



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

**Caracterización de una proteína con actividad de
Nitrato reductasa en *Entamoeba histolytica***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA

PRESENTA

M. C. NYDIA CÓRDOVA PÉREZ

DIRECTORES

DRA. MARÍA ELENA HERNÁNDEZ CAMPOS

DR. RAFAEL CAMPOS RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F. DICIEMBRE 2006



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 07 del mes de diciembre del año 2006, la que suscribe **Nydia Córdova Pérez**, alumna del Programa de **Maestría en Ciencias con Especialidad en Farmacología** con número de registro **B0401083**, adscrita a la **Escuela Superior de Medicina**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Maria Elena Hernández Campos** y al **Dr. Rafael Campos Rodríguez** y cede los derechos del trabajo intitulado "**Caracterización de una proteína con actividad de nitrato reductasa en *Entamoeba histolytica***", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **nydiacordovap@yahoo.com.mx**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



NYDIA CÓRDOVA PÉREZ
Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 12:00 horas del día 07 del mes de diciembre del 2006 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E. S. M. para examinar la tesis de grado titulada:

“Caracterización de una proteína con actividad de nitrato reductasa en *Entamoeba histolytica*”

Presentada por el alumno:

CÓRDOVA
Apellido paterno

PÉREZ
materno

NYDIA
nombre(s)

Con registro:

B	0	4	1	0	8	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis


DRA. MARIA ELENA HERNANDEZ CAMPOS

Director de tesis


DR. RAFAEL CAMPOS RODRIGUEZ


DR. ÁNGEL MILIAR GARCÍA


DRA. ROSA ALDRIANA JARILLO LUNA


DRA. ELVIA MERA JIMÉNEZ


DR. IGNACIO VALENCIA HERNANDEZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


M. EN C. ELEAZAR LARA PADILLA



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I. P. M.
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE INMUNOLOGÍA DEL DEPTO. DE BIOQUÍMICA Y EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA SECCION DE GRADUADOS DE LA ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA DEL IPN, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. RAFAEL CAMPOS RODRÍGUEZ Y LA DRA. MA. ELENA HERNÁNDEZ CAMPOS.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

Por todo su cariño apoyo y gran comprensión durante todo este tiempo.

A MIS HERMANOS

Abel, Isay, Brenda y Gabriela por su ayuda y cariño.

A mi novio por todo su apoyo y comprensión para lograr esta meta en los momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento muy especial para el Dr. Rafael Campos Rodríguez y la Dra. Ma. Elena Hernández Campos, quienes dirigieron esta tesis, por su paciencia, enseñanzas y sus regaños durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Ignacio Valencia Hernández por sus consejos, correcciones, sugerencias y su apoyo durante el presente trabajo.

Al Dr. Saúl Rojas por su apoyo y por tener las palabras precisas en el momento preciso.

A los sinodales

Dr. Angel Miliar García, Dra. Adriana Jarillo y la Dra. Elvia Mera por el interés mostrado en las revisiones de este trabajo.

A Karina, Gerardo y Marisela por su amistad invaluable, apoyo incondicional, durante todo este tiempo.

A las químicas Miriam Albarrán y Silvia Arzate por su confianza en mí, su amistad incondicional y todo su apoyo.

A Alberto por brindarme su amistad y ser el mejor de los compañeros.

CONTENIDO

Índice general	i
Abreviaturas	iii
Índice de figuras y tablas	iv
Resumen	v
Abstract	vi
I Introducción	
1 Nitrato Reductasa	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Estructura	1
1.3 Clasificación	2
a) NR de procariotes	2
b) NR de eucariotes	2
1) Enzima nitrato asimilatoria	2
2) Enzima nitrato reductasa bacterianas	2
1.4 La Nar <i>E. coli</i>	3
1.5 Ciclo de reacciones de reducción de NO ₃	4
1.6 Inhibidores	5
1.7 Genes	5
2 <i>Entamoeba histolytica</i>	
2.1 Amibiasis	6
2.2 Ciclo de vida	6
2.3 Morfología	7
2.4 Metabolismo	8
2.5 Mecanismos de patogenicidad de <i>Entamoeba histolytica</i>	9
a) Lectina amibiana (Gal/GalNAc)	9
b) Amoebaporos	9
c) Proteinasas de cisteína	10
2.6 Óxido nítrico y <i>E. histolytica</i>	10
III Hipótesis	11

IV	Objetivo General	12
V	Objetivos Particulares	12
VI	Metodología	13
1	Cultivo de amibas	13
2	Extracción de RNA total	13
3	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%	13
4	Diseño de oligonucleótidos	14
5	RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa)	14
6	PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	14
7	Preparación del extracto crudo de <i>Entamoeba histolytica</i>	15
8	Obtención del anticuerpo policlonal anti-Nitrato reductasa de <i>E. coli</i> en conejo.	15
9	Determinación del peso molecular de la proteína con posible actividad de nitrato reductasa presente en <i>E. histolytica</i> por electroforesis SDS-PAGE e inmunotransferencia	15
10	Inmunodetección de la proteína amibiana con posible actividad de nitrato reductasa empleando anticuerpos anti-nitrato reductasa de <i>E. coli</i>	16
11	Determinación de la posible actividad de nitrato reductasa presente en los trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	16
12	Efecto inhibitorio de la azida de sodio y tungsteno en la actividad de la proteína amibiana con posible actividad de nitrato reductasa	17
VII	Resultados	18
VIII	Discusión	24
XI	Conclusión	30
IX	Perspectivas	31
X	Referencias bibliográficas	32
XI	Apéndices	45

ABREVIATURAS

DNA	Acido desoxirribonucleico
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
kDa	Kilodaltones
Mo	Molibdeno
Moco	Cofactor moco
NADPH	Nicotinamida adenindinucleótido fosfato
Nap	Nitrato reductasa periplasmática
Nar	Nitrato reductasa de membrana
Nas	Nitrato reductasa bacterial asimilatoria
NR	Nitrato reductasa
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGAM	Fosfoglicerato mutasa
PPDK	Piruvato fosfodicinaasa
PPi-PFK	Fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato
RNA	Acido desoxirribonucleico
Rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SDS	Duodecil sulfato de sodio
TAE	Tris acetato
µL	Microlitros

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.	Reacción de Reducción de NO ₃ a NO ₂ en el sitio activo de la nitrato reductasa	4
Figura 2.	Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	7
Figura 3.	Imagen de RT-PCR de <i>E. histolytica</i> en gel de agarosa al 1.5% Producto amplificado de la subunidad alfa (379 pb) por RT-PCR	19
Figura 4.	Imagen de amplificación de producto RT-PCR subunidad beta (341 pb)	20
Figura 5.	Imagen de la subunidad alfa (189 pb) por RT-PCR	21
Figura 6.	Análisis del Western blot del lisado de los trofozoítos de las amibas utilizando un anticuerpo antiNar.	22
Figura 7.	Efecto inhibitorio del tungsteno y la azida de sodio sobre la Nar presente en <i>E. histolytica</i> .	24
Tabla 1.	Clasificación de las nitrato reductasas	3
Tabla 2.	Actividad de la Nar presente en <i>Entamoeba histolytica</i>	23

RESUMEN

La nitrato reductasa (NR) es la primer enzima en el metabolismo del nitrógeno en organismos eucarióticos, con un papel clave en la conversión a amonio y regulación de la adquisición de nitrato. Catalizando la reacción de NO_3 a NO_2 . La NR se encuentra presente en hongos, algas, plantas y bacterias como *Escherichia coli* (*E. coli*): La Nar de *E. coli* está constituida por 3 subunidades: alfa, beta y gama. En algunos organismos participa en la respiración anaerobia o como fuente de energía, para funciones vitales y de crecimiento. La *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) que carece de mitocondria y además obtiene su energía de otras fuentes, y una de éstas, pudiera ser a través de la actividad de la Nar.

El objetivo principal de este trabajo fue demostrar la presencia de una proteína con actividad de Nar en los trofozoítos de *E. histolytica*. La estrategia experimental consistió en establecer por técnicas de biología molecular RT-PCR, inmunodetección y ensayos bioquímicos la presencia de una proteína con actividad de Nar.

Los resultados demostraron que existe la presencia de una proteína con 3 subunidades con actividad de Nar en los trofozoítos de *E. histolytica* y la inmunodetección la presencia de 4 proteínas reconocidas por anticuerpos anti-Nar. Además participa en la reducción de NO_3 a NO_2 La actividad de la proteína amibiana fue inhibida por azida de sodio y tungsteno.

En conclusión, los resultados obtenidos demostraron por primera vez que los trofozoítos de *E. histolytica* presentan actividad de Nar. Y que esta sea la responsable de proveer de energía a este organismo para su sobrevivencia.

ABSTRACT

Nitrate reductase (NR) is a central enzyme in nitrogen metabolism in eukaryotes with key roles in nitrate conversion to ammonium and regulation of NR acquisition. NR catalyzes NAD(P)H reduction of nitrate to nitrite. The enzyme is present in plants, algae, fungi and some bacteria as *Escherichia coli* (*E. coli*). The *E. coli* nitrate reductase (Nar) consists of 3 subunits: alpha, beta and gamma. In some species, this enzyme participates in the anaerobic respiration in order to obtain energy, necessary to life and growth. *E. histolytica* lacks mitochondria and must obtain energy from other sources; one possibility is through Nar activity. The aim of this work was to demonstrate the presence of the protein with activity of Nar in trophozoites of *E. histolytica*.

The experimental strategy consisted to establish by using molecular biology (RT-PCR) and immunodetection, biochemical assays procedures the presence of the protein with activity Nar in *E. histolytica*.

The results from RT-PCR studies shown the presence of 3 subunits, and immunodetection shown the presence of 4 proteins recognized by antibodies anti-Nar.

Additionally, *E. histolytica* was capable to transform nitrates to nitrites. And could participate in the transformation of nitrites from nitrates. The activity the protein was inhibit for sodium azide and tungstate. In conclusion, our results demonstrated for the first time, the presence of the protein with activity Nar in the trophozoites of *E. histolytica*, one possibility from obtain energy to survive.

I. INTRODUCCIÓN

1. NITRATO REDUCTASA (NR)

1.1 Generalidades

La nitrato reductasa (NR) se encuentra en bacterias, hongos, algas (Antipov., 1999) y plantas (Amy y cols., 1974; Madolo y cols., 2005); pertenece a la familia de enzimas que contienen molibdeno como cofactor (MoCo), que facilita la transferencia de 2 electrones en los ciclos del carbono (C), nitrógeno (N) y azufre (S). Es la primera enzima en el metabolismo del nitrógeno en organismos eucarióticos (Guillaume., 2004), con un papel clave en la conversión del nitrógeno (N) a amonio (NH_4^+), y la regulación de la adquisición de nitrato (NO_3) (Jeffrey y cols., 2000). Además es soluble, altamente sensible al calor y participa en la respiración anaerobia. Cataliza la reducción de nitratos (NO_3) a nitritos (NO_2) en presencia nicotina adenindinucleótido fosfato (NAD (P)H); ésta es una reacción irreversible y es un proceso altamente regulado por la adquisición de nitrógeno de estos organismos (Fisher y cols., 2005).

La actividad NR reduce el nitrato a nitrito usando donadores artificiales de electrones como el metilviologen, el azul de bromofenol reducido y flavin nucleótidos (Hoff y cols., 1994).

1.2. Estructura

Está constituida por 3 subunidades denominadas: alpha (α), beta (β), y gamma (γ), con pesos moleculares de 155 kD, 63 kD y 19KD respectivamente (Afshar y cols., 2001). En la subunidad α está localizado el molibdeno que es el sitio activo, en donde se lleva acabo la reducción de NO_3 a NO_2 . La subunidad β transfiere un electrón por medio de sus 4 grupos [Fe-S]. La subunidad γ está integrada a la membrana con 2 hemoproteínas tipo b. (Bertero y cols., 2005). Las subunidades α y β son solubles y se encuentran anclados a la membrana citoplasmática por la subunidad γ (Afshar y cols., 2001). La estructura de la NR

es conservada en plantas, algas y hongos, mientras que se pueden encontrar algunas diferencias en NR de bacterias, conservando una similitud en secuencia, estructura y composición. (Fischer y cols., 2005).

1.3. Clasificación

En la tabla 1 se muestra la clasificación de los diferentes tipos NR. Se han reportado 2 tipos de Nitrato reductasas: en organismos eucarióticos y procarióticos.

- a) **La NR de procariotes:** es un heterotetrámero con constituido por las subunidades α , β y 2 subunidades γ Mo-tepterin y una molécula de citocromo b. Estas nitrato reductasas pueden utilizar ubiquinol, meanquinol o ferredoxina como donador de electrones para la reducción de nitratos. (Koji y cols., 2003).
- b) **En los eucariotes:** la NR solo se activa como homodímero en el que cada subunidad está compuesta por un polipéptido de unos 100-120 kDa que contiene 3 grupos prostéticos: FAD, citocromo b_{557} y cofactor (Moco) (Zhou y cols., 1996) y la dimerización depende de la presencia de su centro Moco (Campbell y cols., 2001).

Se ha reportado la existencia de 4 tipos diferentes de nitrato reductasa capaces de catalizar la reacción de nitratos (NO_3) a nitritos (NO_2):

1) Nitrato reductasas asimilativas eucarióticas (Solomonson y Balber., 1990; Moreno-Vivián y cols., 1999)

2) Tres enzimas NR bacterianas diferentes (Moreno- Vivián y cols., 1999):

- a) Nitrato reductasa bacteriana asimilatoria que se encuentra en el citoplasma (Nas)
- b) Nitrato reductasa periplásmica Asimilatoria (Nap)
- c) Nitrato reductasa respiratoria unida a membrana (Nar)

Tabla 1. Clasificación de las Nitrato Reductasas

Nitrato Reductasa	Nas Asimilatoria	Nar respiratoria	Nap
Localización	Citoplasma	Membrana	Periplasma
Reacción catalizada	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$
Genes estructurales	<i>nasCA / narB</i>	<i>nar GHI</i>	<i>nap AB</i>
Grupos prostéticos	FAD, FeS, MGD	cytb, FeS, MGD	cytc, FeS,

1.4. La Nar de *Escherichia coli*

La NR de *E. coli* utiliza a los nitratos como aceptor de electrones durante su crecimiento anaeróbico. Esta enzima esta compuesta de 3 subunidades: una subunidad α catalítica (NarG) con un peso molecular de 112 a 140 kDa y como cofactor molidopterin guanidin dinucleótido (MGD); una subunidad soluble β (NarH) con un peso molecular de 52 a 64 kDa con un centro [3Fe-4S] y 3 [4Fe-4S], y con un peso molecular de 19 a 25 kDa la subunidad γ (NarI) que tiene un grupo bihemo b oxidante de quinol (Blasco y cols., 1992).

Las subunidades solubles α y β se encuentran ancladas en el lado citoplasmático de la membrana por la subunidad γ y pueden solubilizarse con detergentes y calor. El complejo $\alpha\beta$ lleva a cabo la reducción del metil vilogenase (Bonneyoy., 1994).

Esta NR esta acoplada a una cadena transportadora membranal, donde la molibdoenzima Nitrato Reductasa A (NRA) (la apoNRA + el molibdocofactor, MoCo) cataliza la reducción del nitrato a nitrito (Haddock y Jones., 1977; Stewart., 1988; Wootton y cols., 1991).

En las nitrato reductasa los 3 eventos bioquímicos que se tienen que llevar a cabo para la asimilación del nitrógeno son los siguientes:

- a) Transporte de nitrato a la célula
- b) Reducción de NO_3 a NO_2
- c) Reducción de NO_2 a amonio (Kobayashi., y cols. 2005)

1.5. Ciclo de reacciones en reducción de NO_3

El ciclo catalítico de la NR se divide en 3 partes: una reacción de reducción en la cual NAD(P)H reduce a FAD , la transferencia de 2 electrones vía citocromo b5 y la reacción de oxidación en la cual el centro Mo transfiere estos electrones a nitratos, de ese modo se forman de nitritos e hidróxido (Skkipper y cols., 2001).

La reacción comienza con la reducción del centro Mo (IV). El NO_3 se une al sitio activo y reemplaza en forma ecuatorial un hidróxido ligado a una molécula de agua. De esta manera forma un intermediario de reacción. Al llegar a la oxidación del centro Mo a Mo (VI), el enlace entre $\text{NO}_3\text{-O}_2\text{-N}$ se disocia, y los NO_2 pueden ser liberados. Después de ser completada la reducción, se regenera un molibdeno [Mo (IV)] para el siguiente ciclo (Fig. 1).

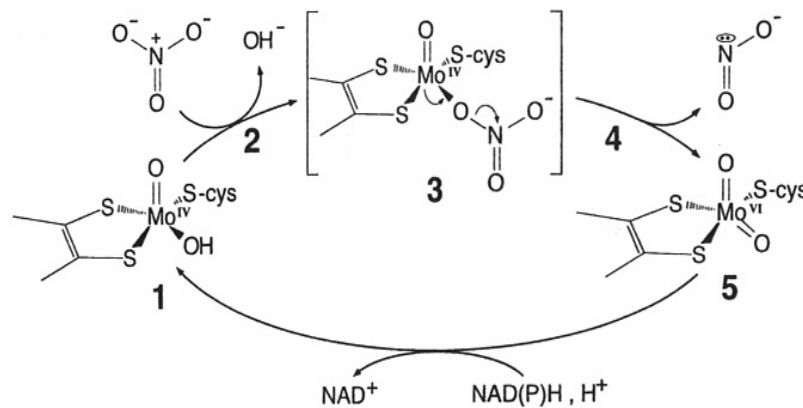


Figura 1. Reacción de Reducción de NO_3 a NO_2 en el sitio activo de la nitrato reductasa

1.6. Inhibidores

Los inhibidores enzimáticos son agentes moleculares que interfieren en la catálisis haciéndola más lenta. Las enzimas catalizan prácticamente todos los procesos celulares. El estudio de los inhibidores enzimáticos también ha proporcionado información valiosa sobre los mecanismos enzimáticos y ha ayudado a definir algunas rutas metabólicas. Hay dos amplias clases de inhibidores enzimáticos: reversibles e irreversibles (Nelson y Cox, 2000).

La inhibición reversible puede ser clasificada: en competitivos, no competitivos y acompetitivos (Nelson y Cox, 2000).

El tungsteno es un metal que se encuentra en el grupo del Cr, Mo y uranio de la tabla periódica. El tungsteno se ha descrito como un inhibidor específico de las enzimas que contienen molibdeno en su estructura (Deng y cols., 1989). Se ha reportado que el molibdeno es reemplazado por tungsteno en las enzimas nitrogenasa (Campbell y cols., 1985), nitrato reductasa y la biotina sulfito oxidasa (Prins y cols., 1980; Loppes y cols., 1999), generando inactivación de las enzimas (Deng y cols., 1989) ya que el tungsteno presenta un tamaño y comportamiento químico muy similar al molibdeno (Makdessi y cols., 2001). Se ha reportado NR presente en *E. coli* es inhibida cuando se le adiciona al medio de cultivo tungsteno. Sin embargo, esto no sucede en cultivos de *Pyrobaculum aerophilum* aún con altas concentraciones de tungsteno (Afshar y cols., 2001).

La azida de sodio es un inhibidor específico de algunas enzimas dependientes de Molibopterina (por ejemplo las NR unidas a membrana) (Craske y Ferguson., 1986).

1.7. Genes

Se han aislado y secuenciado total o parcialmente los genes que codifican para la NR de un gran número de organismos (Wray y cols., 1989; Lin y cols., 1993). Se ha descrito que en hongos y algas hay posibilidades de que solo exista un gen único que codifica para la NR (Fu y cols., 1987), sin embargo en plantas superiores la situación varía dependiendo de la especie; así oscila desde un gen

en caso de la *Nicotiana plumbaginifolia* (Caboche y cols., 1990), a varios genes como ocurre con *Oryza sativa* (Keinhofs y cols., 1990). La nomenclatura de estos genes es confusa porque se le ha dado diferentes nombres a genes homólogos en diferentes bacterias.

En las bacterias donde se han descrito con más frecuencia los genes de la NR son *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxytoca* (Lin y cols., 1998), *Bacillus subtilis* (Ogawa y cols., 1995) *Azotobacter vinelandii* (Gangeswaran y cols., 1996), y *Escherichia coli* (Bonney y cols., 1994), así como ciertas cepas de *Cyanobacteria*. Los genes codificados para el sistema de la nitrato reducción se encuentran agrupados y han sido clonados en varias especies de bacterias. Esta agrupación incluye genes regulatorios y estructurales, los cuales codifican para proteínas requeridas para la reducción de nitratos y nitritos (Flores y cols., 1994).

2. *Entamoeba histolytica* (Eh)

2.1. Amibiasis

La amibiasis intestinal es una infección producida por *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*). Esta enfermedad ataca al ser humano en cualquier edad, siendo más frecuente en niños y adultos jóvenes. Es la tercera enfermedad parasitaria más importante del mundo (Tsutsumi y cols., 2000).

2.2. Ciclo de vida

Este protozoario incluye las siguientes fases: trofozoíto, prequiste, quiste, metaquiste y trofozoíto metaquístico. La infección se inicia con la ingesta de quistes (los cuales son capaces de resistir el pH gástrico) provenientes de agua o alimentos contaminados con materia fecal. En el intestino delgado ocurre la llamada exquistación, que consiste en la división del quiste tetranucleado que da origen a ocho núcleos (estado metaquístico transitorio), la división citoplásmica continúa y emergen ocho trofozoitos. Los trofozoitos se dirigen al intestino grueso para colonizarlo, ahí se alimentan de bacterias y restos celulares. Finalmente, los trofozoitos pueden enquistarse completando el ciclo (Ravdin, 1995). En la mayoría

de los individuos infectados la *E. histolytica* habita como comensal inofensivo en el intestino grueso (Trissl., 1982) (Figura 2).

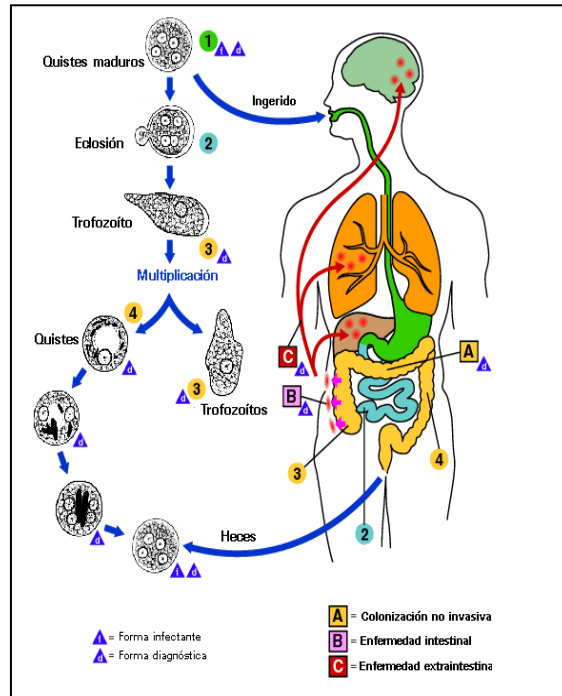


Figura 2. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*

2.3. Morfología

Los trofozoítos o formas vegetantes son notablemente móviles, tienen un solo núcleo, miden de 7 a 30 μm . Su citoplasma presenta zonas que no están claramente separadas. Los estudios realizados muestran que los trofozoítos de *E. histolytica*, no presentan organelos típicos bien diferenciados, tal como se describen en otras células eucarióticas, como es la mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, centríolos y microtúbulos. (Tsutsumi y cols., 2002). Con base a estudios bioquímicos (zimodemos), inmunológicos (con anticuerpos monoclonales) y genéticos (sondas de DNA), *E. histolytica* ha sido clasificada dentro de 2 especies morfológicamente idénticas, pero genéticamente diferentes: *Entamoeba histolytica* la cual es potencialmente invasiva y *Entamoeba dispar* la cual no lo es (W.H.O., 1997).

2.4. Metabolismo

Los trofozoítos de *E. histolytica* poseen un metabolismo principalmente anaerobio, no se ha descrito la presencia de actividades enzimáticas correspondientes al ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa, por lo que el adenosin trifosfato (ATP) proviene exclusivamente de la glucólisis. (Reves R., 1984; Saavedra y cols., 1996). Para la degradación de la glucosa a piruvato, *E. histolytica* utiliza la vía glucolítica clásica. Sin embargo en algunas reacciones no se utiliza ATP, sino pirofosfato inorgánico como cofactor. No se ha detectado la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, por lo que el lactato no es uno de los productos finales de la glucólisis. En este parásito no existe Ciclo de Krebs. En la mayoría de los organismos la transformación de fosfoenolpiruvato a piruvato se realiza por la enzima piruvatocinasa. En *E. histolytica* esta reacción es catalizada por la piruvato fosfodicina, la cual es otra enzima dependiente de pirofosfato. En la mayor parte de los organismos el piruvato lleva a cabo una descarboxilación oxidativa para formar acetil-CoA. En las mitocondrias y bacterias aeróbicas esta reacción es catalizada por un complejo multienzimático llamado piruvato deshidrogenasa, los electrones generados durante la reacción son transferidos al NAD^+ . En *E. histolytica* esta misma reacción es catalizada por la enzima dimérica piruvato ferredoxin oxidoreductasa (PFO) y los electrones son transferidos a una ferredoxina (Saavedra-Lira y Pérez-Monfort., 1996).

El transporte de electrones de sustratos reducidos a oxígeno molecular no está totalmente comprendido en la *E. histolytica*. Sin embargo se ha propuesto que los electrones son transferidos de los sustratos reducidos a la siguiente cadena: NADP, flavinas, proteínas hierro- azufre, ubiquinona, un aceptor desconocido con un potencial electronegativo similar al citocromo C y oxígeno; este último es reducido a agua. (Weinbach., 1988).

Dentro de los hallazgos más importantes que se encontraron en el análisis de la glucólisis de este parásito es que el 50% de las enzimas que participan en la vía son cinética y estructuralmente diferentes a las que se encuentran en el humano, por lo que es posible establecer una inhibición especie-específica de esta vía metabólica (Saavedra y cols., 2004). Las enzimas de la amiba que no tienen

homología con respecto a las del humano son la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato (PPI-PFK), aldolasa (ALDO), la fosfoglicerato mutasa (PGAM) y la piruvato fosfato dicinasa (PPDK). En estos casos, las enzimas de la *E. histolytica* muestran mayor similitud con las enzimas bacterianas o plantas (Saavedra y cols., 1994). La PPI-PFK tiene diferencias significativas con respecto a la enzima dependiente de ATP (ATP-PFK) presente en mamíferos. La ATP-PFK cataliza la reacción irreversible, es alósterica, su actividad es modulada por diversos metabolitos que la interconectan con otras vías metabólicas y es una de las enzimas que controlan el flujo glucolítico en células humanas (Rapoport y cols., 1976). En contraste, la PPI-PFK de amiba cataliza una reacción reversible (Reeves y cols., 1974; Saavedra y cols., 2004). Por lo tanto, cabe esperar que la PPI-PFK no desempeñe un papel relevante en el control del flujo glucolítico. (Chi y cols., 2001).

2.5. Mecanismos de patogenicidad

a) Lectina amibiana (Gal/GalNAc)

El primer paso para que las amibas invadan el intestino, es la adhesión de los trofozoítos a las células epiteliales intestinales. Esta adhesión esta mediada principalmente por una lectina amibiana específica para galactosa (Gal) y *N*-acetyl-D-galactosamina (GalNAc) presente en la superficie de la amiba (McCoy y cols., 1994; Vines y cols., 1998). Después de este contacto íntimo la amiba libera polipéptidos formadores de poros llamados “amoebaporos”.

b) Amoebaporos

Estos amoebaporos son péptidos que se encuentran en los gránulos citoplasmáticos de los trofozoítos de *E. histolytica* (Leippe y cols., 1994), y son capaces de matar células eucarióticas metabólicamente activas y de tener actividad antibacteriana (Leippe y Müller-Eberhard., 1994; Andra y cols., 2003).

c) Proteinasas de cisteína

Rompen la colágena, elastina, fibrinógeno, y laminina para causar enfermedad invasiva (Keene y cols., 1986; Luaces y Barrett., 1988). También rompen a la proteína C3 del complemento (Reed y Gigli., 1990), degradan a los anticuerpos SIgA (Que y Reed., 2000) e IgG (Tran y cols., 1998), y a las anafilatoxinas, C3a y C5a (Reed y cols., 1995).

2.6 Óxido nítrico y *E. histolytica*

En estudios previos se demostró que los hámsteres infectados con trofozoítos de *E. histolytica* producen óxido nítrico (NO), cuantificable en el suero en la forma de nitritos. La producción de NO se incrementa a medida que la infección evoluciona y es proporcional al tamaño de las lesiones, o sea al grado de destrucción tisular. Esto indica que a pesar de la elevada producción de NO no hay una aparente eliminación de los trofozoítos, por el contrario la mayor concentración de NO se relaciona con daño más severo (Pacheco-Yépez y cols., 2001).

Recientemente se reportó un trabajo realizado (Hernández-Campos y cols., 2003) con anillos aórticos de rata sin endotelio se demostró que el sobrenadante del medio de cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*, produjo una relajación de los anillos en forma dependiente de la concentración de amibas. Dicha relajación se inhibió parcialmente cuando las amibas se incubaron durante 48 horas con L-NAME o aminoguanidina. Por otro lado, en los anillos aórticos pre-tratados con azul de metileno pero no aquellos tratados con L-NAME, se inhibió parcialmente la relajación. Dichos resultados sugirieron que los trofozoítos de *E. histolytica* producen un metabolito del NO que causa una relajación dependiente de la producción del guanosín monofosfato cíclico (GMPc).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La amibiasis producida por *E. histolytica* constituye la tercer causa de morbi-mortalidad por enfermedades parasitarias, seguida de la malaria. Este parásito es el responsable de la mortalidad severa a nivel mundial en personas que viven en condiciones de pobreza. Una de sus características es que carece de mitocondrias y todavía hoy día no está claro como obtiene su energía para llevar a cabo sus funciones vitales.

El tratamiento es poco satisfactorio ya que actualmente los fármacos utilizados son poco eficaces y en algunas ocasiones tóxicos. Por lo que es importante estudiar rutas metabólicas que solo afecten al agente patógeno y que no se encuentren presentes en el hospedero. Además, una vez que se conozcan mejor dichas rutas se pueden aprovechar para el diseño racional de fármacos (Ondarza., 2000).

En recientes estudios con anillos aórticos de rata sin endotelio se demostró que el sobrenadante del medio de cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*, produjo una relajación de los anillos en forma dependiente de la concentración de amibas y la producción de óxido nítrico (NO) (Hernández-Campos y cols., 2003). Una de las fuentes posibles de la producción de este NO fue buscar la presencia de la sintasa de óxido nítrico (NOS) en los trofozoítos de las amibas. Hasta este momento no se ha encontrado dicha evidencia por lo que es posible que este NO sea producido por la NR. Actualmente se desconoce si en los trofozoítos de *E. histolytica* está presente dicha enzima y si esta sea la responsable de la producción del NO.

III. HIPÓTESIS

Si los trofozoítos de *E. histolytica* poseen la enzima de la nitrato reductasa, entonces esta podría ser la posible fuente de la producción de NO.

IV. OBJETIVO GENERAL

Demostrar la presencia de la enzima nitrato reductasa en trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Demostrar la presencia de los genes que integran la enzima nitrato reductasa en trofozoítos de *E. histolytica* mediante la técnica de la reacción de la cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR).
- 2) Determinar el peso molecular de la proteína amibiana con actividad de nitrato reductasa a través de una electroforesis SDS-PAGE.
- 3) Determinar la similitud antigénica de la proteína con actividad de nitrato reductasa presente en *E. histolytica* mediante inmunodetección con anticuerpos específicos.
- 4) Determinar la actividad enzimática de la nitrato reductasa presente en las amibas.
- 5) Demostrar el efecto inhibitorio de tungsteno y azida de sodio sobre la actividad de la nitrato reductasa presente de los trofozoítos de *E. histolytica* mediante la técnica de Griess.

VI. METODOLOGIA

1. Cultivo de amibas

Los trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1: IMSS se cultivaron en medio axénico de acuerdo al procedimiento de Diamond (Diamond y cols., 1978) y se cosecharon durante la fase de crecimiento logarítmico.

2. Extracción de RNA Total

Se extrajo el ácido ribonucleico (RNA) total de *E. histolytica* usando Perfect RNATM, Eukaryotic, Mini (Eppendorf). El RNA se cuantificó mediante el espectrofotómetro a 260 nm utilizando el GENESYS 10 Series (ThermoSpectronic) y se comprobó su integridad en un gel agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio en buffer de MOPS y formaldehído. (Apéndice A). Para prevenir contaminación se trató con un inhibidor de DNasas (Invitrogen). El RNA fue almacenado a -70°C.

3. Electroforesis en gel de Agarosa al 1.5%

A 30 mL de agua bidestilada se agregó 450 mg de agarosa, se agitó y se le adicionó 600 µl de TAE 50X. La mezcla anterior se calentó por 30 segundos hasta disolverse completamente, se puso a enfriar un poco y se le adicionó 1.5 µl de bromuro de etidio. Se agitó y se incorporó en la base para electroforesis de agarosa con 600 mL de buffer de carga (TAE 1X). Se corrieron las muestras con 1µl de buffer de carga por 20 minutos a 55 volts y se observó en la cámara de luz ultravioleta.

4. Diseño de Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados para este estudio mediante los programas FAST PCR y Oligo Analyzer 3.0 a partir de las secuencias publicadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). Se buscó en el Gene bank la secuencia codificante para cada uno de los genes de la nitrato reductasa de *E. coli*, y posteriormente se diseñaron cebadores específicos para cada subunidad y se analizaron por el programa Primer 3 para verificar que no se forman dímeros o heterodímeros entre sí.

5. Reacción de la cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

Se realizó la reacción en un paso utilizando la transcriptasa reversa y la taq Polimerasa. Se adicionó buffer 10X MMLVRT, 0.1 MDTT, oligo (dT) primers, RNA, agua y la enzima en un volumen final de 50µl. Se incorporó en el termociclador, y se verificó que haya amplicón en la electroforesis de agarosa al 1.5 %. Al final se tiñó con bromuro de etidio.

6. Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR)

Para verificar los amplicones obtenidos en la técnica anterior se realizó PCR de cada subunidad. Se preparó una mezcla para la subunidad gamma (γ) de la nitrato reductasa. Se utilizaron sus respectivos oligonucleótidos Forward y Reverse., a la temperatura de alineación correspondiente para cada subunidad, según lo recomendado por la casa comercial (Promega). Se adicionó 12.5 µL de buffer PCR 10X, 1.0 µL de oligonucleótidos (forward), 1.0 µL de oligonucleótidos (reverse), 9.5 µL de agua miliQ, y 1 µl de DNA para cada muestra (volumen final= 25 µL). Después se incorporó al termociclador con su programa específico de cada muestra (Apéndice A). Se verificó la presencia del amplicón en la electroforesis para agarosa al 1.5 %, teñido con bromuro de etidio.

7. Preparación del extracto crudo de *E. histolytica*

Las amibas se lavaron 3 veces por centrifugación a 3,000 rpm/4°C/5 minutos con PBS 1x (buffer regulador de fosfatos pH 7.4). Al final del último lavado se eliminó el sobrenadante con una pipeta Pasteur, y el botón de amibas se resuspendió en 5 mL de octilβglucósido que contiene 500 μL del cocktail de inhibidores de proteasas, se agitó en un vórtex y se guardó en congelación a -70°C para ser usado al día siguiente.

8. Obtención del anticuerpo policlonal anti-Nitrato reductasa de *E.coli* en conejo

Se inmunizó a un conejo de la raza Nueva Zelanda con la nitrato reductasa de *E. coli* (SIGMA) junto con 100 μg de adyuvante completo de Freund's. Después se volvió a inmunizar dos veces con 100 μg de adyuvante incompleto de Freund's, con intervalos de 14 días cada inmunización.

9. Determinación del peso molecular de la proteína con posible actividad de nitrato reductasa presente en *E. histolytica* por medio de la electroforesis SDS-PAGE e inmunotransferencia

Se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) al 10% en condiciones reductoras (Laemmli., 1970), del extracto crudo amibiano. Este lisado amibiano fue previamente desnaturalizado para posteriormente aplicarlo al gel ya polimerizado. También se aplicaron marcadores preteñidos de peso molecular conocidos. Una vez terminado el tiempo de la electroforesis, se transfirieron las proteínas separadas junto con los marcadores de peso molecular a una membrana de nitrocelulosa (Towbin y cols., 1979). Terminada la inmunotransferencia se tiñó la membrana con rojo de Ponceau para revelar las bandas, y compararlas con los marcadores de peso molecular conocidos.

10. Inmunodetección de la proteína amibiana con posible actividad de nitrato reductasa empleando anticuerpos anti-nitrato reductasa de *E. coli*

Después de haber realizado una electroforesis SDS-PAGE al 10% (Laemmli., 1970) del extracto crudo amibiano, se llevó a cabo la transferencia a una membrana de nitrocelulosa por 1 hora a 350 mA (Towbin y cols., 1979). Una vez terminada la transferencia, la membrana se reveló con rojo de Ponceau para confirmar que la transferencia se había llevado a cabo y ver las bandas. Después se marcaron los carriles y se cortaron. Enseguida cada carril recortado se incubaron con un buffer de PBS pH 7.4 que contenía caseína al 10% a 37°C/1hora. Posteriormente se lavaron con PBS tween y cada tira se volvió a incubar toda la noche a 4°C con su respectivo anticuerpo: anti-Nar (obtenido del suero del conejo previamente inmunizado con la Nar de *E. coli*). Al siguiente día se volvieron a lavar las tiras con PBS tween, y se incubaron a 37° C, con el segundo anticuerpo que es chivo anti-conejo. Para la detección se reveló con 4-cloro naftol.

11. Determinación de la posible actividad de nitrato reductasa presente en los trofozoítos de *E. histolytica*

Para cuantificar la actividad enzimática de la Nar de acuerdo a la metodología de Blasco y Martínez 1997, se utilizaron 4 matraces kitasato de 250 mL los cuales contenían: 150 mL de agua milli Q, 100 mL de nitrato de sodio, 100 mL de buffer fosfato de potasio, y 40 mL de agua milliQ, respectivamente.

Enseguida se colocaron en un recipiente con hielo y se desgasificaron durante 30 min. Posteriormente se tomaron 20 mL del buffer de fosfatos y se adicionaron al último matraz que contenía los 40 mL de agua millQ, además se le adicionó de 80 mg de ditionito de sodio, 80 mg de bicarbonato de sodio y 5 mg de metil viologenasa. Este último matraz dio una coloración azul intenso. Se marcaron 9 tubos de ensaye. A todos se les adicionó la solución del último matraz y solo a 2 se les agregó la enzima nitrato reductasa (extracto amibiano). Se colocaron los 9 tubos a incubaron en un baño maría 30 min. a 30 ° C. La reacción se debía mantener con el color azul intenso. Posteriormente se agitó en el vórtex

vigorosamente hasta que desapareció el color, inmediatamente se le agregó reactivo de Griess y se incubó 10 min. a temperatura ambiente. Se leyó a 540 nm.

12. Efecto inhibitorio de la azida de sodio y tungsteno en la actividad de la proteína amibiana con posible actividad de nitrato reductasa

Se ajustaron 800,000 amibas/mL en su medio de cultivo, en tres diferentes condiciones. El primer grupo sólo tuvo medio de cultivo, el segundo grupo se le adicionó azida de sodio (200 μM), y al tercer grupo se le adicionó tungsteno (200 μM). Todas las muestras se hicieron por triplicado, y en 3 tiempos diferentes (24, 48 y 72 horas) para cuantificar NO_2^- y a otras NO_3^- . Las muestras para cuantificar nitritos se les adicionó limaduras de cadmio (Gutman y Hollywood.,1992), para reducir los nitratos a nitritos, y se incubaron a 37°C/4 horas. Después se tomaron 150 μL de cada muestra previamente desproteinizada con sulfato de zinc al 30%, más 150 μL del reactivo de Griess (Sulfanilamide al 1% y N-1 naphthylethylenediamine dihydrochloride con H_3PO_4 al 5%), se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos y se leyeron a una absorbancia de 540 nm. La concentración de NO_2^- fue determinada en base a una curva estándar de nitrito de sodio en PBS 1X, con una concentración de 0.5 a 100 μM .

VII. RESULTADOS

1. Expresión de la Nar en *E. histolytica*

Mediante la técnica de biología molecular RT-PCR y el uso de oligonucleótidos específicos para cada una de las subunidades de la Nar, diseñados a partir de la secuencia genómica de *E. coli*, se identificaron tres amplicones. En las figuras 3, 4 y 5 se muestra el amplicón correspondiente a cada subunidad que integran a la Nar presente en *E. histolytica* respectivamente. Los tamaños esperados para cada amplicón fueron: para la subunidad α de 373 pb, la subunidad β 341 pb y la subunidad más pequeña corresponde a la γ con 183 pb. El tamaño del producto amplificado esperado para cada subunidad fue comprobado con un marcador de peso molecular (M).

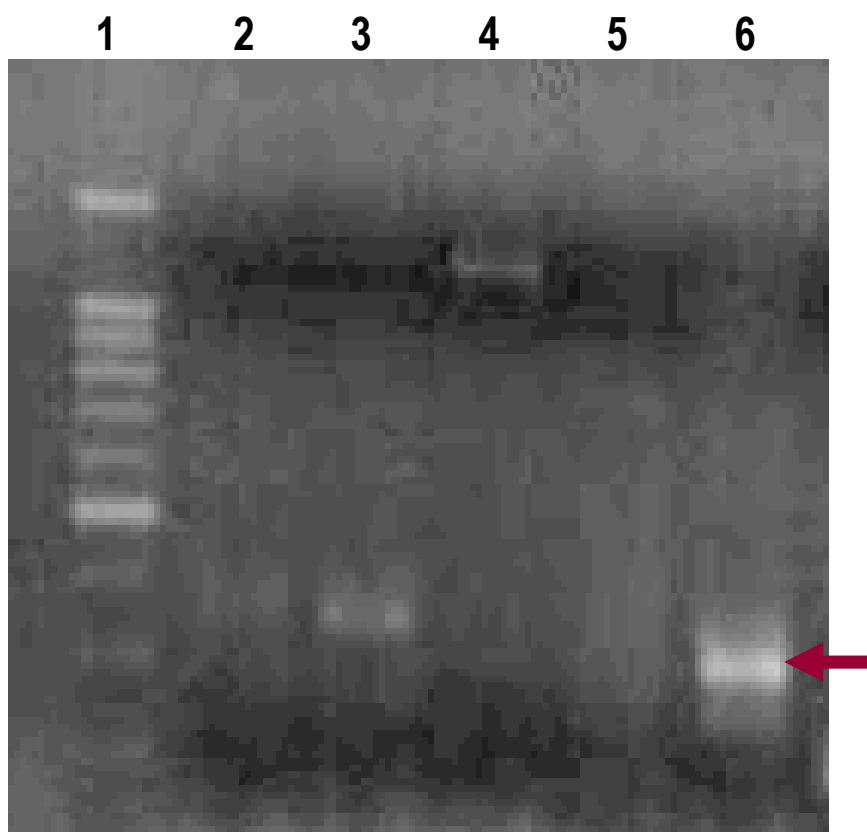


Figura 3. Imagen de RT-PCR de *E. histolytica* en gel de agarosa al 1.5%. En la figura se muestra el marcador de peso molecular de 100 pb (carril 1) y la subunidad α (carril 6).



Figura 4. Imagen de RT-PCR de *E. histolytica* en gel de agarosa al 1.5%. En la figura se muestra el marcador de peso molecular de 100 pb (carril 1) y la subunidad β (carril 3).

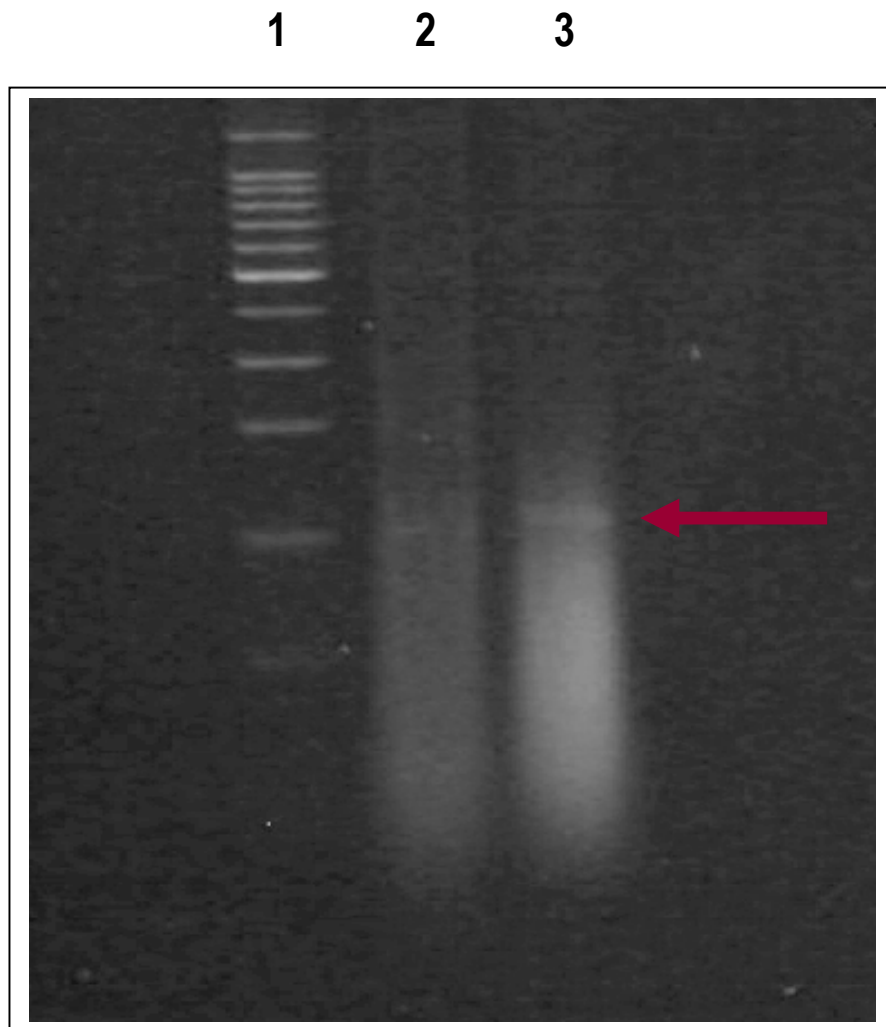


Figura 5. Imagen de RT-PCR de *E. histolytica* en gel de agarosa al 1.5%. En la figura se muestra el marcador de peso molecular de 100 pb (carril 1) y la subunidad γ (carril 2 y 3).

2. *E. histolytica* posee proteínas que son reconocidas por el anticuerpo antiNar obtenido del conejo

En el lisado de los trofozoítos de *E. histolytica* se realizó la inmunodetección de la NR empleando el anticuerpo antiNAR producido en el conejo. La figura 6 muestra el análisis del western blot donde el anticuerpo reconoció 4 proteínas presente en la amiba, con los siguientes pesos moleculares 150 kDa, 80 kDa, 47 kDa y 40 kDa respectivamente.

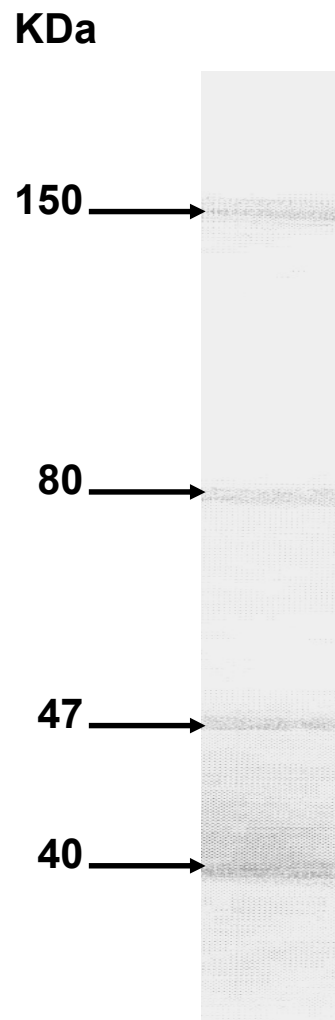


Figura 6. Análisis del Western blot del lisado de los trofozoítos de las amibas utilizando un anticuerpo antiNar.

3. Actividad enzimática de la Nar de *E. histolytica*

Para demostrar la presencia de actividad de la proteína con actividad de Nar en *E. histolytica*, se cuantificó la producción de NO_3 y NO_2 producidos por los trofozoítos amibianos en el medio de cultivo, empleando la reacción de Griess (Green y cols., 1982; Havel y Marletta, 1994). La actividad fue cuantificada a través de un ensayo con metil viologenasa como donador de electrones para la reducción de los NO_3 a NO_2 (McGregor.,)(Tabla 2).

Tabla 2. Actividad de la Nar presente en *Entamoeba histolytica*

Actividad de la Nar (nM nitrito $\mu\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$)	
Control	0.3 ± 0.05
NO_3	2.14 ± 0.37 *

Los datos son la media \pm el error estándar del ensayo de la actividad de la Nar mediante un microensayo en placa para nitritos, basado en la reacción de Griess.

* Existe una diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$)

** Existe una diferencia significativa con respecto a la incubación con nitrato de sodio

4. Efecto inhibitorio del tungsteno y azida de sodio de la Nar de *E. histolytica*

Como se puede observar en la figura 7, la administración del tungsteno y azida de sodio en los cultivo de los trofozoítos de *E. histolytica* a las 24, 48 y 72 horas inhibieron la actividad de la Nar presente en ellos. Esta inhibición se cuantificó a través de la cuantificación de nitritos en el medio de cultivo correspondiente (Green y cols., 1982; Havel y Marletta, 1994).

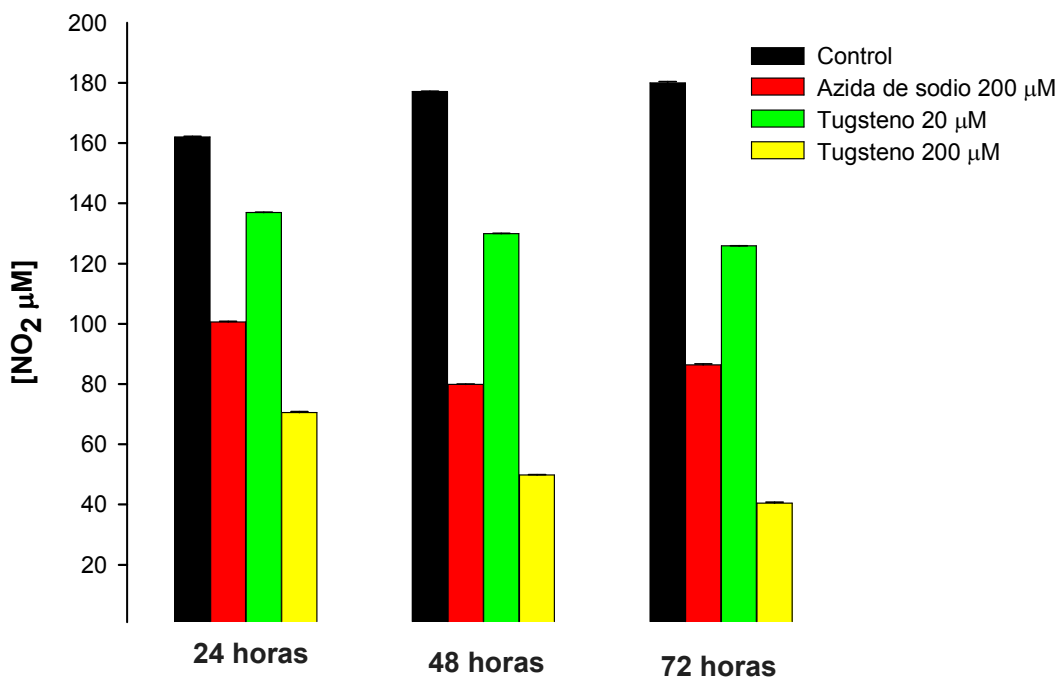


Fig. 7. Efecto inhibitorio del tungsteno y la azida de sodio sobre la Nar presente en *E. histolytica*. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 5 experimentos.

* $p < 0.05$ contra el control

VII. DISCUSIÓN

La amibiasis ocupa la segunda causa de muerte por protozoarios a nivel mundial (Pérez-Tamayo y cols., 1997). El tratamiento de esta patología es farmacológico, los 2 compuestos amebicidas más utilizados son el metronidazol y iodohidroquinoleínas. Sin embargo, el metronidazol es considerado como un posible carcinogénico y la iodohidroquinoleína tiene varios efectos sobre el sistema ocular el cual produce el Síndrome de mielopatía óptica subaguda.

Un problema en el uso de la quimioterapia para el tratamiento de la amibiasis es el posible surgimiento de trofozoítos resistentes a las drogas, al reportarse cepas de *Giardia lamblia* y *Trichomona vaginalis* resistentes al metronidazol. (Orozco y cols., 1996). Sin embargo, dados los efectos conocidos y potenciales, además de la resistencia a estas drogas, actualmente se ha propuesto un diseño por el método racional de fármacos, para sintetizar nuevos compuestos en contra de moléculas blanco específico de los parásitos, generalmente enzimas metabólicas.

El hecho de que *E. histolytica* posea características metabólicas diferentes a los eucariontes superiores, pone de manifiesto la importancia de descubrir estas vías metabólicas que pudieran ser el blanco de nuevos fármacos, así como la reevaluación de los ya existentes para el tratamiento de la amibiasis.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue la detección de la enzima nitrato reductasa en trofozoítos de *E. histolytica*; dicha enzima se encuentra presente en diversos microorganismos y muchos de los cuales la utilizan como fuente de energía para sus funciones vitales. Hasta este momento no se tienen reportes de la presencia de esta enzima en este protozoario.

El hallazgo más sobresaliente de este trabajo es que, por primera vez, se demostró mediante procedimientos de biología molecular, fotométricos y western blot, la presencia de una proteína con actividad de nitrato reductasa en los trofozoítos de *E. histolytica*.

En trabajos previos se demostró que los trofozoítos de *E. histolytica* producen óxido nítrico (NO). La fuente de este NO, producido por las amibas puede ser una isoforma de la NOS (Hernández- Campos y cols., 2003).

Sin embargo, otra posible fuente de producción de NO es mediante la enzima Nitrato reductasa.

En los trofozoítos de *E. histolytica* demostramos la presencia de la Nar. Esta enzima se caracteriza por presentar 3 subunidades: la subunidad α (alpha) que cuenta con un peso molecular de 373 pb (fig.3); la subunidad β (beta) con peso molecular de 341 pb (fig.4) y la subunidad γ (gamma) con un peso molecular de 183 pb (fig.5).

Es importante mencionar que es la primera vez que se demuestra la presencia de los genes de la Nar en *E. histolytica*. Las NR son enzimas que catalizan la reducción de nitrato a nitritos (Afshar y cols., 1998), contienen molibdeno como cofactor, y fueron las primeras enzimas de las que se tienen reportes. En los organismos en los que más se han estudiado son *Aspergillus niger* y *Escherichia coli* (Arias y cols., 2004). La primera NR que se reportó fue en el año de 1959 en *E. coli* (Itagaki y cols., 1959).

Blasco en 1990 reportó la caracterización de las 3 subunidades que integran la Nar en *E. coli*, que coinciden con los 3 amplicones que se obtuvimos en *E. histolytica* (Blasco y cols., 1990).

Afshar y cols., en el 2001 caracterizaron la enzima NR presente en el microorganismo *Pyrobaculum aerophilum*. Esta enzima también está constituida por 3 subunidades: alpha, beta y gama. Y mediante técnicas de biología molecular se encontró la presencia de 3 amplicones, que corresponden a las 3 subunidades.

Por lo que es muy probable que los 3 amplicones encontrados en la *E. histolytica* (Fig. 3,4 y 5) corresponden a los 3 genes que transcriben para las 3 subunidades reportadas para los microorganismos antes mencionados. Con estos resultados el siguiente paso fue determinar la similitud antigénica de la proteína con posible actividad de Nar en *E. histolytica* con la Nar presente en *E. coli*. Ya que esta última, ha sido la más estudiada (Blasco y cols., 1990).

Una vez obtenido el extracto amibiano, las proteínas de *E. histolytica* se separaron mediante una electroforesis SDS-PAGE al 10% (Laemmli, 1970).

Posteriormente, se realizó una inmunodetección con el anticuerpo policlonal anti-Nar de *E. coli* obtenido del conejo previamente inmunizado. Mediante el western blot se demostró la presencia de proteínas con posible actividad de Nar en trofozoítos de las amibas.

El anticuerpo anti-Nar de *E. coli*, detectó al menos 4 proteínas, con los siguientes pesos moleculares 150, 80, 47 y 40 kDa respectivamente (fig.6), los cuales hasta este momento no han sido reportado por otros autores. Sin embargo, Guillaume en el 2004 reportó en *Pyrobaculum aerophilum* una Nar con peso molecular de 145 kDa, y Blasco en el 1992 reportó la presencia de una Nar en *E. coli* con peso molecular de 155 kDa muy similar a la que nosotros encontramos en *E. histolytica* con un peso molecular de 150 kDa (Blasco y cols., 1992). La siguiente proteína amibiana identificada por el anticuerpo anti-Nar de *E. coli*, correspondió a un peso molecular de 80 kDa. Este peso molecular no coincidió con los previamente reportados para Nar en otros microorganismos en la literatura. La tercera proteína amibiana que nosotros encontramos tiene un peso molecular aproximado de 47 kDa. Este peso podría corresponder al reportado en *Pyrobaculum aerophilum* de 58 kDa (Afshar y cols., 2001), siendo similar en peso a la Nar aislada en *Klebsiella aerogenes* de 57 kDa y *Pichia pastoris* de 55 kDa (Guillaume y cols., 2004).

Finalmente la proteína de bajo peso molecular encontrada en la amiba de 40 kDa, es muy similar a la Nar reportada para *Klebsiella aerogen* con peso molecular de 52 kDa, sin embargo Minagawa reportó en *Aspergillus nidulans* en 1982 con peso molecular mas cercano de 38 kDa (Minagawa y cols., 1982).

Es importante mencionar que dependiendo del microorganismo puede variar el numero de las subunidades de la nitrato reductasa que podemos encontrar; éste es el caso, de la microalga *Ankistrodesmus braunii*, está constituida por 9 subunidades con diferentes pesos moleculares (De la Rosa y cols., 1980).

Una vez identificadas las proteínas con actividad de Nar, el siguiente paso fue la cuantificación de reducción de nitratos a nitritos mediante la técnica de Griess (Green y cols., 1982; Havel y Marletta, 1994), como una manera indirecta de medir la actividad. Por otro lado, una limitante del estudio bioquímico de la Nar es la complejidad de la enzima (Mertens y cols., 2000). El ensayo consistió en medir la actividad de Nar en presencia de metil viologenase como un donador artificial de electrones.

Afshar y cols. reportaron en 1998 valores de actividad enzimática para nitrato reductasa de 1.36 U/mg de proteína en *Pirobaculum aerophilum*, mientras que nosotros encontramos una actividad de 1.24 U/mg en *E. histolytica*. Estos datos nos muestran una actividad muy similar entre los dos organismos: Ya que en *Pirobaculum aerophilum* la Nar tiene un papel en la obtención de energía (Afshar y cols., 2001), esto nos hace pensar que en *E. histolytica* tiene la misma función.

Por último con todas las evidencias antes mostradas se decidió utilizar 2 inhibidores selectivos para la Nar, como son la azida de sodio y tungsteno, con la finalidad de determinar si existe inhibición a este nivel.

Se cuantificó la producción NO_3 y NO_2 producidos por los trofozoítos amibianos (Gilliam y cols., 1993) en presencia de los inhibidores en diferentes tiempos y concentraciones. Nosotros encontramos una disminución significativa de la actividad de la Nar con la concentración de 200 μM de azida a las 72 hrs. en la producción de NO_2 (Fig. 7)

La azida de sodio es un inhibidor de nitrato reductasa en *E. coli*. (Elliott J. y cols., 2004). Sin embargo, *E. coli* mutante puede sobrevivir en altas concentraciones de metales tóxicos en el medio (Antipov y cols., 1999).

Estudios previos, refieren que en *Chlamydomonas reinhardtii*, muestra una disminución en la actividad de la nitrato reductasa en presencia de concentraciones de 200 μM de azida de sodio en el medio de cultivo (Yamasaki-Sakihama., 2000) pero se vió que la actividad es completamente inhibida en la presencia 300 μM . Guerrero reportó disminución de la viabilidad en la

concentración antes mencionada de azida de sodio en el medio de cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*, en un 85% (Guerrero y Gutiérrez, 1997).

Aunque se ha demostrado inhibición de la Nitrato reductasa a bajas concentraciones de azida, es importante mencionar que esta regla no se cumple para todas las de nitrato reductasas (Antipov y cols., 1999).

Con relación al tungsteno en concentraciones bajas de 20 μM no encontramos inhibición. Se ha mencionado por algunos autores que el tungsteno es un elemento que estimula el crecimiento de varios microorganismos. Muchos de estos, pueden crecer con la suplementación de tungsteno en el medio de cultivo. En general, las enzimas que contienen molibdeno como cofactor, como es el caso de la nitrato reductasa, son inactivadas por la adición de tungsteno en el medio de cultivo (Afshar y cols., 1998). En cianobacterias como la *Anabaena*, la presencia de tungsteno en el medio de cultivo inhibe el crecimiento, inactiva la nitrogenasa y a la nitrato reductasa (Kumar y cols., 1980).

En contraste, con *E. coli*, que su crecimiento anaerobio es inhibido cuando se encuentra el tungsteno en el medio. La inhibición del crecimiento se basa en la inactivación del molibdeno contenido en la enzima para la incorporación del tungsteno en este sitio, esto se debe a que presenta un tamaño y comportamiento químico muy similar al molibdeno (Makdessi y cols. 2001).

Cabe, mencionar que en el año de 1999 se estudió una nitrato reductasa que carecía de molibdeno como cofactor en *Pseudomonas isachenkovi* y que sin embargo, en esta enzima hubo inhibición con tungsteno en el medio de cultivo (Antipov y cols., 1999).

Es importante mencionar que encontramos inhibición de la nitrato reductasa a altas concentraciones de tungsteno 200 μM , (este es considerado un método válido para medir la actividad de Nar), lo que nos hace pensar que la proteína encontrada corresponde a la nitrato reductasa, que contiene molibdeno como cofactor y que su actividad se ve inhibida con altas concentraciones de tungsteno.

Otros autores mencionan que con concentraciones de tungsteno menores de 20 μM , no se presenta ningún efecto inhibitorio sobre la formación de NO_2 durante la respiración anaerobia. Sin embargo, cabe destacar que Gates en el

2003, reportó que a de concentraciones de 10 mM de tungsteno en el medio de cultivo la nitrato reductasa de *Paracoccus pantotropus* es parcialmente inhibida.

Además de que el estudio reveló que en *E. coli* el tungsteno es reemplazado por el molibdeno en su sitio activo; cosa que no ocurrió en *Paracoccus pantotropus*. Estos datos sugieren que el tungsteno puede funcionar en el sitio activo de algunas pero no todas las enzimas que contienen molibdeno como cofactor (Gates y cols., 2003). Con todos los resultados anteriores, todavía quedan muchas dudas por resolver como consecuencia al hallazgo de que en las amibas se encuentra una proteína con actividad de Nar en amibas capaz de reducir de nitratos a nitritos (Campbell y cols., 1985; Moreno-Vivián y cols., 1999).

Y si puede presentar adaptación a altas concentración de metales en el medio de cultivo que en otras condiciones pudieran inhibir su crecimiento (Afshar y cols., 1998).

Además sería muy importante determinar la presencia de las 3 subunidades encontradas en la nitrato reductasa que presenta *E. histolytica* también se encuentran en *E. dispar*, comparar pesos moleculares, y si esta presenta actividad de reducción de NO_3 a NO_2 y se incrementa su actividad en presencia de nitrato. Ya que esto pudiera darnos la pauta para pensar en un marcador de patogenicidad que significaría una diferencia entre ambas cepas.

Por otro lado, se debe aclarar si la Nar encontrada en los trofozoítos de la *E. histolytica*, es solo una vía complementaria para obtener energía o requiere de la interconexión con otras vías típicas celulares.

Además podemos especular, que puede presentarse otro tipo de nitrato reductasa en *E. histolytica*, como puede ser la Nap y que solo puede expresarse bajo diferentes condiciones metabólicas, o como mecanismo de autodefensa formando altos niveles de nitritos para inhibir el crecimiento de bacterias que representen competencia, aún en presencia de inhibidores selectivos (Kerber y cols., 1982)

VIII. CONCLUSIONES

- 1.-Se identificaron 3 genes de las subunidades de la Nar en los trofozoítos de la *Entamoeba histolytica*.
- 2.- La enzima Nar presente en las amibas está constituido por subunidades: alfa (373 pb), beta (341pb) y gamma (183pb).
- 3.- Los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* posee al menos 4 proteínas reconocidas por el Ab policlonal anti-nitrato reductasa.
- 4.- La posible actividad enzimática de la proteína amibiana fue de 2.14 U/ mg
- 5.- La actividad enzimática de la proteína amibiana con actividad de Nar fue inhibida por tungsteno y azida de sodio.

IX. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos hasta el momento, es importante determinar:

1. Mediante técnicas de biología molecular, la secuenciación de las 3 subunidades de la proteína con actividad de nitrato reductasa y compararlas con las secuencias genómicas de otros organismos.
2. Por lo tanto, es importante estudiar rutas metabólicas y mediante la inhibición de enzimas que tengan un mayor control sobre la vía productora de energía diseñar un fármaco que bloquee a este nivel.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antipov N., Lyalikova N., Khiznjak V. (1999) Some Properties of Dissimilatory nitrate reductases lacking Molybdenum and Molybdenum cofactor: *Biochemistry* (64)5:581-586

Amy K., Garrett H. (1974) Purification and Characterization of the nitrate reductase from the diatom *Thalassiosira pseudonana*, *Plant Physiol* 54, 629-637

Arias N.S., Jiménez-Romero LA., Solís-Martínez O. (2004) Indirect determination of nitric oxide production by reduction of nitrate with a freeze-thawing-resistant nitrate reductase from *Escherichia coli* MC1061 *Analytical Biochemistry* **328**:14-28

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

Afshar S., Jonhson E., (2001) Porperties of a Thermostable Nitrate Reductasa from the Hyperthemophilic Archaeon *Pyrobaculum aerophilium*. *J Bacteriology* 183 (19) 5491-5495.

Berks B.C., Richardson D.J., Reilly A., Willis A.C. (1995) The napEDABC gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropa* *Biochem.J.* **309**,983-992

Bertero M., Rothery R., et al (2005) Structural and Biochemical Characterization of a Quinol Binding Site of *Escherichia coli* nitrate Reductase A. *Journal of Biological Chemistry*; 280 (15): 14836-7

Blasco F C., Lobbio, J. Ratouchniak, V. Bonnefoy (1990) nitrate reductase of *Escherichia coli*: sequence of the second nitrate reductase and comparison with that encoded by the narGHJI operon. Mol. Gen Genet. **222**:104-111

Blasco F., J. Pommier, V. Auger, M. Chippaux, and Giordano. (1992). Involvement of the narJ or narW gene product in formation of active nitrate reductase in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol, **6**:221-230

Bonnefoy V., Demoss J. (1994) Nitrate Reductases in *Escherichia coli*, Antonie Van Leeuwenhoek, 66(1-3):47-56

Caboche M., Rouzé P (1990) Nitrate reductase a target for molecular and cellular studies in higher plants. Trends Genet. 6, 187-192.

Campbell W. H., (2001) Structure and function of eukaryotic NAD(P)H: nitrate reductase. CMLS. Cell. Mol. Life Sci. 194-204.

Campbell M., Del Campillo-Campbell., Villaret B. (1985) Molybdate reduction by *Escherichia coli* K 12 and its *chl* mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82,227-231

Chi AS, Z Deng, RA Albach, y RG Kemp. (2001) The two phosphofructokinase gene products of *Entamoeba histolytica* Bio. Chem. **276**:19974-19981

Craske A. & Ferguson, S.J. (1986) The respiratory nitrate reductase of *Paracoccus denitrificans*. molecular characterization and kinetic properties. Eur J Biochem **158**: 429-436

DeMoss J., and H.S.P. (1991) Nark enhances nitrate uptake and nitrite excretion in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173, 3303-3310

De la Rosa MA., Diez J., Vega JM., Losada M. (1980) Purification and properties of assimilatory nitrate reductase [NaD(P)H] from *Ankistrodesmus braunii*

Deng M., Moureaux T., Caboche M. (1989) Tungstate, a molybdate analog inactivating nitrate reductase, deregulates the expression of the nitrate reductase structural gene, *Plant Physiol*,91, 304-309

Diamond L S., Harlow DR., Cunnick CC. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 72(4):431-2.

Elliot S J., Hoke KR., et al (2004) Voltammetric studies of catalytic mechanism of the respiratory nitrate reductase from *Escherichia coli*: how nitrate reduction and inhibition depend on the oxidation state of active the site. *Biochemistry*; 27; 43 (3): 799-807

Flores E., Muro –Pastor A.M., y Herrero A. (1999) Cyanobacterial nitrogen assimilation genes and Nte A-dependent control de gene expresión p.p.463-477. Editado por Pescheck, G.A, Loffelhardt W. y Schmettere G. En: *Phototropic procaryotes* Coger Academia/Plenum Publishers, New York

Fischer K, Barbier G.G., (2005) Structural Basis of Eukaryotic Nitrate Reduction: Crystal Structures of Nitrate Reductase Active Site. *The Plant Cell*, vol.17: 1167-1179

Fu H., Marzluf GA (1987) Molecular cloning and analysis of the regulation of nit-3, the structural gene for nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Plant Physiol* 99, 837-842

Gates A J., Hughes RO., Sharp SR., Millington PD., Nilavongse A., Cole JA., Leach ER., Jepson B., Richarson DJ., Butler CS. (2003) Properties of the

periplasmic nitrate reductases from *Paracoccus pantotrophus* and *Escherichia coli* after growth in tungsten-supplemented media. FEMS Microbiol Lett, 28, 220(2): 261-9

Goh S., Rastogi N., Berchel M., Huard C., Sola C. (2005) Molecular Evolutionary history of Tubercle Bacilli assessed by study of the polymorphic nucleotide within the nitrate reductase (*narGHJI*) operon promoter. J of Clin Microbiol (43): 8, 4010-4014

Green L., C. Wagner, D.A., Glogowski, Skipper (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and (¹⁵N) nitrate in biological fluids. Analytical Biochemistry 126, 131-138.

Guilliam MB., Sherman MP., Griscavage JM., Ignarro LJ (1993) A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by *Aspergillus* nitrate reductase Anal Biochem, 212 (2): 359 -65

Guillaume G., Joshi R., Cambell R. (2004) Purification and biochemical characterization of simplified eukaryotic nitrate reductase expressed in *Pichia pastoris*. Protein Expression & Purification 37: 64-71

Guerrero M.G., Vega J.M. y Losada M. (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation Ann: Rev. Plant Physiol. 32, 169-204

Guerrero M.G., Vega J.M. and Losada M. (1987) The assimilatory nitrate reducing system and its regulation Annu. Rev. Plant Physiol. **32**, 169-204

Gutman S I., Hollywood CA. (1992). Simple, rapid method for determining nitrates and nitrites in biological fluids. Clin Chem; 38(10): 2152.

Haddock A. and Jones W. (1977) Bacterial respiration American Society for Microbiology, 41 (1): 47-99

Hernández -Campos Ma. E., Campos-Hernández R. (2003) Nitric oxide synthase in *Entamoeba histolytica*: its effect on rat aortic rings. *Experimental Parasitology* 104, 87-93.

Hoff D., Sprenger W., Postma W., Meyer T., Veenhuis M., Leguijt T., Hellingwerf J. (1994). The photoactive yellow protein from *Ectothiorhodospira halophila* as studied with a highly specific polyclonal antiserum: (Intra) cellular localization, regulation of expression, and taxonomic distribution of Cross- reacting proteins. *Journal of bacteriology*, 176 (13): 3920-3927.

lobby-Nivol C., Santini CL., Blasco F., Giordano G. (1990). Purification and further characterization of second nitrate reductase of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem*; 188 (3): 679-87

Itagaki E., Taniguchi S., (1959) Studies on nitrate reductase system of *Escherichia coli* II soluble nitrate reductase system of aerobically grow cells in synthetic medium, *J Biochem*, 46:1419-1436

Johnson L., Bastian R., Rajagopalan V. (1990) Molybdoterin guanine dinucleotide: A modified form of molybdoterin identified in the molybdenum cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter shaeroides* forma specialis *denitrificans* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3190-3194

Jacobs M., Van der Heide, Drissessen A. (1996). Glutamate transport in *Rhodobacter sphaeroides* is mediated by a novel binding protein-dependent secondary transport system. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93, 12787-12790

Kerber N., Cárdenas J. (1982). Nitrate reductase from *Rhodopseudomonas sphaeroides* *J. Bacteriol.* 150:1091-1097

Keene W E., Petit MG., Allen S., McKerrow JH. (1986). The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. J Exp Med; 163 (3):536-49.

Kleinhofs A., Warner RL (1990) Advances in nitrate assimilation. In: The Biochemistry of plants, Vol. 16, 89-120 (Mifflin BJ, Lea PD, eds) Academic Press. San Diego, USA.

Kobayashi M., Takatani N., Tanigawa M. (2005) Posttranslational regulation of nitrate assimilation in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 Journal of bacteriology 187(2):498-506

Koji I., Y. Shiraiowa., (2003) Characterization of NADH: Nitrate Reductase from the Coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Loman) & Mohhler (Haptophyceae). Marine Biotechnol. 5, 20-26.

Kumar A., Kumar HD (1980). Tungsten-induced inactivation of molybdoenzymes in *Anabaena* Biochim Biophys Acta, 613(1):244-8

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature; 227(259):680-5.

Leimkühler S., Angermüller S., Schwarz., Mendel R., Klipp W. Activity of the Molybdopterin-containing xanthine deshydrogenase of *Rhodobacter capsulatus* can be restored by high Molybdenum concentrations in *moeA* mutant Defective in molybdenum cofactor biosynthesis. Journal of bacteriology, 181(19):5930-5939

Leippe M., Andra J., Nickel R., Tannich E., Muller-Eberhard HJ. (1994). Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. Mol Microbiol; 14(5):895

Leippe M., Müller-Eberhard HJ. (1994). The pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. *Toxicology*; 87(1-3):5-18.

Lin J.T. , and V. Stewart. (1998) Nitrate assimilation by bacteria. *Adv. Microb. Physiol.***38**:1-30

Loppes R., Radoux M, et al (1999) Transcriptional regulation of the Nia1 gene encoding nitrate reductase in *Clamydomonas reinhardtii*: effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the Nia1 promotor. *Plant Mol Biol* **41**: 701-711.

Makdessi K., Andreesen Jan. R. (2001) Tungsten Uptake by a Highly Specific ABC Transporter in *Eubacterium acidaminophilum*. *Journal of Biological Chemistry* **276**(27):24557-24564.

Mansour TE., (2002) Chemotherapeutic targets in parasites. Cambridge University Press. UK 226p

McCoy J J., Mann BJ., Petri WA Jr. (1994). Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around. *Infect Immun*; 62(8):3045-3050.

Minagawa N., Yoshimoto A. (1982) Purification and characterization of assimilatory NADPH-nitrate reductase of *Aspergillus nidulans* *J Biochem*,91(3):761-74

Mertens A. J., Shiraishi N., Campbell H. (2000) Recombinant Expression of Molybdenum Reductase Fragments of Plant Nitrate Reductase at High Levels in *Pichia pastoris* .*Plant Physiol*, June 2000, Vol. 123, pp. 743-756

Modolo LV., Augusto O., Almedia IM., Magalhaes JR., Salgado (2005) Nitrate as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis* in response to *Pseudomonas syringae*. FEBS Lett, 579 (17):3814-20

Moir J. and Wood N. (2001) Nitrate and nitrite transport in bacteria. CMLS, Cell Mol. Life Sci 58,215-224

Moreno-Vivián C., Cabello P. (1999) Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductase. Journal Bacteriology, **181**(21): 6573-6584.

Moura I., Bursakov S., Costa C., (1997) Nitrate and nitrite utilization in sulfate-reducing bacteria *Anaerobe* **3**, 279-290

Nelson L., Cox M. (2000) Lehninger Principios de Bioquímica 3er edición Ed. Omega Cap. 8, 243-292

Ogawa K I., E. Akagawa, K. Yamane, Z. W. Sun, M. La Celle, P. Zuber, and M.M. Nakana (1995) The *nasB* operon and *nasA* gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **177**:1409-1413

Ondarza RN., (2000) Inhibitory and lytic effects of phenothiazine derivatives and related tricyclic neuroleptic compounds, on *Entamoeba histolytica* HK9 and HM1 trophozoites. Biotech Appl Biochem. 2000 Aug; **32** (1):61-7.

Orozco E. Hernández F:C y Rodríguez M.A. (1985). Isolation and characterization of *Entamoeba histolytica* mutants resistant to emetine. Mol. Biochem. Parasitol. **15**, 49-59

Pacheco-Yépez J., Campos- Rodríguez R., Shibayama M., Ventura-Juárez J., Serrano-Luna J., Tsutsumi, V. (2001). *Entamoeba histolytica*: production of nitric

oxide and in situ activity of NADHP diaphorase in amebic liver absceso of hamsters. Parasitol Res; 878(1):49-56

Pérez-Tamayo R., (1997) Patología de la Amibiasis. EN: Amibiasis A: Martínez Palomo (ed) Editorial Médica Panamericana. México, DF:

Petri W. A. (2003) Therapy of intestinal protozoa. Trends parasitol. **19**: 523-526

Prins A., Cliné-Theil W., Malestein A., Counotte M. (1980) Inhibition of nitrate reduction in some rumen bacteria by Tungstate. Applied Env. Microbiol. (40):1, 163-165

Que X., Reed SL. (2000). Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. Clin Microbiol Rev; **13** (2):196-206.

Raju K.S., Sharma N., (1996) Inhibition of assimilatory nitrate uptake by ammonium ions in *Zarohizobium caulinodans* IRBG45. J. Plant. Biochem. Biotech 5,119-121

Ramírez - Arcos, S., L. A. et al (1998) A thermophilic nitrate reductase is responsible for the strain specific anaerobic growth of *Thermus thermophilus* HB8. Biochim. Biophys. Acta **1396**:215-227

Rapoport TA, R. Heinrich, SM Rapoport (1976). The regulatory principles of glycolysis in erythrocytes in vivo and in vitro. A minimal comprehensive model describing steady states, quasi-steady states and time-dependent processes. Biochem J. **154**:449-69

Robert K., Meter A., Daryl K., Bioquímica de Harper 15, Ed. Manual Moderno edición 2001 pp: 87-127

Reed SL., Gigli I. (1990) Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. Initiation of complement activation by an extracellular neutral cysteine proteinase. J Clin Invest; 86(6):1815-22.

Reed SL., Ember JA., Herdman DS., Discipio RG., Hugli TE., Gigli I. (1995). The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. J Immunol; 155 (1):266-74.

Reeves R. E., (1984) Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903, Adv. Parasitol. 23:105-142

Saavedra-Lira E., Pérez-Montfort (1994) Cloning and sequence determination of the gene coding pyruvate phosphate dikinase from *Entamoeba histolytica*. Gene 142:47-54

Saavedra-Lira E, R. Pérez- Montfort (1996) Energy production in *Entamoeba histolytica*: new perspective in rational drug design Arch. Med. Res. 27:257-264

Saavedra E. R. Encalada, et al (2004) Glycolysis in *Entamoeba histolytica* revisited: biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. Eur.J. Biochem.

Samarawickrema N. A, Brown D. M, et al (1997) Involvement of superoxide dismutase and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. J. Antimicrob. Chem. 40:833-840.

Siddiqui R., Warnecker-Eberz U., Hengsberger B., Kostka S., Friedrich B. (1993) Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16 J. Bacteriol. 175:5867-5876

Solomonson L.P., Balber M.J. (1990) Assimilatory nitrate reductase functional properties and regulation Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Bol. **41**,225-253

Stewart V., Berg BL, (1988) Influence of nar (nitrate reductase) genes on nitrate inhibition of formate-hydrogen lyase and fumarate reductase gene expression in *Escherichia coli* K 12, J Bacteriol. 170(10):4437-44

Stolz JF, Basu P. (2002) Evolution of nitrate reductase: molecular and structural variations on a common function. Chembiochem.20021:3(2-3):198-206.

Tapia M., Llama M. and Serra J. (1996). Regulation of nitrate assimilation in cyanobacterium *Phormidium lasminasun*: Plant.199, 24-30

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets.

Tran VQ, Herdman DS., Torian BE., Reed SL. (1998). The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. J Infect Dis; 177(2):508-11

Tsutsumi V., Mena-López R., Anaya-Velásquez F., Martínez-Palomo A. (2000). Amibiasis una expectativa Actual. Cap. 2:22-39.

Upcroft P., Upcroft, J.A. (2001) Drug targets and mechanism of resistance in the anaerobic protozoa. Clin. Microbiol. Rev. 14: 150-164

Vega Ma., Herrera J., Aparicio J., Paneque A., Losada M (1971) Role of Molybdenum in Nitrate Reduction by *Chlorella* Plant Physiol.48,294-299

Wray JL, Kinghorn JR (1989) Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation. Oxford Science Publications, Oxford, RU.

Wassman C., Hellberg A. et al (1999) Metronidazole resistance in protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. J. Biol. Chem. 274:26051-26056

Weinbach E, C, (1988) Metabolism of *Entamoeba histolytica*. En Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica* .J. I. Ravdin (ed) John Wiley & Sons. EUA. New York, p.p. 69-78

Wootton JC., Nicolson RE., Cock JM., Walters DE., Burke JF., Doyle WA., Bray RC. (1991) Enzymes depending on the pterin molybdenum cofactor: sequence families, spectroscopic properties of molybdenum and possible cofactor-binding domains. Biochim Biophys Acta. ;1057(2):157-85.

World Health Organization /Pan America Health Organization Expert Consultation on Amoebiasis. (1997). Amoebiasis W. H. O. Weekly Epidem. Rec. 72:97–100.

Yamasaki H., Sakihama Y. (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. FEBS Lett, 18; 468 (1):89-9

Zafra O., Cava F., Blasco F. Magalon A. (2005.) Membrana-Associated Mutation of the Heterotetrameric nitrate reductase of *Thermus thermophilus* Journal of Bacteriology (187) 2:3990-3996

Zhou J., Kleinhofs A (1996) Molecular evolution of nitrate reductase genes. J. Mol. Evol. 42, 432-442.

Zumft W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of nitrification. *Microbiol. Mol. Rev.* **61**:533-616

APÉNDICE A

PROGRAMA UTILIZADO EN EL TERMOCICLADOR

(Subunidad alfa)

1. 95°C 10 min.
2. 95°C 15 seg.
3. 62°C 30 seg.
4. 72°C 30 seg.
5. 45 ciclos go to 2
6. 72 ° 2 min
- 7 ∞ 4 ° C

PROGRAMA UTILIZADO EN EL TERMOCICLADOR

(Subunidad beta)

1. 95°C 10 min.
2. 95°C 15 seg.
3. 62°C 30 seg.
4. 72°C 30 seg.
5. 45 ciclos go to 2
6. 72 ° 2 min
- 7 ∞ 4 °

PROGRAMA UTILIZADO EN EL TERMOCICLADOR

(Subunidad gama)

1. 95°C 10 min.
2. 95°C 15 seg.
3. 63°C 30 seg.
4. 72°C 30 seg.
5. 45 ciclos go to 2
6. 72 ° 2 min
- 7 ∞ 4 ° C

Temperaturas de alineación para RT-PCR de los oligonucleótidos de las subunidades de la Nitrato Reductasa

Subunidad	Forward	Reverse	Temperatura (Alineación)	Peso (Pb)
ALFA	AGAGCGTGTTGACGCCCTGG	CATCGCGCGAGCCGCATACG	62° C	373
BETA	TGGGTAACCGTGCCATGCTGC	GCCGGGTTTCAGGCAGTGTTTCG	62° C	341
GAMA	ACCTGCTGGCGCAGTACGAGC	ACGGCTTTCACGCTGTTGCAG	63° C	183

Secuencia genómica de *E. coli*

```
1 atgCGCCagG atgCagaggt aatcatgaag ctaaccgatg cggataatgc cgccgatggc
61 atttttttcc cGcccttga gcaaaatatg atgggtgCGg tgTtaattaa cgaaaatgat
121 gaagtgatgt tttcaaccc cGccgCagag aagctctggg gatacaaacg tgaagaagtc
181 attggcaata acattgatat gctgattcca cgggatttgc gtCctgCgca tCctgaatac
241 attcgtcaca accgtgaagg cGgtaaagcG cgtgttgagg ggatgagtcg ggagctgCag
301 ctggagaaaa aagacggcag taaaatctgg acccgttttg cGctatcgaa agtgagcGcc
361 gaggggaaag tttattacct gGcGctggta cgggatgcca gCgtagaaat gGcGcaaaaa
421 gaacagacc cacaattgat tattgCcggt gaccatctcG accgaccggt gattgtcctc
481 gatccggaac gCcatattgt gCagtgcaat cGcGcattta cGgaaatgt tGgttactgC
541 attagcgaag cCagcGgtat gCagcccgat aCactcctga acattcctga attcCctgC
601 gataaccgca ttcGtttaca acagttgcta tggaaaaccg cCcgCgatca ggacgaattt
661 ctGctgttga cGcGcaccgG tGaaaaaatc tggattaaag cctctatcag cCcggtttat
721 gagtgctcG cGcatctgca gaacctggta atgactttct cGgatatcac gGagaacgG
781 cagattcGcc agcttgaagg caatattctc gCcgccatgt gCagcagccc gCcatttcat
841 gaaatggggg aatcatttg tCgtaacatc gaatctgtac tcaacgaatc gcatgtttcG
901 ctgttcGcac tGcGcaacgG gatgCcgata cactgggGgt catcttccca cGgtgCagaa
961 attcaaaatg cGcaaagctg gtcagcGacc attcGtcagc gtgatggcGc gCctgCgggg
1021 atcctgcaaa ttaaaacctc gtcagGagca gaaaccagcG cctttatcga acgCgtggca
1081 gatatcagcc agcatatggc cGcGctggcG ctggaacagG aaaaaagccg tCagcatatt
1141 gaacaactca tccaatttga tccgatgacc ggtctgCcaa atcGcaataa cctgCacaat
1201 tacctcGatg acctggtcga caaagccgtc tctcccgtgg tGtatctcat cGgtgttgac
1261 catattcagG atgtgattga tagccttggc tatgCgtggg cGgatcagGc attgctggaa
1321 gtggTcaatc gctttcGtga aaaaactcaa cCggatcagT atctctgtcG tatcgaaggt
1381 acgCagtttg tCctcGtgag cctcGaaaaac gacgtcagta acattaccCa aatcGccgat
1441 gagctacgga atgtggtcag caagccgata atgattgacG ataaaccctt cCcgcttacc
1501 ttgagtattg gcatcagcta cGacctgggt aaaaaccgCg attacttgct ctccactgct
1561 cacaatgcaa tggattatat tCgcaagaat gGcGgtaacg gctggcagtt ctCagcccG
1621 gCgatgaacG aaatggtaaa agagcGtttg gttttaggcG cagcGctgaa agaagcGatt
1681 agcaataacc aactgaaact ggtttaccag cCgcaaatct tCgCagaaac gGgtgaaCtG
1741 tacggcatcG aagcccttgc tCgctggcac gatcccctgC atggTcatgt gCcccttca
1801 cGgtttattc ctctcGcaga agagattggT gaaatcGaaa atattgggCg ctgggtcatc
1861 gCggaagcTt gCcgTcagTt agcagaatgG cGtagccaga atattcatat cCcgGcGtta
1921 tccgtgaact tGtcggcGct gCactttcGc agtaatcaac tGcctaatac ggtgtctgat
1981 gcaatgCagc cctggggTat tGacggccac cagctgacgG tagaaatcac ggaaagcatg
2041 atgatggaac acgataaccga aatctttaag cGcattcaga tCctgCgtga tatgggCgtg
2101 ggcttatcGg tagatgattt tGgtacggGc ttttccgGat tatcccGctt agtcagTctt
2161 cCggtaacgG aatcaaaaat tGacaaaagT tttgtcGatc gttgtctgac cGaaaaacGc
2221 atccttGcct tacttgaagc cattaccagc attgggcaaa gCctcaattt aaccgtcGtg
2281 gCggaaggcG tGgaaaccaa agagcaattt gagatgctac gcaagatcca ctgtcGcgtt
2341 attcagggat atttctttc cGcccccta cCcgccgaag aaattccagG ctggatgagc
2401 agcgtgttac cGctgaaaaat ctga
```