

Secreción de esfingomielinasas de *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis* frente al estrés térmico.

Jayna Paloma Jantes-Figueroa¹, Itzel Zúñiga-Ramos¹, Mariana Orozco-Cerna¹, Haydee Alejandra Pérez-Hernández¹, María Abigail Ramírez-Ramírez¹, Andrea Berenice Sánchez-Ponce¹, Ana Medina-Nieto²; Fernanda Torres-Castellanos², Quetzalli Macías-Cervantes², Ángeles Rangel-Serrano², Itzel Páramo-Pérez², Fernando Anaya-Velázquez², Bernardo Franco², Fátima Berenice Ramírez-Montiel², Felipe Padilla-Vaca² (padillaf@ugto.mx)

¹Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo y Licenciatura en Biología Experimental. División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato. Universidad de Guanajuato. C.P. 36050. México

²Departamento de Biología. División de Ciencias Naturales y Exactas. Campus Guanajuato. Universidad de Guanajuato. C.P. 36050. México.

Resumen

Entamoeba histolytica y *Trichomonas vaginalis* son protozoarios patógenos que infectan al ser humano. Durante el proceso infectivo son confrontados por diferentes elementos del sistema inmune del hospedero, donde el principal mecanismo de acción es el daño a la membrana plasmática (MP) del trofozoíto para lisarlo. Entre los componentes del hospedero que dañan la MP de los parásitos se tiene el sistema del complemento, los péptidos antimicrobianos y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). *E. histolytica* posee un mecanismo de reparación del daño a la MP mediado por esfingomielinasas ácidas (aSMasas), el cual es activado frente a lesiones producidas por el complemento, péptidos antimicrobianos, estrés oxidativo y algunas toxinas. *T. vaginalis* al igual que *E. histolytica* secreta aSMasas, lo que sugiere que también podría presentar un mecanismo de reparación del daño a su MP en respuesta a los componentes de defensa del hospedero. El choque térmico es un tipo de estrés que puede dañar la integridad de la membrana plasmática, por lo que es de interés analizar su efecto sobre la secreción de la aSMasa en respuesta al daño a la membrana de ambos parásitos. El choque térmico a 42°C induce un incremento de la actividad de aSMasa secretada en *E. histolytica* y *T. vaginalis*. La respuesta diferencial de los genes que codifican para las aSMasas en ambos parásitos proporcionará información relevante sobre la regulación de este proceso.

Palabras clave: *Entamoeba histolytica*; *Trichomonas vaginalis*; Esfingomielinasa; Estrés oxidativo.

Estrategias usadas por *E. histolytica* y *T. vaginalis* para confrontar la respuesta del hospedero

Entamoeba histolytica y *Trichomonas vaginalis* son protozoarios patógenos que infectan al ser humano (Figura 1). Durante el proceso infectivo son confrontados por diferentes elementos del sistema inmune del hospedero, donde el principal mecanismo de acción es el daño a la membrana plasmática (MP) del trofozoíto y ocasionar su lisis. Entre los componentes del hospedero que dañan la MP de los parásitos se tiene al sistema del complemento, los péptidos antimicrobianos (PAM) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Ambos parásitos poseen varias moléculas y mecanismos para contrarrestar el ataque del hospedero como lo son las cisteín proteinasas, enzimas antioxidantes y el recambio de membrana (Figura 2).

Reparación de membrana plasmática y esfingomielinasas

La MP es una barrera semipermeable que se encarga de aislar selectivamente el contenido de la célula del ambiente externo, regular el intercambio de sustancias entre medio extra e intercelular y permitir la comunicación intercelular. La MP está sujeta a diferentes agentes externos que le pueden provocar daño, por lo que las células cuentan con mecanismos para reparar estas lesiones y mantener así su integridad¹. El primer signo de daño a la MP es la entrada no controlada de Ca²⁺ extracelular que incrementa su concentración intracelular, el cual activa diferentes mecanismos para repararla.

¹ McNeil y col., 2003



Figura 1. Enfermedades provocadas por los protozoarios parásitos *E. histolytica* y *T. vaginalis* (diseño de los autores).

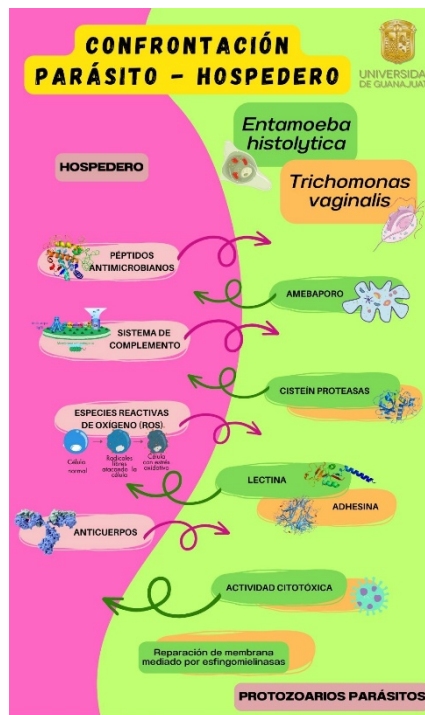


Figura 2. Confrontación parásito-hospedero (diseño de los autores).

Las SMasas son fosfolipasas C específicas para esfingomiéline. Estas enzimas son importantes en el metabolismo de lípidos y son la principal vía de producción de ceramida, la cual se asocia a eventos celulares tales como la proliferación celular, apoptosis, envejecimiento celular y respuesta a estrés. Han sido clasificadas de acuerdo con su pH óptimo de actividad en neutras y ácidas². Las SMasas neutras (nSMasas), presentan actividad a pH 7.5, y se han descrito en mamíferos, tanto dependientes de Mg^{2+} o Mn^{2+} cuya localización es membranal, así como no dependientes de Mg^{2+} localizadas en el citosol. Estas enzimas han sido involucradas en la transducción de señales mediada por ceramida en respuesta a citocinas y estrés oxidativo afectando el crecimiento e induciendo la apoptosis³. Las SMasas ácidas (aSMasas) presentan actividad a un pH de 5 y son secretadas bajo diferentes tipos de estrés, involucrando a estas enzimas en la transducción de señales vía ceramida generando diversos eventos biológicos^{4,5}. En mamíferos se presenta una aSMasa lisosomal que ha sido involucrada en la reparación de daños a la MP. Se ha descrito que después de la lesión en la MP hay una entrada de Ca^{2+} , el cual desencadena la exocitosis de los lisosomas⁶, los cuales se fusionan con la MP en el sitio de daño y liberan la aSMasa lisosomal, la cual hidroliza a la esfingomiéline presente en la MP generando microdominios enriquecidos con ceramida, la cual activa la endocitosis de la lesión, regenerando de esta manera la integridad de la MP⁷.

E. histolytica cuenta con seis genes que codifican para aSMasas, los cuales se transcriben activamente y la actividad enzimática es estimulada por cationes como el Mg^{2+} e inhibida por el Co^{2+} ⁸. El daño a la MP por moléculas formadoras de poros induce un incremento en la actividad secretada de aSMasa que se correlaciona con una mayor viabilidad de las amibas. Este daño permite la entrada de Ca^{2+} extracelular, induciendo la migración de los lisosomas a la periferia de la célula, se fusionan con la MP formando estructuras tipo "parches" y vierten su contenido al exterior de la célula incluyendo a las aSMasas las cuales producen ceramida que favorece la formación de endosomas para la internalización de la lesión y su posterior degradación en el compartimento endolisosomal⁸ (Figura 3).

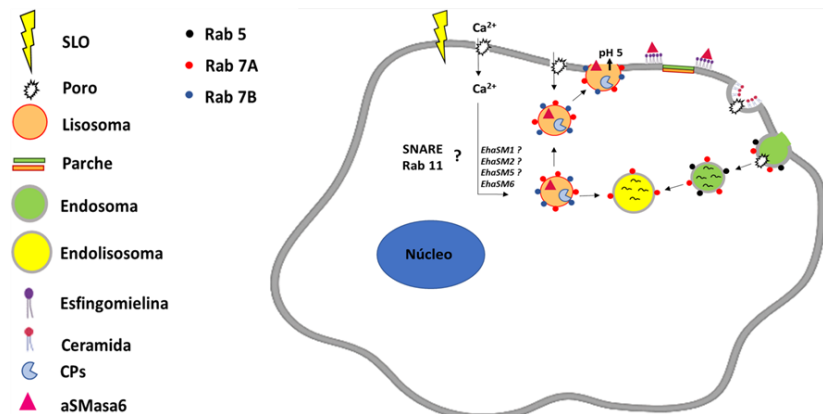


Figura 3. Modelo de reparación de daños a la MP mediada por las aSMasas secretadas de *E. histolytica*. El daño ocasionado por agentes perturbadores de la MP de *E. histolytica* permite la entrada de Ca^{2+} extracelular en el citoplasma. La elevación en la concentración intracelular de Ca^{2+} desencadena la exocitosis de los lisosomas los cuales vierten su contenido al espacio extracelular, entre ellas las aSMasas que hidrolizan la esfingomiéline de la membrana en ceramida, lo cual favorece la formación de endosomas que internalizan la lesión⁸.

² Marchesini y Hannun, 2004

³ Hannun y Obeid, 2008

⁴ Jenkins, R. W., y col., 2009

⁵ Nikolova-Karakashian, MN y Rozenova, KA., 2010

⁶ Jaiswal, J. K., y col., 2002

⁷ Tam C., y col., 2010

⁸ Ramírez-Montiel F. y col., 2019

T. vaginalis al igual que *E. histolytica*, se enfrenta a los mismos factores del hospedero, pero en diferente nicho ecológico. En este entorno, la MP es una estructura expuesta a ser dañada por el sistema de defensa del hospedero. *T. vaginalis* secreta actividad de aSMasa y en su genoma se ha descrito la presencia de seis genes que codifican para aSMasas, conservando los sitios activos para su actividad. La actividad secretada se incrementa cuando los trofozoítos son cultivados en condiciones ricas en hierro y en cepas de mayor virulencia⁹ (Figura 4).

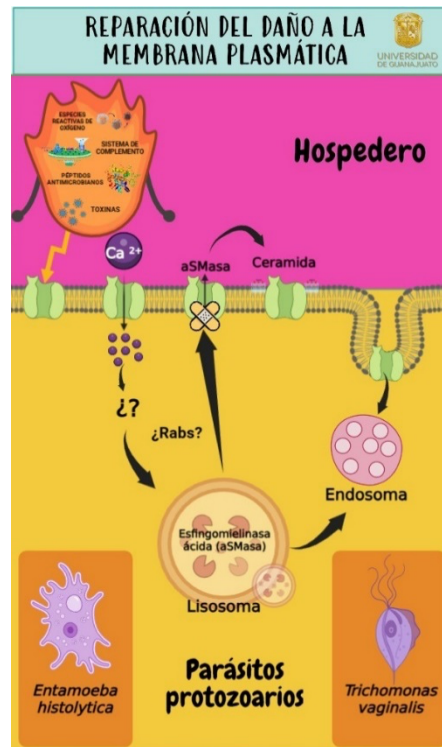


Figura 4. Reparación del daño a la membrana plasmática de los protozoarios parásitos *E. histolytica* y *T. vaginalis* (diseño de los autores).

Sistema del complemento

El sistema del complemento es el vínculo entre los dos sistemas de inmunidad, la innata y la adaptativa. Es una cascada enzimática producida por las células del sistema inmune innato, que forma grandes poros en la MP, alterando el equilibrio osmótico y lisando al patógeno. Tiene un papel central en la eliminación de microorganismos al complementar la función de los anticuerpos y de las células del sistema inmune.

Se sabe que el sistema del complemento humano puede prevenir la diseminación de los trofozoítos de *E. histolytica* y evita la infección intestinal, sin embargo, la ameba es capaz de resistir el ataque lítico del complemento, inhibiendo la formación del complejo C5b-9¹⁰ y/o exhibiendo un aumento en la actividad de aSMasa secretada lo cual le permite reparar su MP frente al daño ocasionado por este sistema de defensa del hospedero⁸. *T. vaginalis* degrada factores solubles de la inmunidad como son moléculas del sistema del complemento (C3b) e inmunoglobulinas (A, G y M), gracias a que secreta un gran arsenal de proteasas de

⁹ Torres-Castellanos, Tesis de Licenciatura, 2020

¹⁰ Nakada-Tsukui K., & Nozaki. T, 2016

cisteína. La secreción de aSMasas por este parásito, sugiere que podría tener un mecanismo de reparación del daño a la membrana mediado por aSMasas (Figura 2).

Péptidos antimicrobianos

Los PAM son moléculas que contienen entre 12 y 60 aminoácidos, forman parte de la respuesta de defensa de diversos organismos y participan mediando la respuesta primaria hacia bacterias, parásitos, infecciones víricas y fúngicas¹¹. Estos péptidos son secretados por células epiteliales y leucocitos, como es el caso de los macrófagos y neutrófilos. El mecanismo general por el cual los péptidos ejercen su acción consiste en dañar la membrana celular del patógeno. La interacción del PAM con el microorganismo es mediante fuerzas electrostáticas entre su residuo aminopositivo y la carga negativa de la membrana celular del patógeno. La interacción de los PAM con la célula patógena depende de la composición de la membrana del patógeno¹².

En *E. histolytica* los PAM como LL-37¹³ y la β -Defensina 2¹⁴ desestabilizan y alteran la MP, causando un aumento en su permeabilidad, lo cual ocasiona un incremento en la expresión de los genes *EhaSM* que codifican para las aSMasas contribuyendo a su secreción, la cual está involucrada en la reparación de daños a la MP de la amiba⁸.

Durante la infección, *T. vaginalis* induce la producción de citocinas y quimiocinas por células epiteliales lo que conlleva al reclutamiento y la activación de células de sistema inmune, las cuales generan una gran cantidad de moléculas efectoras, como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, péptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. Las catelicidinas son PAM producido por el ser humano el cual posee actividad microbicidal contra diferentes microorganismos patógenos, incluyendo a *T. vaginalis*¹⁵. Las tricomonas podrían tener un mecanismo de reparación del daño a su MP producido por PAMs similar a como ocurre con amibas (Figura 4).

Estrés oxidativo y su efecto sobre la membrana plasmática

El oxígeno es una molécula imprescindible para múltiples procesos vitales, un exceso de radicales libres rompen el equilibrio produciendo el llamado estrés oxidativo (figura 5). De los ROS inorgánicos los más importantes son el oxígeno molecular O_2 , el radical-anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (HO^\cdot) y su precursor inmediato el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). De los secundarios u orgánicos, el radical peroxilo (ROO^\cdot), el hidroperóxido orgánico (ROOH) y los lípidos peroxidados (5-9)¹⁶. Cuando se pierde el balance de óxido-reducción por alteración del metabolismo o por exposición de diversos agentes, hay un aumento de ROS que pueden reaccionar con otras biomoléculas celulares produciendo daño, dentro de los cuales se encuentra la alteración de la fluidez y daño en la MP mediante la formación de “nanoporos” debido a la peroxidación lipídica¹⁷.

Durante el cultivo in vitro, *E. histolytica* puede tolerar concentraciones de oxígeno molecular (O_2) de hasta 5%; sin embargo, durante la invasión de tejidos el parásito tiene que enfrentar el mayor contenido de oxígeno que se encuentra en los tejidos bien perfundidos (4–14%) y con ROS y NO– derivados tanto del huésped como del parásito¹⁸. Estos compuestos son extremadamente tóxicos y se producen en grandes cantidades en el tejido infectado, ya que su actividad amebicida está asociada a la producción de NO^{-20,21,22,23}. En

¹¹ Jenssen y col., 2006.

¹² Guilhelmelli y col., 2013

¹³ Cobo y col., 2012

¹⁴ Ayala-Summano y col., 2013

¹⁵ Ramírez-Ledesma y col., 2022

¹⁶ Elejalde Guerra, J.I., 2001

¹⁷ Ferranti CS., 2020

¹⁸ Olivos-García, 2012

respuesta al H_2O_2 los trofozoítos secretan actividad de aSMasa y se incrementa la expresión de genes que codifican para esta enzima⁸.

Cuando *T. vaginalis* infecta a su hospedero se enfrenta a sus sistemas de defensa, algunos de estas defensas son la generación de ROS lo que genera un ambiente oxidante que puede generar la peroxidación lipídica de la membrana lo que conlleva a una desestabilización de la misma. Se ha reportado que algunos de los seis genes que codifican para aSMasas en *T. vaginalis* aumentan su expresión al someterse a los trofozoítos a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno⁹.

Estrés térmico

El estrés térmico es un tipo de estrés que ocasiona daño a la integridad de la membrana celular debido a la aparición de poros membranales a causa del arreglo de la conformación de los lípidos de membrana y también de forma indirecta, como respuesta secundaria la generación de ROS¹⁹. Cuando una célula es sometida a estrés ambiental o al estrés causado por ROS, genera un aumento significativo en la síntesis de proteínas de “choque térmico” (HSP) y esto permite una resistencia ante las condiciones estresantes.

En *E. histolytica* se ha reportado que la generación de ceramida, principal producto de la hidrólisis de esfingomielina por SMasas, está asociada a diferentes estímulos como el estrés oxidativo generado por H_2O_2 , radiación UV-C y choque térmico, generando respuestas celulares como apoptosis y proliferación celular, entre otras^{8,20}. Varias HSP se han reportado en *E. histolytica*, donde la mayoría de ellas se sobreexpresan por calor, altas concentraciones de O_2 , H_2O_2 y NO^- , estos agentes estresantes pueden causar daños graves a los grupos de Fe-S dentro de las proteínas, que HSP70 puede reparar²¹.

Efecto del estrés térmico sobre la secreción de aSMasas

Se utilizaron trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS y *T. vaginalis* GT-21 en el medio de cultivo TYI-S-33. El estrés térmico se evaluó al pasar a los trofozoítos de 37°C a 42°C. La actividad de aSMasa secretada se cuantificó en los sobrenadantes a diferentes tiempos en un fluorómetro. Se purificó RNA total libre de DNA genómico de los trofozoítos sometidos a estrés térmico y se sintetizó cDNA. Se evaluó por PCR la calidad del cDNA sintetizado.

Se evaluó la actividad de aSMasa secretada en los sobrenadantes obtenidos de las cepas HM1-IMSS de *E. histolytica* y de la cepa sobreexpresante del gen de la aSMasa4 (HM1-SM4) incubadas por 15 min a 37°C y 42°C. De *T. vaginalis* se utilizó la cepa GT-21. La cepa de *E. histolytica* sobreexpresante HM1-SM4 presenta mayor actividad de aSMasa secretada con respecto a la cepa control HM1 a 37°C. A 42°C se observa que la cepa parental incrementa ligeramente los niveles de aSMasa secretada, sin embargo, la cepa sobreexpresante incrementó considerablemente la actividad de aSMasa secretada. En el caso de la cepa GT-21 de *T. vaginalis* se observó también un aumento considerable de actividad de aSMasa secretada cuando se somete a un estrés térmico (Figura 5). Estos resultados sugieren que el choque térmico genera daño a la membrana de la ameba, lo que genera un incremento de la actividad de aSMasa secretada asociado con una disminución de la viabilidad de ambos parásitos a 42°C.

²⁰ Lin y col., 1994

²¹ Moonah y col., 2013

²² Santi-Rocca y col., 2012

²³ Ermak y Davies 2012

²⁴ Clarke y Hannun, 2006

²⁵ Santos y col., 2015

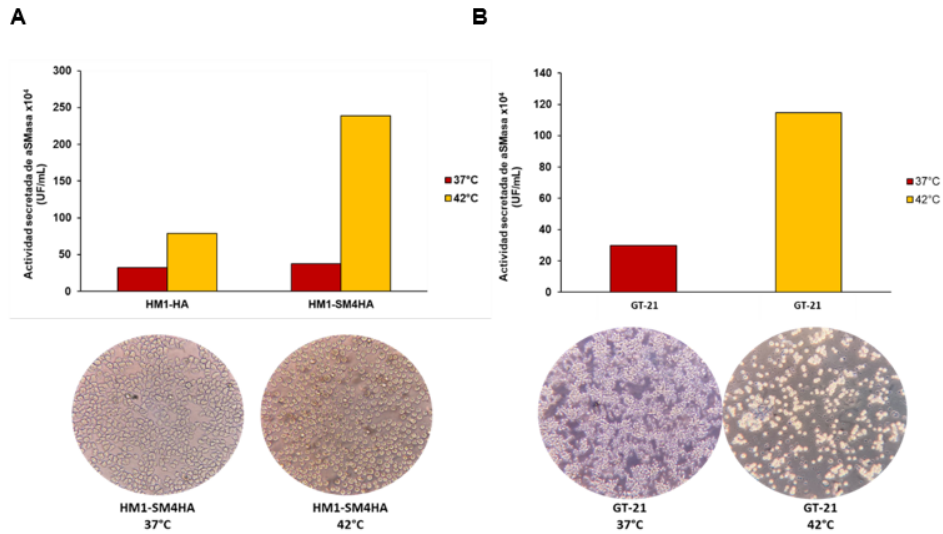


Figura 5. Actividad de aSMasa secretada en amibas y tricomonas expuestas a estrés térmico. A) Cepas HM1-HA y HM1-SM4HA de *E. histolytica* (A) y *T. vaginalis* (B) incubadas a 37°C y 42°C y cuantificación de la actividad de aSMasa. . Imágenes de los trofozoitos de ambos parásitos dañadas a 42°C.

Para evaluar la expresión de los genes que codifican para aSMasas en *E. histolytica* frente al estrés térmico se realizó la extracción y caracterización de RNA de los trofozoitos incubados a 37°C y 42°C. La calidad del RNA obtenido se muestra en la Figura 6 donde se observan las dos subunidades ribosomales.

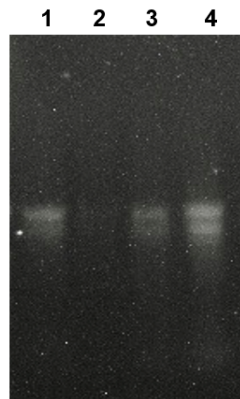


Figura 6. RNA purificado de cepas de *E. histolytica* expuestas a estrés térmico. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa del RNA extraído de trofozoitos de *E. histolytica*. Cepa HM1-HA incubada a 37°C (1) y 42°C (2). Cepa HMI1-SM4HA incubada a 37°C (3) y 42°C (4).

Una vez que se evaluó la concentración y calidad del RNA obtenido, se determinó por PCR que estuviera libre de contaminación de DNA genómico. No se obtuvo amplificación de un gen control cuando se utilizó el RNA como templado, lo que indica que no está contaminado.

Finalmente se sintetizó cDNA usando como templado el RNA obtenido empleando una retrotranscriptasa reversa. Para verificar la síntesis del cDNA se realizó una PCR usando el cDNA como templado para

amplificar un fragmento del gen GAPDH. Se observó que con todos los cDNA obtenidos se obtuvo un amplicón del tamaño esperado (Figura 7).

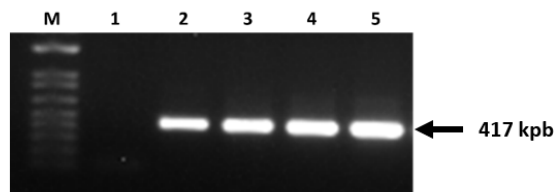


Figura 7. Amplificación por PCR de un fragmento del gen GAPDH empleando cDNA como templado. Electroforesis en gel de agarosa. M) Marcadores de tamaño. 1) Control negativo sin templado. Cepa HM1-HA incubada a 37°C (2) y 42°C (3). Cepa HMI1-SM4HA incubada a 37°C (4) y 42°C (5).

Con los cDNAs sintetizados se determinarán los niveles de expresión de cada uno de los 6 genes que codifican para aSMasas en ambas cepas de *E. histolytica* expuestas a estrés térmico mediante PCR tiempo real.

Conclusiones

Hay una correlación entre la sobreexpresión del gen EhaSM4 de *E. histolytica* y un incremento de actividad de aSMasa secretada. La exposición de los trofozoítos de *E. histolytica* y *T. vaginalis* a estrés térmico indujo una mayor secreción de aSMasa, lo cual podría estar relacionado con un daño a la membrana plasmática. La síntesis de cDNA permitirá evaluar la respuesta a nivel transcripcional de los genes de aSMasa frente al estrés térmico.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Luis Felipe Padilla Vaca por brindarnos la oportunidad de trabajar en este proyecto, por apoyarnos en cada paso y por su atención; de igual manera a la Dra. Fátima Berenice Ramírez Montiel, Dra. Ángeles Rangel Serrano y QFB Itzel Páramo Pérez por su apoyo y proporcionarnos el material biológico y reactivos para trabajar. A Fernanda Torres Castellanos, Ana Medina Nieto y Quetzalli Macías Cervantes por acompañarnos y guiarnos en cada uno de los procesos que realizamos y a todo el grupo del Laboratorio de Patobiología Molecular de Protozoarios Parásitos por todo el apoyo y acompañamiento brindado. Agradecemos al Dr. JCVC por facilitar el uso del fluorómetro. A la Universidad de Guanajuato por apoyar la formación de este proyecto a través del XXVIII Verano de la Ciencia, pues hizo posible la creación de un espacio en donde se nos permite desarrollarnos de manera más profunda en la ciencia. A nuestras familias por darnos su apoyo en cada una de nuestras decisiones, y por darnos las herramientas personales necesarias para prosperar dentro y fuera de nuestra casa de estudios.

Bibliografía

- ¹ McNeil PL, Steinhardt RA. Plasma Membrane Disruption: Repair, Prevention, Adaptation. *Annu RevCell Dev Biol* [Internet]. 2003; 19(1):697–731. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.140101>
- ² Marchesini N, Hannun YA. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochemistry and Cell Biology* 2004;82:27–44.
- ³ Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008. pp. 139–150.
- ⁴ Jenkins RW, Canals D, Hannun YA. Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. In: *Cellular Signalling*. 2009. pp. 836–846.

- ⁵ Nikolova-Karakashian MN, Rozenova KA. Ceramide in stress response. In: Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules. Springer; 2010. pp. 86–108.
- ⁶ Jaiswal JK, Andrews NW, Simon SM. Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. In: Journal of Cell Biology. 2002. pp. 625–635.
- ⁷ Tam C, Idone V, Devlin C, Fernandes MC, Flannery A, et al. Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. Journal of Cell Biology 2010;189:1027–1038.
- ⁸ Ramirez-Montiel, F., Mendoza-Macias, C., Andrade-Guillén, S., Rangel-Serrano, A., Páramo-Pérez, I., Anaya-Velázquez F., Franco B., Padilla-Vaca, F. (2019). Plasma membrane damage repair is mediated by an acid sphingomyelinase in *Entamoeba histolytica*. PLoS Pathogens, 15(8), e1008016
- ⁹ Torres-Castellanos M.F., 2020. Caracterización de la actividad de esfingomielinasa ácida secretada por cepas de *Trichomonas vaginalis* de diferente virulencia. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guanajuato. División de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Biología.
- ¹⁰ Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2016). Immune Response of Amebiasis and Immune Evasion by *Entamoeba histolytica*. Frontiers in immunology, 7, 175. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00175>
- ¹¹ Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 2006;19:491-511.
- ¹² Guilhelmelli F, Viela N, Albuquerque P, Derengowski L, Silva-Pereira I, Kyaw CM. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. Front Microbiol. 2013;4:353.
- ¹³ Cobo ER, He C, Hirata K, Hwang G, Tran U, Eckmann L, et al. *Entamoeba histolytica* Induces Intestinal Cathelicidins but Is Resistant to Cathelicidin-Mediated Killing. 2012;143–9.
- ¹⁴ Ayala-Summano JT, Teñe I, Lo´pez VM, Domínguez-Robles M del C, Shibayama-Salas M, Meza I. Toll-like Receptor Signaling Activation by *Entamoeba histolytica* Induces Beta Defensin 2 in Human Colonic Epithelial Cells: Its Possible Role as an Element of the Innate Immune Response. In: PLoS Neglected Tropical Diseases. 2013.
- ¹⁵ Ramírez-Ledesma MG, Rodríguez MC, Alva-Murillo N, Avila EE. The antimicrobial peptides LL-37, KR-20, FK-13 and KR-12 inhibit the growth of a sensitive and a metronidazole-resistant strain of *Trichomonas vaginalis*. Parasitol Res. 2022 Dec;121(12):3503-3512. Doi: 10.1007/s00436-022-07674-6. Epub 2022 Sep 29. PMID: 36171407.
- ¹⁶ Elejalde Guerra, J.I.. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. Anales de Medicina Interna, 2001;18(6), 50-59. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001000600010&lng=es&tng=es.
- ¹⁷ Ferranti, C. S., Cheng, J., Thompson, C., Zhang, J., Rotolo, J. A., Buddaseth, S. & Kolesnick, R. N. (2020). Fusion of lysosomes to plasma membrane initiates radiation-induced apoptosis. Journal of Cell Biology, 219
- ¹⁸ Olivos-García, A., Saavedra, E., Luis-García, E.R., Nequiz, M., y Pérez-Tamayo, R. 2012. Stress response in *Entamoeba histolytica*. In Stress Response in Microbiology. Requena, J.M. (ed.). Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 405–427.
- ¹⁹ Ximénez C., González E., Nieves M, Magaña U., Morán P., Gudiño-Zayas M., Partida O., Eric Hernández, Rojas-Velázquez L., García de León M., y Maldonado H. 2017. Differential expression of pathogenic genes of *Entamoeba histolytica* vs *E. dispar* in a model of infection using human liver tissue explants. PLoS One.; 14(1): e0210895.
- ²⁰ Lin, J. Y., Seguin, R., Keller, K., & Chadee, K. 1994. Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. Infection and immunity, 62(5), 1534-1541
- ²¹ Moonah SN, Jiang NM, y Petri WA. 2013. Host Immune Response to Intestinal Amebiasis. Knoll LJ, ed. PLoS Pathogens; 9(8)
- ²² Santi-Rocca, J., Smith, S., Weber, C., Pineda, E., Hon, C. C., Saavedra, E., Olivos-García, A., Rousseau, S., Dillies, M. A., Coppée, J. Y., y Guillén, N. 2012. Endoplasmic reticulum stress sensing mechanism is activated in *Entamoeba histolytica* upon treatment with nitric oxide. PLoS one, 7(2), e31777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031777>.

- ²³ Ermak, G, y Davies, K. J. 2012. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol. Immunol.*, 38(10), 713-721.
- ²⁴ Clarke CJ, Hannun YA. Neutral sphingomyelinases and nSMase2: Bridging the gaps. *Biochim Biophys Acta—Biomembr.* 2006; 1758(12):1893–901.
- ²⁵ Santos F, Nequiz M, Hernández-Cuevas NA, Hernández K, Pineda E, y Encalada R. 2015. Maintenance of intracellular hypoxia and adequate heat shock response are essential requirements for pathogenicity and virulence of *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol*; 17(7):1037–1051.