR4.

L220, epinefrina, esmolol y bromuro de vecuronio indujeron mayor expresión de TLR4 a los 0.5 h de interacción comparado con el control 0h.

6.5.5 EXPRESIÓN DE Nfκ-B.

L220, epinefrina, esmolol, y bromuro de vecuronio indujeron mayor expresión del Nfκ-B a la 0.5 h, mientras que la nicotina solo tuvo este efecto estimulador a las 8 h.

6.5.6 EXPRESIÓN DE STAT3.

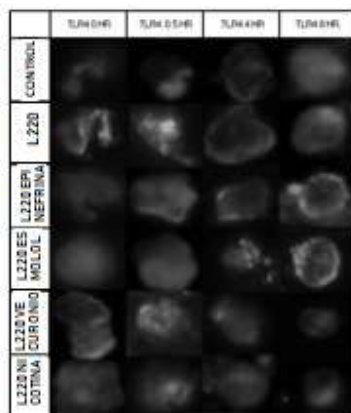
L220y L220-nicotina indujeron activación de STAT-3 tardíamente a las 8 h, bromuro de vecuronio a las 4 y 8 h, epinefrina lo hizo a las 0.5, 4 y 8 h, esmolol lo hizo a las 0.5 y 8 h, solo observamos coincidencia de la secreción de IL-10 por los neutrófilos mediante la activación tardía de STAT-3 por la nicotina.

L220 indujo aumento de la producción de INF-γ en neutrófilos a las 4 h, en menor medida lo hicieron la epinefrina y la lectina-epinefrina a las 0.5 h, coincidiendo con la expresión de TLR4 y NFκ-B a estos tiempos.

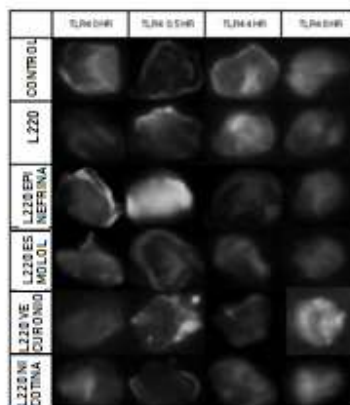
Por otra parte, cuando los neutrófilos se estimularon con nicotina, se expresó con mayor intensidad STAT-3 a las 8h y coincidió con mayor secreción de IL-10

TLR 4

MACRÓFAGOS

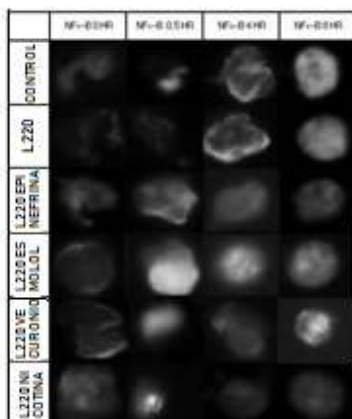


NEUTRÓFILOS

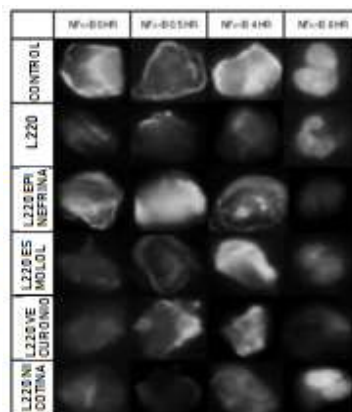


NF-kB

MACRÓFAGOS

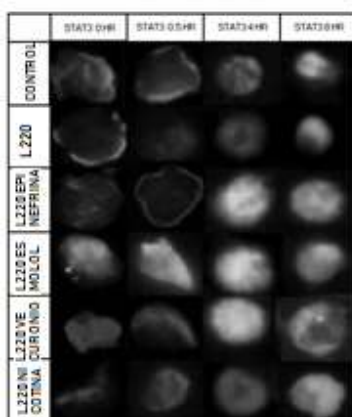


NEUTRÓFILOS



STAT 3

MACRÓFAGOS



NEUTRÓFILOS

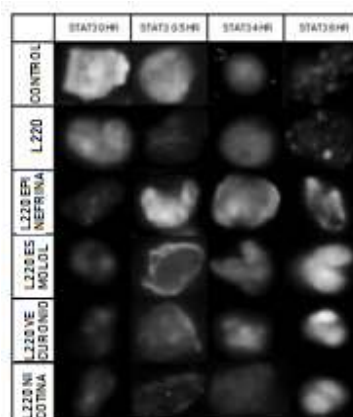
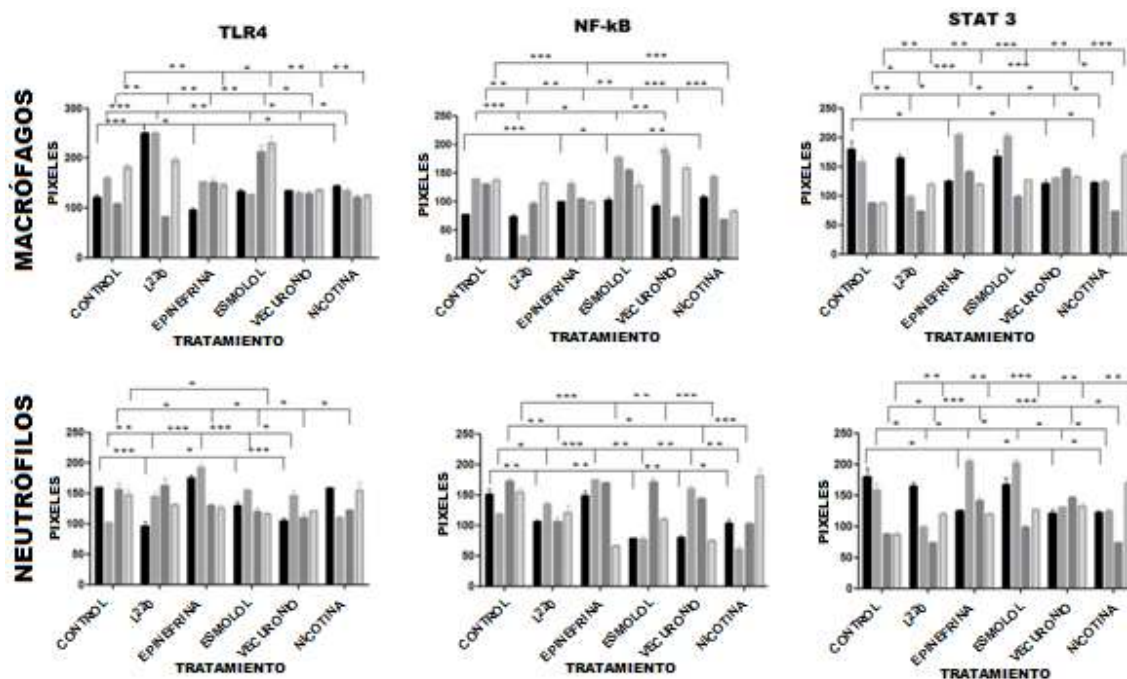


Figura 4. Inmunofluorescencia de mecanismos de activación en macrófagos y neutrófilos en tiempos de 0 ,0.5 min. 4 hrs y 8 hrs, en interacción con neurotransmisores agonistas y antagonistas.



Gráfica 7. Mecanismos de activación en macrófagos y neutrófilos en tiempos de 0 ,0.5. 4 y 8 h, en interacción con neurotransmisores agonistas y antagonistas.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo, se encontró que L220 de *E. histolytica* es estimulante para macrófagos humanos, principalmente porque estimula una respuesta secretora de citocinas proinflamatorias IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , y antiinflamatoria como IL-10. La neuroinmunomodulación del proceso de inflamación de la amibiasis apenas empieza a explorarse, el presente estudio se centró en un análisis *in vitro* de la respuesta de citocinas secretadas por los macrófagos humanos sanos y neutrófilos cuando se co-cultivaron con L220 de *E. histolytica* y se exploró la posibilidad de que esta respuesta podría ser modificada por la epinefrina o la nicotina o uno de sus antagonistas (esmolol o bromuro de vecuronio).

Ravdin *et al.*, en 1990 informaron por primera vez que tras la exposición antígenos de *E. histolytica*, los linfocitos de los pacientes tratados de absceso hepático amebiano (AHA) producen linfocinas que activan a los macrófagos derivados de monocitos para matara trofozoítos de *E. histolytica*. Además, se ha descrito que L220 es muy inmunogénica y las células de ratones inmunizados con péptidos inducen la proliferación celular, secretando IL-2 e IFN- γ , que muestra un patrón de células tipo TH1. Por el contrario, las células de ratones inmunizados con la molécula intacta de L220 secretan IL-4 e IL-10, típica de una subpoblación TH2 (Rosales-Encina *et al.*, 1987; Talamás-Rohana *et al.*, 1995), mientras que, Bekker-Méndez *et al.*, (2006) demostraron que L220 es capaz de regular negativamente a las citocinas proinflamatorias IL-5, IL-6, INF- γ y TNF- α en los leucocitos aislados de pacientes que previamente sufrieron de absceso hepático amebiano, lo que resulta en una respuesta anti-inflamatoria. Este último hecho, aunque aparentemente contradictorio con nuestros resultados, se puede explicar por la diferencia en las poblaciones estudiadas.

El citado estudio se llevó a cabo con los pacientes que sufrieron previamente AHA, y los autores proponen que la diferencia entre estos pacientes e individuos sanos puede ser debido a la predisposición genética del primer grupo de la amebiasis causada por deficiencias en sus macrófagos. El presente estudio se realizó con leucocitos de individuos sanos que respondieron al estímulo de L220, mostrando un aumento de la producción de IFN- γ , el mismo efecto se encontró en los controles sanos del estudio realizado por Bekker-Méndez *et al.*, (2006). La mayor producción de IFN- γ por los macrófagos está asociada con una mayor expresión de NF-kB y TLR4, que fue demostrado por Maldonado-Bernal *et al.*, (2005).

En los macrófagos humanos estimulados con lipopeptidofosfoligandos de *E. histolytica*, se encontraron con una mayor expresión de TLR2 y TLR4, así como un incremento en la expresión de NF-kB, lo que conduce a mayores niveles de IL-10, IL-12 y TNF- α . Sin embargo, se observó un efecto neuroinmunomodulador a través de la nicotina, este neurotransmisor activa el receptor $\alpha 7$ nicotínico en los macrófagos, como consecuencia, inhibe la secreción de IFN- γ (Rosas-Ballina and Tracey, 2009; Sternberg, 2006; Báez-Pagán *et al.*, 2015). En el presente estudio, la nicotina mostró un efecto neuroimmunomodulador sobre los neutrófilos, disminuyendo la secreción de IL-1 β . Se sabe que este neurotransmisor estimula los receptores $\alpha 7$ nicotínicos en un estudio en ratones knock-out para el receptor nicotínico alfa7 ($\alpha 7$ KO) en neutrófilos en la piel, provocó un aumento de la secreción de IL-1 β bajo estimulación con aceite de crotón (Gahring *et al.*, 2010). Los autores de estos estudios argumentaron que el reflejo antiinflamatorio de la vía colinérgica fue abolida. El esmolol synergizó con L220 para generar un aumento en la secreción de IL-1 β en los macrófagos a las 4 h, un efecto contrariamente al observado con la nicotina y el bromuro de vecuronio con respecto a neutrófilos.

Maldonado-Bernal *et al.*, (2005) observaron que la estimulación de los macrófagos humanos con el lipopéptidofosfolípido de *E. histolytica*, promueve un incremento de NF- κ B con una mayor secreción de citocinas proinflamatorias. Lo anterior indica que *in vitro*, L220 puede estar actuando por la misma vía (TLR2 y TLR4) que propone Maldonado Bernal *et al.*, (2005) para la secreción de IL-1 β y posiblemente también la activación de NF- κ B y para la secreción de IFN- γ , comportándose de este modo como un regulador del proceso inflamatorio agudo. Los resultados actuales indican que la L220 purificada actúa de manera similar *in vitro*, estimulando macrófagos para secretar IFN- γ , y posiblemente también activando NF- κ B. Además, nuestros resultados muestran que los macrófagos y neutrófilos secretan IL-1 β (citocina proinflamatoria) bajo estímulo por L220. De esta manera, L220 se comporta como un regulador del proceso inflamatorio agudo.

Otros estudios *in vitro* han indicado que las células mononucleares en presencia tanto de IFN- γ como de TGF- β disminuyen la capacidad de ataque celular de las amebas (Moraes *et al.*, 2015). Estos estudios enfatizan la importancia de regular el proceso inflamatorio (en individuos resistentes o farmacológicamente) para lograr una respuesta inmune exitosa a *E. histolytica*.

Además, Mortimer *et al.*, (2015) han demostrado que la lectina de superficie de 170-kDa Gal/GalNAc de *E. histolytica* (Gal-lectina) induce la activación del inflamasoma a través de un evento de contacto que depende de la participación de la unión del asociado a la superficie Gal-lectina a la membrana de macrófagos, lo que conduce a la liberación de IL-1 β , por lo que atrae más células inflamatorias a donde están las amebas.

Se sabe que la secreción de IL-1 β se inhibe por una vía β -adrenérgica mientras que

es promovida por α -adrenérgico (Engler *et al.*, 2005). Se encontró que la secreción de IL-1 β fue estimulada con lectina-esmolol; debido a que el esmolol tiene un efecto inhibitor sobre los receptores beta-adrenérgicos (Jay and Chow, 1995; Zhou *et al.*, 2014). L220 provocó la secreción de IL-1 β por neutrófilos humanos, este hecho fue publicado previamente por Tecchio *et al.*, (2014), en donde se menciona que los neutrófilos tienen la capacidad de producir y secretar un amplio número de citocinas proinflamatorias, entre ellas la IL-1 β para actuar en procesos patológicos que incluyen procesos inflamatorios e infecciosos. Analizando el papel de los neutrófilos, *in vivo*, son mayoría en el proceso inflamatorio e infeccioso en los tejidos, y con frecuencia superan a los leucocitos mononucleares en uno o dos órdenes de magnitud. Por lo tanto, el hecho de que los neutrófilos predominan claramente sobre otros tipos de células bajo diversas condiciones *in vivo* sugiere que, en esas circunstancias, la contribución de las citocinas derivadas de neutrófilos puede ser de suma importancia (Tecchio *et al.*, 2014). En este contexto, y de acuerdo con nuestros resultados, esmolol y vecuronio modulan la función secretora de L220 en neutrófilos para secretar IL-1 β .

Anteriormente se demostró en un modelo de absceso hepático amebiano en hámster que los neutrófilos y los macrófagos infiltrados en el hígado en la fase aguda fueron positivos para TNF- α y IFN- γ , dicha positividad fue transitoria y disminuyó conforme el daño tisular progresó (Pacheco-Yépez *et al.*, 2011). TNF- α también podría actuar como quimioatrayente para *E. histolytica* (Blazquez *et al.*, 2006). Los estudios *in vitro* han demostrado que el TNF- α induce la producción de óxido nítrico (NO) por macrófagos, que es citotóxico para *E. histolytica* (Lin *et al.*, 1995). Se observó que la secreción de TNF- α por los macrófagos y neutrófilos no fue modificada por L220 ni por los neurotransmisores. La secreción de IL-10 se produjo en macrófagos por L220 y

neutrófilos. La secreción de citocina IL-10 es muy importante en la susceptibilidad de la amebiasis. Sierra-Puente *et al.*, (2009) describieron que esta citocina se expresa intensamente en las células epiteliales de la mucosa del colon afectado por *E. histolytica*. El número de células positivas a IL-10 fue significativamente mayor en la mucosa de pacientes con colitis amebiana fulminante que en mucosa sana. Además, Lejeune *et al.*, (2009) publicaron un estudio en Togo, África occidental, que los pacientes coinfectados con *E. histolytica* y *E. dispar*, *Necator americanus* y *Mansonella perstans* tuvieron niveles elevados de la citocina antiinflamatoria IL-10. En nuestro estudio, la secreción de IL-10 por macrófagos fue estimulada por L220, nicotina y L220- nicotina, mientras que los neutrófilos se estimularon con L220 y L220- esmolol, con una secreción más alta en 4 h. El efecto de L220 en estimular a la secreción de IL-10 se ha demostrado por Rosales-Encina *et al.*, (1987) y por Talamás-Rohana *et al.*, (1995) como una función inmunomoduladora, mientras que el mecanismo de acción de la nicotina es por la estimulación del receptor nicotínico de la acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChR$) en macrófagos y neutrófilos; este proceso que se ha descrito ampliamente como la vía colinérgica antiinflamatoria (Báez-Pagán *et al.*, 2015). Por esta ruta, la nicotina inhibe la secreción de IFN- γ como hemos visto en nuestros resultados. También, L220 y L220-epinefrina estimularon la expresión de NFk-B y TLR4, en tanto que la nicotina inhibe dicha expresión. *E. histolytica* induce una respuesta pro-inflamatoria mediada por NFk-B (Hou *et al.*, 2010; Mortimer *et al.*, 2015). STAT-3 es una vía de señalización que interviene en la estimulación de la proliferación de linfocitos B, así como en la activación, la diferenciación y el crecimiento de los monocitos (Levy and Lee, 2002). Por otro lado, nicotina estimula esta expresión de STAT-3, que representa la vía de señalización que conduce la producción intracelular de IL-10 (Niemand *et al.*, 2003; Báez-Pagán *et al.*, 2015).

En un modelo de hámster de absceso hepático amebiano, se ha demostrado que el proceso inflamatorio por *E. histolytica* puede ser modulado por el sistema nervioso simpático y parasimpático (Muñoz-Ortega *et al.*, 2011; Sánchez-Alemán *et al.*, 2015).

Por otra parte, en animales vagotomizados, se detectó aumento sérico de IFN- γ y de IL-10, así como el aumento de células productoras de estas citocinas en el hígado inoculado con trofozoitos de *E. histolytica*, lo que indicó que en ausencia de inervación colinérgica, los macrófagos y neutrófilos produjeron alta cantidad de estas citocinas proinflamatoria y antiinflamatoria.

La mezcla L220-esmolol fue estimulante de la secreción de IL-1 β , en este caso el efecto fue de la L220, pues el esmolol solo tuvo efecto inhibitor de la secreción de esta citocina, sugiriendo que los receptores β - adrenérgicos están involucrados en la estimulación de los macrófagos para la secreción de IL-1 β , como lo han publicado (Jay and Chow, 1995; Zhou *et al.*, 2014).

8. CONCLUSIONES

1.- L220 de *E. histolytica* induce la secreción de IL-1 β , INF- γ e IL-10 en macrófagos y neutrófilos humanos *in vitro*.

2.- El efecto estimulador de L220 puede ser modulado a la baja por adrenalina en macrófagos, y por nicotina en neutrófilos.

3.- La activación de TLR 4 y STAT3 parece mediar la secreción de IL-1 β , INF- γ e IL-10 en macrófagos y neutrófilos humanos *in vitro*.

9. LITERATURA

Abbas, K., Lichtman, H.A., and Pillai, S. (2008). *Inmunología celular y molecular* (España: Mc Graw- Hill).

Akira, S. (2003). Toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 38105–38108.

Albensi, B.C., and Mattson, M.P. (2000). Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synap. N. Y. N* 35, 151–159.

Almendras, M., Patricia, C., Herveg, J.P., and Iriarte, M. (2006). DETECCIÓN Y diferenciación de *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* mediante reacción en cadena de la polimerasa (pcr) usando dna extraído de quistes presentes en muestras de heces fecales humanas. *Gac. Médica Boliv.* 29, 5–10.

Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 459–489.

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

Báez-Pagán, C.A., Delgado-Vélez, M., and Lasalde-Dominicci, J.A. (2015). Activation of the Macrophage $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor and Control of Inflammation. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.*

Bancos, S., Stevens, D.L., and Tyner, K.M. (2015). Effect of silica and gold nanoparticles on macrophage proliferation, activation markers, cytokine production, and phagocytosis in vitro. *Int. J. Nanomedicine* 10, 183–206.

Bekker-Mendez VC1, Pérez-Castillo VL, Rico-Rosillo MG, Pérez-Rodríguez M, Arellano-Blanco J, Kretschmer-Schmid RR, and Talamás-Rohana P. (2006). Downregulation of selected cytokines in amebiasis. *Arch Med Res.* 37, 556–558.

Berczi, I., Bertók, L., and Chow, D.A. (2000). Natural immunity and neuroimmune host defense. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917, 248–257.

Bernabei, P., Allione, A., Rigamonti, L., Bosticardo, M., Losana, G., Borghi, I., Forni, G., and Novelli, F. (2001). Regulation of interferon-gamma receptor (INF-gammaR) chains: a peculiar way to rule the life and death of human lymphocytes. *Eur. Cytokine Netw.* 12, 6–14.

Blazquez, S., Zimmer, C., Guigon, G., Olivo-Marin, J.-C., Guillén, N., and Labruyère, E. (2006). Human Tumor Necrosis Factor is a Chemoattractant for the Parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 74, 1407.

Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., and Tracey, K.J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458–462.

Botero, D, and Restrepo, M (1992). *Parasitosis Humana* (Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas).

Brinkmann, V., Laube, B., Abu Abed, U., Goosmann, C., and Zychlinsky, A. (2010a). Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J. Vis. Exp. JoVE.*

Brinkmann, V., Laube, B., Abu Abed, U., Goosmann, C., and Zychlinsky, A. (2010b). Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J. Vis. Exp. JoVE*.

Bugajski, A., Zurowski, D., Thor, A., and Gadek-Michalska, A. (2007). Effect of subdiaphragmatic vagotomy and cholinergic agents in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J Physiol Pharmacol* 335–347.

Buwitt-Beckmann, U., Heine, H., Wiesmüller, K.-H., Jung, G., Brock, R., Akira, S., and Ulmer, A.J. (2006). TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. *J. Biol. Chem.* 281, 9049–9057.

Calcagni, E., and Elenkov, I. (2006). Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1069, 62–76.

Campbell, D., and Chadee, K. (1997). Interleukin (IL)-2, IL-4, and tumor necrosis factor-alpha responses during *Entamoeba histolytica* liver abscess development in gerbils. *J. Infect. Dis.* 175, 1176–1183.

Chadee, K., Meerovitch, E., and Moreau, F. (1985). In vitro and in vivo interaction between trophozoites of *Entamoeba histolytica* and gerbil lymphoid cells. *Infect. Immun.* 49, 828–832.

Chávez-munguía, B., CastañÓN, G., Hernández-Ramírez, V., González-LÁZARO, MÓN., TalamÁS-Rohana, P., and Martínez-Palomo, A. (2012). *Entamoeba histolytica* electron dense granules secretion in vitro and in vivo: Ultrastructural study. *Microsc. Res. Tech.* 75, 189–196.

Chawla, A., Nguyen, K.D., and Goh, Y.P.S. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 738–749.

Chen, J., Song, Y., Yang, J., Zhang, Y., Zhao, P., Zhu, X.-J., and Su, H.-C. (2013). The contribution of TNF- α in the amygdala to anxiety in mice with persistent inflammatory pain. *Neurosci. Lett.* 541, 275–280.

Clark, C.G., Cantellano, M.E., and Bhattacharya, A. (2000). *Entamoeba histolytica*: an overview of the biology of the organism. *Amebiasis.* 1–45.

Corre, D., A, M., and Rojas López, M. (2007). Activación alternativa del macrófago: la diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunol.* 1987 73–86.

Cruz-Vera, J., Clara, L., Hernández-Kelly, R., Alfredo Méndez, J., Pérez-Salazar, E., and Ortega, A. (2003). Collagen-induced STAT family members activation in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *FEMS Microbiol. Lett.* 229, 203–209.

Cuenca-López, M.D, Segura, T., Galindo, M.F, Antón-Martínez D, Agulla, J, Castillo, J, Jordán, J., Jordán, J., and Brea, D (2010). La inflamación como agente terapéutico en el infarto cerebral: respuesta inflamatoria celular y mediadores inflamatorios. *50 6,* 349–359.

Denis, M., and Chadee, K. (1989). Cytokine activation of murine macrophages for in vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* 57, 1750–1756.

Dhabhar, F.S., Malarkey, W.B., Neri, E., and McEwen, B.S. (2012). Stress-induced redistribution of immune cells—from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones—Curt Richter Award winner. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1345–1368.

Diamond, L.S. (1961). Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science* 134, 336–337.

Didonato J.A, Mercurio F., and Karin M. (2012). NF- κ B and the link between inflammation and cancer. *Immunol. Rev.* 379–400.

Dunn, A.J., and Swiergiel, A.H. (2008). Effects of Acute and Chronic Stressors and CRF in Rat and Mouse Tests for Depression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1148, 118–126.

Engler, K.L., Rudd, M.L., Ryan, J.J., Stewart, J.K., and Fischer-Stenger, K. (2005). Autocrine actions of macrophage-derived catecholamines on interleukin-1 beta. *J. Neuroimmunol.* 160, 87–91.

Espinosa-Cantellano, M., and Martínez-Palomo, A. (2000). Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 318–331.

Flierl, M.A., Rittirsch, D., Nadeau, B.A., Sarma, J.V., Day, D.E., Lentsch, A.B., Huber-Lang, M.S., and Ward, P.A. (2009). Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response. *PloS One* 4, e4414.

Freudenthal, R., Locatelli, F., Hermitte, G., Maldonado, H., Lafourcade, C., Delorenzi, A., and Romano, A. (1998). Kappa-B like DNA-binding activity is enhanced after spaced training that induces long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neurosci. Lett.* 242, 143–146.

Gahring, L.C., Osborne, A.V., Reed, M., and Rogers, S.W. (2010). Neuronal nicotinic α 7 receptors modulate early neutrophil infiltration to sites of skin inflammation. *J. Neuroinflammation* 7, 38.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656–661.

Giraldo, E., Multhoff, G., and Ortega, E. (2010). Noradrenaline increases the expression and release of Hsp72 by human neutrophils. *Brain. Behav. Immun.* 24, 672–677.

Gordon, J.K., and Blobel, C.G. (2008). Role of transforming growth factor- β superfamily signaling pathways in human disease. *Acta Biochimica et Biophysica* 197–228.

Gosain, A., Gamelli, R.L., and DiPietro, L.A. (2009). Norepinephrine-mediated suppression of phagocytosis by wound neutrophils. *J. Surg. Res.* 152, 311–318.

Grando, S.A. (2006). Cholinergic control of epidermal cohesion. *Exp. Dermatol.* 15, 265–282.

Grisanti, L.A., Woster, A.P., Dahlman, J., Sauter, E.R., Combs, C.K., and Porter, J.E. (2011). Adrenergic Receptors Positively Regulate Toll-Like Receptor Cytokine Production from Human Monocytes and Macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338, 648–657.

Groß, O., Yazdi, S., Thomas, J., Masin, M., Heinz, X., Guarda, G., Quadroni, M., Drexler, K., and Tschopp, J. (2012). Inflammasome Activators Induce Interleukin-1 α Secretion via Distinct Pathways with Differential Requirement for the Protease Function of Caspase-1. *Cell Press* 36, 388–400.

Hao, J., Zhang, Y., Lv, X., Xu, N., Liu, Q., Zhao, S., Feng, X., Xing, L., Kang, P., Li, G., et al. (2013). IFN- γ induces lipogenesis in mouse mesangial cells via the JAK2/STAT1 pathway. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 304, C760–C767.

-
- Hernández, U., and Alvarado, N.A. (2001). Interleucinas e inmunidad innata. Centro de Investigación de Inmunología y Dermatología. Interleucinas E Inmun. Innata Cent. Investig. Inmunol. Dermatol. 12, 272–280.
- Ho, A.S., Liu, Y., Khan, T.A., Hsu, D.H., Bazan, J.F., and Moore, K.W. (1993). A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 11267–11271.
- Hou, Y., Mortimer, L., and Chadee, K. (2010). Entamoeba histolytica cysteine proteinase 5 binds integrin on colonic cells and stimulates NFkappaB-mediated pro-inflammatory responses. J. Biol. Chem. 285, 35497–35504.
- Jay, G.T., and Chow, M.S. (1995). Interaction of epinephrine and beta-blockers. JAMA 274, 1830, 1832.
- Jin, X., and Gereau, R.W. (2006). Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 26, 246–255.
- Kawai, T., and Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. Int. Immunol. 21, 317–337.
- Kindt, J., Goldsby, A.R., and Osborne, A.. (2007). Immunología de Kuby (México: Mc Graw-Hill Interamericana editores S.A de C.V).
- Kurzen, H., Berger, H., Jäger, C., Hartschuh, W., Näher, H., Gratchev, A., Goerdts, S., and Deichmann, M. (2004). Phenotypical and molecular profiling of the extraneuronal cholinergic system of the skin. J. Invest. Dermatol. 123, 937–949.
- Lejeune, M., Rybicka, J.M., and Chadee, K. (2009). Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward Entamoeba histolytica. Future Microbiol. 4, 105–118.
- Letterio, J.J., and Roberts, A.B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. Annu. Rev. Immunol. 16, 137–161.
- Levy, D.E., and Lee, C. (2002). What does Stat3 do? J. Clin. Invest. 109, 1143–1148.
- Ley, S., Weigert, A., and Brüne, B. (2010). Neuromediators in inflammation--a macrophage/nerve connection. Immunobiology 215, 674–684.
- Lin, J.Y., Seguin, R., Keller, K., and Chadee, K. (1995). Transforming growth factor-beta 1 primes macrophages for enhanced expression of the nitric oxide synthase gene for nitric oxide-dependent cytotoxicity against Entamoeba histolytica. Immunology 85, 400–407.
- Liu, G., and Yang, H. (2013). Modulation of macrophage activation and programming in immunity. J. Cell. Physiol. 228, 502–512.
- Liu, Y., Wei, S.H., Ho, A.S., de Waal Malefyt, R., and Moore, K.W. (1994). Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. J. Immunol. Baltim. Md 1950 152, 1821–1829.
- Maldonado-Bernal, C., Kirschning, C.J., Rosenstein, Y., Rocha, L.M., Rios-Sarabia, N., Espinosa-Cantellano, M., Becker, I., Estrada, I., Salazar-González, R.M., López-Macías, C., et al. (2005). The innate immune response to Entamoeba histolytica lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. Parasite Immunol. 27, 127–137.

Martinez, F.O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451–483.

Martínez-Palomo, A. (1987). The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitol. Today Pers. Ed* 3, 111–118.

Meffert, M.K., Chang, J.M., Wiltgen, B.J., Fanselow, M.S., and Baltimore, D. (2003). NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat. Neurosci.* 6, 1072–1078.

Mogensen, T.H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 240–273, Table of Contents.

Moonah SN, Abhyankar MM, Haque R, and Petri WA Jr (2014). The macrophage migration inhibitory factor homolog of *Entamoeba histolytica* binds to and immunomodulates host macrophages. *Infect Immun.* 82, 3523–3530.

Moraes, L.C.A., França, E.L., Pessoa, R.S., Fagundes, D.L.G., Hernandez, M.G., Ribeiro, V.P., Gomes, M.A., and Honorio-França, A.C. (2015). The effect of IFN- γ and TGF- β in the functional activity of mononuclear cells in the presence of *Entamoeba histolytica*. *Parasit. Vectors* 8, 1–8.

Mortimer, L., Moreau, F., Cornick, S., and Chadee, K. (2015). The NLRP3 Inflammasome Is a Pathogen Sensor for Invasive *Entamoeba histolytica* via Activation of $\alpha 5\beta 1$ Integrin at the Macrophage-Amebae Intercellular Junction. *PLoS Pathog.* 11, e1004887.

Mosser, D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73, 209–212.

Muñoz-Ortega, M., Quintanar-Stephano, A., García Lorenzana, M., Campos-Esparza, M.R., Silva-Briano, M., Adabache-Ortíz, A., Campos-Rodríguez, R., Rodríguez, M.G., and Ventura-Juárez, J. (2011). Modulation of amoebic hepatic abscess by the parasympathetic system. *Parasite Immunol.* 33, 65–72.

Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 173–182.

Niemand, C., Nimmegern, A., Haan, S., Fischer, P., Schaper, F., Rossaint, R., Heinrich, P.C., and Müller-Newen, G. (2003). Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 170, 3263–3272.

Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., and Hymowitz, S.G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 71–109.

Pacheco-Yépez, J., Galván-Moroyoqui, J.M., Meza, I., Tsutsumi, V., and Shibayama, M. (2011). Expression of cytokines and their regulation during amoebic liver abscess development. *Parasite Immunol.* 33, 56–64.

Pestka, S., Krause, C.D., and Walter, M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* 202, 8–32.

Pirog, A., Stabinsky, Y., and Goldman, R. (2010). *Cytokine Index* (New Jersey USA: Peprotech Inc).

Quatrini, L., Vivier, E., and Ugolini, S. (2018). Neuroendocrine regulation of innate lymphoid

cells. *Immunol. Rev.* 286, 120–136.

Ravdin, J.I., and Guerrant, R.L. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 68, 1305–1313.

Ravdin, J.I., and Kelsall, B.L. (1994). Role of mucosal secretory immunity in the development of an amebiasis vaccine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 36–41.

Ravdin, J.I., Jackson, T.F., Petri, W.A., Murphy, C.F., Ungar, B.L., Gathiram, V., Skilogiannis, J., and Simjee, A.E. (1990). Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 162, 768–772.

Del Rey, A., Chrousos, G., and Besedovsky, H.O. (2008). Neuroendocrinology of Inflammatory Disorders. In *The Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis, Neuroimmune Biology*. Webster Marketon, JI & Sternberg, EM 7, 321–350.

Romero C.R (2008). Amibiasis en el siglo XIX (México: Sociedad Mexicana de Parasitología A.C).

Rosas-Ballina, M., and Tracey, K.J. (2009). The neurology of the immune system: neural reflexes regulate immunity. *Neuron* 64, 28–32.

Salata, R.A., Murray, H.W., Rubin, B.Y., and Ravdin, J.I. (1987). The role of gamma interferon in the generation of human macrophages cytotoxic for *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 72–78.

Sánchez-Alemán, E., Quintanar-Stephano, A., Escobedo, G., Campos-Esparza, M.D.R., Campos-Rodríguez, R., and Ventura-Juárez, J. (2014). Vagotomy Induces Dereglulation of the Inflammatory Response during the Development of Amoebic Liver Abscess in Hamsters. *Neuroimmunomodulation*.

Sánchez-Alemán, E., Quintanar-Stephano, A., Escobedo, G., Campos-Esparza, M. del R., Campos-Rodríguez, R., and Ventura-Juárez, J. (2015). Vagotomy induces deregulation of the inflammatory response during the development of amoebic liver abscess in hamsters. *Neuroimmunomodulation* 22, 166–180.

Seydel, K.B., Smith, S.J., and Stanley, S.L. (2000). Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infect. Immun.* 68, 400–402.

Sierra-Puente, R.E., Campos-Rodríguez, R., Jarillo-Luna, R.A., Muñoz-Fernández, L., Rodríguez, M.G., Muñoz-Ortega, M.H., and Ventura-Juárez, J. (2009). Expression of immune modulator cytokines in human fulminant amoebic colitis. *Parasite Immunol.* 31, 384–391.

Silva, C.M. (2004). Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 23, 8017–8023.

Sternberg, E.M. (2006). Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 318–328.

Subramaniam, A., Shanmugam, M.K., Perumal, E., Li, F., Nachiyappan, A., Dai, X., Swamy, S.N., Ahn, K.S., Kumar, A.P., Tan, B.K.H., et al. (2013). Potential role of signal transducer and

activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta* 1835, 46–60.

Takeda, K., and Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1–14.

Takeda, K., Clausen, B.E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Förster, I., and Akira, S. (1999). Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10, 39–49.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820.

Talamás-Rohana P, Schlie-Guzmán A M, Hernández-Ramírez I V, and Rosales-Encina JL (1995). T-cell suppression and selective in vivo activation of TH2 subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220-kilodalton lectin. *Infect. Immun.* 63, 3953–3958.

Tanyuksel M, and Petri A. (2003). Laboratory Diagnosis of Amebiasis (Clinical Microbiology Reviews).

Tay-lara (2000). Parasitología (Mexico).

Tecchio, C., Micheletti, A., and Cassatella, M.A. (2014). Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front. Immunol.* 5, 508.

Thomson, W., and Lotze, T. (2003). The Cytokine Handbook (Great Britain: 4).

Tortora, J., and Derrickson, B. (2006). Principios de Anatomía y Fisiología. (México.: Médica Panamericana).

Vallés, A.S., Borroni, M.V., and Barrantes, F.J. (2014). Targeting Brain $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors in Alzheimer's Disease: Rationale and Current Status. *CNS Drugs*.

Velázquez, J.R., Garibay-Martínez, L., Martínez-Tejada, P., and Leal, Y.A. (2012). An amebic anti-inflammatory peptide down-regulates ex vivo IL-1 β expression in patients with rheumatoid arthritis. *Reumatol. Clin.* 8, 315–320.

Ventura-Juárez, J., Jarillo-Luna, A., Aguilar., F., Vázquez., P., Fernández., M., Reyes, M., and Rodríguez, C. (2003). Human amoebic hepatic abscess: in situ interactions between trophozoites, macrophages, neutrophils and T cells. *Parasite Immunology*, 25:, 503–515.

Vergara, M.C. (2008). Síndromes Autoinflamatorios. *Revista. Chilena. de Reumatología.* 24:, 206–211.

Villalba-Magdaleno, J.D., Pérez-Ishiwara, G., Serrano-Luna, J., Tsutsumi, V., and Shibayama, M. (2011). In vivo programmed cell death of *Entamoeba histolytica* trophozoites in a hamster model of amoebic liver abscess. *Microbiol. Read. Engl.* 157, 1489–1499.

Vivanco-Cid, H., Alpuche-Aranda, C., Wong-Baeza, I., Rocha-Ramírez, L.M., Rios-Sarabia, N., Estrada-García, I., Villasís-Keever, M.A., López-Macias, C., and Isibasi, A. (2007). Lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* activates human macrophages and dendritic cells and reaches their late endosomes. *Parasite Immunol.* 29, 467–474.

Wahl, S.M., Wen, J., and Moutsopoulos, N. (2006). TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. *Immunol. Rev.* 213, 213–227.

Wang, Y., Gao, B., and Xiong, S. (2014). Involvement of NLRP3 inflammasome in CVB3-induced viral myocarditis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*

Wong-Baeza, I., Alcántara-Hernández, M., Mancilla-Herrera, I., Ramírez-Saldívar, I., Arriaga-Pizano, L., Ferat-Osorio, E., López-Macías, C., and Isibasi, A. (2010). The role of lipopeptidophosphoglycan in the immune response to *Entamoeba histolytica*. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 254521.

Woods, D.C., White, Y.A.R., Dau, C., and Johnson, A.L. (2011). TLR4 activates NF- κ B in human ovarian granulosa tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 675–680.

Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Chang, S.H., Wang, D., Watowich, S.S., and Dong, C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J. Biol. Chem.* 282, 9358–9363.

Yiu, H.H., Graham, A.L., and Stengel, R.F. (2012). Dynamics of a cytokine storm. *PLoS One* 7, e45027.

Zhou, J., Yan, J., Liang, H., and Jiang, J. (2014). Epinephrine enhances the response of macrophages under LPS stimulation. *BioMed Res. Int.* 2014, 254686.

10. ANEXOS

CULTIVO DE AMIBAS

Preparar suero para medio:

Descongelar el frasco de Vitaminas NCTC-107(Laboratorios Microlab)y el frasco de suero Bovino Adulto (Laboratorios Microlab) (-20°C).

Ponerlos en un vaso de precipitado con agua tibia para que se descongele el contenido de los frascos.

Después que ya se descongelaron los frascos. Tomar 20 ml de vitaminas y agregarlas al frasco de suero bovino en condiciones de esterilidad.

El medio de cultivo se preparará con los siguientes reactivos:

Biosate o peptona	30 gr.
Dextrosa	10 gr.
Cloruro de sodio	2 gr.
Fosfato de potasio monobásico	0.6 gr.
Fosfato de potasio dibásico	1 gr.
Cisteina	1 gr.
Ácido ascórbico	0.2 gr.
Citrato férrico de amonio	0.0236 gr.
Agua bidestilada	750 ml.

Disolver en orden secuencial los reactivos, hasta obtener un volumen final de 750 ml.

Enseguida medir el pH (inicialmente 6.3-6.4) ajustar a 6.8 con NaOH 0.2N .Aforar en probeta de 1000 ml hasta obtener 820 ml.

Envasar los tubos previamente lavados y esterilizados.

Cultivar en tubos de ensayo; en tubos se depositarán 1000 µl de suero fetal bovino,200 ml de vitaminas y 10 µl de una mezcla de antibióticos (Sol. con 10,000/UI de penicilina y 10mg. de estreptomycin/ml.), con 8 ml de medio y 3 gotas de concentrado de amiba (Diamond, 1961). La resiembra se realizará cada tres o cuatro días según el porcentaje de amibas en cada tubo, esto debido a que presentan un crecimiento exponencial.

Pasado el tiempo de crecimiento, los tubos se someterán a 4°C durante 15 minutos, posteriormente se centrifugan a 1500 r.p.m y se eliminará el sobrenadante y se

obtendrá el botón de concentrado de amibas (Diamond, 1961).

Se mantuvo el cultivo axénico de *E. histolytica*, cepa HM1:IMSS, de acuerdo al protocolo establecido; para tal fin, la cepa se resembró cada tercer día con el fin de preservarla para experimentos posteriores. (Botero y Restrepo M, 1992).

CONTEO DE LA AMIBA *E. histolytica*

Consiste en contar amibas por milímetro cúbico. Se usa la pipeta de Thoma para amibas, esta se divide en 10 partes iguales con señales de 0.5 y 1, por encima de bulbo, se aspiran las amibas hasta 0.5, la muestra de amibas en el bulbo está diluida 20 veces. Se toman 0.05 ml de amibas que se mezclan con 0.95 ml de líquido de dilución en un tubo con rosca.

MEZCLA Y LLENADO DE LA CÁMARA DE RECuento

Se usa la cámara de Neubauer donde la distancia entre la superficie inferior del cubreobjetos, colocar sobre las barras elevada, y la cuadrícula es de 0.1 mm cada zona de la cuadrícula corresponde a un cuadrado de 3 mm de lado, dividido en nueve cuadros grandes, cada uno de 1 mm de lado. El cuadrado central se divide a su vez en 400 cuadrados pequeños, dispuestos en 25 grupos de 16 limitados por líneas triples. Cada cuadro representa 1 mm² y cada uno de los 25 cuadrados pequeños tiene 0.2 mm de lado (0.04 mm² de superficie) y cada uno de los 400 cuadrados menores tiene 0.05 mm de lado (0.0025 mm² de superficie).

REALIZACIÓN DEL RECuento.

Después de que las amibas han sedimentado se espera de uno a tres minutos y se observa la cámara de recuento ($\times 10$) para percatarse de que la distribución de las amibas sea homogénea. Luego se cuentan las amibas en cuatro cuadros grandes (1 mm de lado).

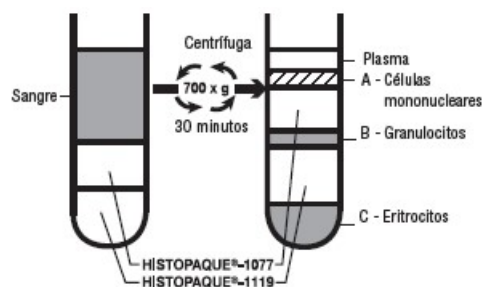
CALCULO

Si llamamos B al número de amibas en cuatro cuadros grandes, entonces es $4 \times 1 \times 0.1 =$

0.4 mm³ o sea $B * 10 / 4$ amibas ocupan mm³. Pero como las amibas están diluidas 20 veces: número de amibas en 1 mm³ de amibas = $B * 10 * 20 / 4 = 50 B$ (Lynch, et al, 1977).

INTERACCIONES CON MACRÓFAGOS Y NEUTRÓFILOS

1. En un tubo de plástico colocar 5 ml de sangre venosa de humano + 5 ml de solución salina (0.9%).
2. Preparar el gradiente de separación de la manera siguiente:
Colocar en un tubo de vidrio 5 ml HISTOPAQUE-1077 (Sigma Aldrich) (granulocitos) y posteriormente con cuidado añadir 5 ml de lymphoprep (Axis-Shield PoC AS) (mononucleares)
- 3.- A continuación añadir con cuidado 5 ml de sangre diluida (obtenida en el paso 1) al gradiente de separación (obtenido en el paso 2).
4. Centrifugar la mezcla obtenida a 700 g (en nuestro caso a 2 000 rpm) durante 45 minutos a temperatura ambiente (18 – 26°C).
5. Remover cuidadosamente los tubos de la centrifuga y observar dos capas opacas distintas.



6. Con ayuda de una pipeta Pasteur aspirar y descartar el fluido aproximadamente 0.5 cm antes de llegar a la capa A. Transferir las células de esta capa A al tubo marcado como mononucleares.
7. Enseguida aspirar y descartar el fluido remanente que continua justo a 0.5 cm de la capa B. Transferir las células de la capa B al tubo marcado como granulocitos.
8. Lavar las células adicionando 10 ml de PBS al tubo. Centrifugar durante 10 minutos a 200 g (en nuestro caso a 1000 rpm). Remover el sobrenadante y descartarlo.

-
9. Si los neutrófilos se encuentran contaminados con eritrocitos, se procede a sus lisis por choque osmótico. Incubar las neutrófilos con 1 ml de NH₄Cl 0.17M durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente centrifugar durante 10 minutos a 200 g. Remover el sobrenadante y descartarlo.
 10. Repetir el paso 8 dos veces.
 11. Resuspender el pellet celular en 250 µl de medio RPMI-1640 suplementado (Sigma Aldrich).
 12. A continuación se procede a determinar la viabilidad celular y pureza de los PMN, mediante la técnica del azul tripano.

Colocar en un tubo Eppendorf:

10 µl de azul tripano 0.4% (2x)

10 µl del resuspendido celular.

Para cuantificar el número de PMN presentes (células no teñidas de azul) colocar 10 µl de la suspensión anterior en la cámara de Neubauer y contar los PMN localizados en los 4 cuadrantes externos de la cámara.

$$\text{Células}/\mu\text{l} = \frac{(\text{número de células contadas}) (10) (\text{Factor de dilución})}{4}$$

4

INTERACCIÓN DE PMN CON AMIBAS (Denis y Chade, 1989; Sim et al., 2005).

Los neutrófilos (100 000 – 200 000 PMN / 50 µl de medio RPMI) se siembran en pocillos que contienen cubreobjetos (placa de 24 pocillos) y se incuban a 37°C (5% CO₂, 95% de aire) durante 20 minutos para permitir que los PMN se adhieran al vidrio. Posteriormente se añade 150 µl de medio RPMI y se continúa con la incubación durante una hora y media. Enseguida los trofozoitos de *E. histolytica* se siembran sobre los cubreobjetos que contienen a los PMN en una relación de 1:6 (trofozoito/neutrófilo) y se incuban a 37°C durante diferentes tiempos para su interacción.

Posteriormente lavar las células con PBS y fijarlas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos, en seguida realizar 3 lavados con PBS durante 10 minutos cada uno de ellos, con el objetivo de que las células de interés se encuentren fijadas y libres

de detritus

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

La técnica de inmunofluorescencia indirecta consiste en visualizar anticuerpos unidos a un epítoto concreto de la proteína en estudio mediante manera indirecta dirigiendo contra ellos anticuerpos secundarios conjugados con un fluorocromo, permitiendo así su detección.

De las células de las interacciones que quedaron adheridas a la caja de cultivo, se remueven las amibas con un rastrillo de cultivo y se agrega un volumen de paraformaldehído al 4%. Se permeabilizaran las células con PBS + 0.1% Triton X-100 durante 30 minutos, enseguida se bloquearan los epítotos inespecíficos utilizando PBS + 0.1% Triton X-100 + 5% de suero de bovino durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente se incubaran las células con el anticuerpo correspondiente NF- κ B, TLR4 o STAT3 diluido en PBS + 0.1% de Tritón X-100 + 5% de Albúmina Sérica Bovina (BSA) toda la noche en cámara húmeda a 4° C; en seguida se realizaran 3 lavados con PBS + 0.1% de Tritón X-100 cada 10 minutos, a continuación las células se incubaran con el anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo diluido PBS + 5 % de suero de bovino durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último se realizaran varios lavados con PBS para eliminar todos los restos de fluorescencia (Campos-Esparza *et al.*, 2009), se tiñeron los núcleos con reactivo Hoechst, para observarlos al microscopio de fluorescencia, una vez tomadas las imágenes se procedió a hacer el recuento porcentual de amibas positivas.



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00076
Matrícula: 2123600633

ANÁLISIS IN VITRO DE LA INTERACCIÓN ENTRE E HISTOLYTICA CON CELULAS DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA DE HAMSTER EN PRESENCIA Y / AUSENCIA DE LOS NEUROTRANSMISORES DEL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO (ACETILCOLINA Y ADRENALINA).

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 4 del mes de julio del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. MARIO GARCIA LORENZANA
- DR. EMILIO DOMINGUEZ SALAZAR
- DR. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZALEZ
- DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO
- DR. JAVIER VENTURA JUAREZ




FABIOLA DEL ROCIO VILLALOBOS GOMEZ
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: FABIOLA DEL ROCIO VILLALOBOS GOMEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

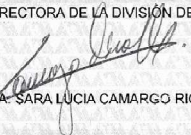
REVISÓ



MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

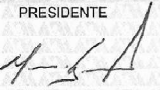
Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS




DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



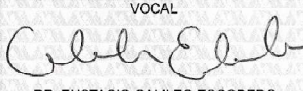
DR. MARIO GARCIA LORENZANA

VOCAL



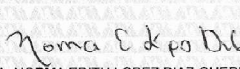
DR. EMILIO DOMINGUEZ SALAZAR

VOCAL




DR. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZALEZ

VOCAL



DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO

SECRETARIO



DR. JAVIER VENTURA JUAREZ