



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PROGRAMA EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

BÚSQUEDA DEL DOMINIO TIR EN *Entamoeba histolytica* Y SU PARTICIPACIÓN EN EL PROCESO DE FAGOCITOSIS

TESIS DE MAESTRIA

COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTA

Q.F.B. ISMAEL MANCILLA HERRERA

DIRECTORES DE TESIS

DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA.

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI

DR. JORGE ALBERTO GONZÁLEZ Y MERCHAND

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR,

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA, ENCB-IPN



MÉXICO, D.F.

ENERO 2010

ÍNDICE	Pág
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUCCIÓN	1
Dominio TIR (Toll/receptor de interleucina-1)	1
Dominio TIR en animales	3
Fagocitosis de macrófagos mamíferos	3
Dominio TIR en plantas	5
Dominio TIR en protozoarios	5
Características generales de <i>Entamoeba histolytica</i>	6
<i>E. histolytica</i> . Morfología	7
<i>E. histolytica</i> . Ciclo de vida	8
Mecanismos de patogenicidad	10
La fagocitosis en <i>E. histolytica</i>	11
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14

OBJETIVOS PARTICULARES	14
MATERIAL Y MÉTODOS.	15
Esquema general de trabajo	15
1. Búsqueda del dominio TIR en <i>E. histolytica</i> por análisis bioinformático	16
2. Diseño de iniciadores	17
3. Estandarización de métodos	18
Cultivo de <i>E. histolytica</i>	18
Extracción del RNA de trofozoitos de <i>E. histolytica</i>	18
Ensayo de fagocitosis de <i>Escherichia coli</i>	18
Ensayo de fagocitosis de eritrocitos	19
4. Búsqueda por RT-PCR del dominio TIR en <i>E. histolytica</i>	19
5. Búsqueda de la participación del dominio TIR de <i>E. histolytica</i> en el proceso de fagocitosis	20
Diseño del dsRNA para el silenciamiento de los transcritos que codifican para proteínas con el dominio TIR	20
Silenciamiento de los transcritos que codifican para proteínas con el dominio TIR mediante RNAi	20
Evaluación de la participación del dominio TIR de <i>E. histolytica</i> en el proceso de fagocitosis	21
RESULTADOS	22
Análisis <i>in silico</i>: en búsqueda del dominio TIR	22

Diseño de iniciadores para la RT-PCR	25
Estandarización de métodos	25
Extracción de RNA	25
Amplificación de las secuencias con el dominio TIR por RT-PCR	26
Fagocitosis de <i>E. coli</i> por trofozoitos de <i>E. histolytica</i>	27
Eritrofagocitosis por trofozoitos de <i>E. histolytica</i>	28
Diseño de los RNAi para el silenciamiento de transcritos que codifiquen para proteínas que contienen el dominio TIR	29
Los RNAi silencian la expresión de los transcritos de las proteínas que tienen el dominio TIR	30
La inhibición de la expresión de los transcritos de la tiorredoxina y la GTPasa favorecen la fagocitosis de <i>E. coli</i> por <i>E. histolytica</i>	32
La inhibición de la expresión de los transcritos de la tiorredoxina y la GTPasa favorecen la fagocitosis de eritrocitos por <i>E. histolytica</i>	32
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	40
PERSPECTIVAS	41
BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Conservación de la secuencia de aminoácidos y estructura del dominio TIR	2
Figura 2. El ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	9
Figura 3. Esquema general de trabajo	15
Figura 4. Representación gráfica del HMM del dominio TIR	23
Figura 5. Comparación de la estructura del dominio TIR de una tiorredoxina de <i>E. histolytica</i> , con la de TLR2 de <i>H. sapiens</i> y la de TirA de <i>D. discoideum</i>	24
Figura 6. Electroferograma del RNA total de <i>E. histolytica</i>	26
Figura 7. <i>E. histolytica</i> posee transcritos que codifican proteínas con el dominio TIR	27
Figura 8. Estandarización del ensayo de fagocitosis de bacterias	28
Figura 9. Estandarización del ensayo de eritrofagocitosis	28
Figura 10. Los RNAi de doble cadena disminuyen la expresión de los transcritos de PATMK, la tiorredoxina y la GTPasa de manera específica	31
Figura 11. El silenciamiento de la expresión de la tiorredoxina y la GTPasa favorecen los mecanismos de fagocitosis	33

INDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Características generales de los iniciadores para el ensayo de RT-PCR del cDNA de la tiorredoxina, la GTPasa y la PATMK de *E. histolytica* 25

Tabla 2. Características de los RNAi de doble cadena para el silenciamiento de los transcritos de la tiorredoxina, la GTPasa y la PATMK de *E. histolytica* 29

Tabla 3. Niveles de silenciamiento de los transcritos de la tiorredoxina, la GTPasa y la PATMK de *E. histolytica*, por el uso de RNAi de doble cadena. 31

ABREVIATURAS

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	DNA complementario
dsRNA	RNA de doble cadena
Gal/GalNAc	Galactosa-N-acetil-Galactosamina
GFP	Proteína Verde Fluorescente
HMM	Modelos Ocultos de Markov
IRAK	IL-1 Receptor associated kinase
LPPG	Lipopéptidofosfoglicana
LPS	Lipopolisacarido
LRR	Repeticiones ricas en leucina
mRNA	RNA mensajero
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	Nuclear factor κ B
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PATMK	Phagosomal associated transmembrane kinase
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PHYRE	Protein Homology/analogY Recognition Engine
PS	Fosfatidilserina
PSSM	Matriz de puntuación de posiciones específicas
RNAi	RNA de interferencia
RT-PCR	Retrotranscriptasa-PCR
TIR	Toll/interleukin-1 (IL-1) receptor
TIRAP/MAL	TIR domain-containing adapter protein / MyD88 adapter-like
TLR	Receptores tipo Toll
TRAF	Tumour necrosis factor (TNF) receptor-associated factor

RESUMEN

Entamoeba histolytica es un parásito intestinal de los humanos que causa padecimientos con altos niveles de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo. Entre sus principales mecanismos de patogenicidad se encuentra la fagocitosis de células epiteliales, endoteliales, eritrocitos, leucocitos y bacterias comensales. Para este proceso de fagocitosis se han involucrado varias proteínas, algunas de las cuales poseen el denominado dominio TIR (Toll/Receptor de Interleucina-1). Este dominio, involucrado tanto en los mecanismos de adquisición de nutrientes como en los de defensa, se encuentra ampliamente distribuido en diversos organismos eucariontes, desde amibas de vida libre (evolutivamente relacionadas con *Entamoeba histolytica*) hasta organismos pertenecientes al grupo metazoa. Se ha sugerido entonces que la fagocitosis en *E. histolytica* puede estar mediada por este dominio formando parte de un componente celular de señalización que ha sido adaptado como mecanismo de defensa y de ingesta de nutrientes, aún antes de la diversificación de los animales, y que pudiera estar presente en los organismos más primitivos del grupo de los eucariontes como lo son aquellos pertenecientes a la especie de *E. histolytica*. Debido a lo anterior, en el presente estudio se propuso investigar si *E. histolytica* posee proteínas con el dominio TIR y si estas proteínas participan en las vías de señalización involucradas en la fagocitosis de eritrocitos y bacterias. Para ello, a partir de las bases de datos del NCBI, del Instituto Sanger y del Instituto Pathema, se realizó la búsqueda de secuencias *in silico* de proteínas que presenten el dominio TIR en *E. histolytica* a través de diversas estrategias bioinformáticas, encontrándose dos posibles candidatos, una GTPasa de la familia Rab y una Tiorredoxina. Adicionalmente, cuando inhibimos *in vitro* los transcritos de estas secuencias por medio de pequeños RNAs de interferencia de doble cadena, los trofozoitos adquirieron una mayor capacidad de fagocitosis de eritrocitos y *Escherichia coli*. Esto último sugiere que estas proteínas con dominios TIR, juegan un papel en los mecanismos de fagocitosis como reguladores negativos de este proceso.

ABSTRACT

Entamoeba histolytica is an intestinal parasite that affects humans with high morbidity and mortality rates all around the world. Phagocytosis of epithelial cells, erythrocytes, leucocytes and bacteria from normal flora, are considered the major pathogenic mechanisms of this parasite. Several proteins are required in phagocytosis, some with the TIR domain (Toll/Interleukin-1 Receptor). TIR is involved in nutrients acquisition and defense mechanisms against pathogens; and It has been found in several eukaryotes, including free live amebas (evolutionary related to *Entamoeba histolytica*) and metazoan organisms. It has been suggested that *E. histolytica* phagocytosis could be mediated by TIR. This protein domain could be part of cellular signaling complexes adapted to both as a defense and as nutrition system. Its conservation suggests it could have appear very early in evolution, before animal diversification and could be present in very primitive eukaryotes as *E. histolytica*. Our goal was then to determine if *E. histolytica* contains proteins with TIR domains and if these proteins are involved in the signaling pathways for bacteria and erythrocyte phagocytosis. Using databases from the NCBI, Sanger's Institute and Pathema Institute and with several *in silico* and bioinformatic strategies, we searched for proteins of *E. histolytica* with TIR domain. We found two principal candidates, a GTPase from the Rab protein family and a thioredoxin. When we inhibited their activities *in vitro*, by using small interference dsRNAs, trophozoites showed a diminished capability for the phagocytosis of both human erythrocytes and *Escherichia coli*. These results suggest that TIR domains from both proteins may have a negative role in the phagocytosis process in *E. histolytica*.

INTRODUCCIÓN

Todos los organismos cuentan con diversos mecanismos innatos para la defensa contra agentes patógenos. En plantas y animales se han descrito diferentes mecanismos y vías de señalización para el reconocimiento de moléculas no propias por medio de receptores evolutivamente conservados entre los organismos de diferentes reinos (Burch-Smith y Dinesh-Kumar, 2007). Para su estudio, dichos receptores, se agrupan en familias, siendo dos de las más estudiadas las de los receptores tipo Toll (TLRs), en animales, y la de las proteínas de resistencia (R), en plantas (Medzhitov y Janeway Jr., 1998; Akira *et al.*, 2006; Burch-Smith y Dinesh-Kumar, 2007). Tanto los TLRs como las proteínas R pueden reconocer específicamente diversas moléculas expresadas por los patógenos, mediante dominios con repeticiones ricas en leucina (LRRs, “leucine-rich repeat”). Este primer paso de reconocimiento inicia la transmisión de señales intracelulares a través de proteínas adaptadoras-efectoras, las cuales poseen dominios filogenéticamente conservados entre las especies, como es el caso del dominio TIR (Toll/receptor de interleucina-1) (Xu *et al.*, 2000; Nurnberger *et al.*, 2004; Akira *et al.*, 2006; Burch-Smith *et al.*, 2007). Estos dominios favorecen la activación de diferentes vías de señalización que ayudan a la expresión de diversos programas transcripcionales que producen la respuesta específica contra el agente externo que las activó. Una de las respuestas derivadas del reconocimiento de agentes patógenos es, en el caso de los mamíferos, la fagocitosis (Eulgem, 2005; Akira *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2007).

Dominio TIR (Toll/receptor de interleucina-1)

Inicialmente, cuando se describió el papel del receptor Toll en la embriogénesis y la respuesta inmune de la mosca *Drosophila* (Anderson *et al.*, 1985, Lemaitre *et al.*, 1996), se buscaron secuencias homólogas a este receptor dentro de las secuencias de las proteínas descritas hasta entonces en el humano. Keith y colaboradores en 1991 mostraron que el receptor de interleucina-1 (IL-1R) humano tenía regiones comunes al del receptor Toll en las zonas correspondientes a la región citoplasmática de ambas secuencias. A esta estructura de aminoácidos se le denominó dominio Toll/IL-1R ó TIR (Gay *et al.*, 1991). Posteriormente, se describieron receptores tipo Toll (Toll-like receptors, TLRs) en los mamíferos, y se observó que, además de poseer el dominio TIR en la región citoplasmática, estos TLRs también estaban implicados, dentro del sistema inmune humano, en reconocer moléculas altamente conservadas entre bacterias y protozoarios, a las cuales se les ha denominado patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Algunos ejemplos de estas moléculas son el lipopolisacárido (LPS), la flagelina, el CpG DNA, y la lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica*, que fue descrita por Isibasi en

1982 y constituye uno de los primeros PAMPs descritos en protozoarios (Isibasi *et al.*, 1982; Maldonado *et al.*, 2000; Akira, 2006).

TIR es una estructura de aproximadamente 200 residuos de aminoácidos, y su secuencia en los animales está altamente conservada entre los TLRs, la familia de los receptores de Interleucina-1 (IL-1R) y diversas moléculas adaptadoras-efectoras. En las plantas las proteínas R, que se consideran como receptores de PAMPs, también presentan este dominio (Figura 1a). Los sitios con alto índice de conservación se encuentran en tres regiones cortas localizadas en las posiciones 10 (denominada caja1), en la posición 70 (caja2) y en la posición 160 (caja3). La estructura funcional del dominio TIR contiene cinco cadenas beta plegadas centrales (β A- β E) que están rodeadas por 5 cadenas alfa hélice en ambos extremos (α A- α E), las cuales están conectadas entre sí por diversas asas flexibles (Figura 1b) (Xu *et al.*, 2000).

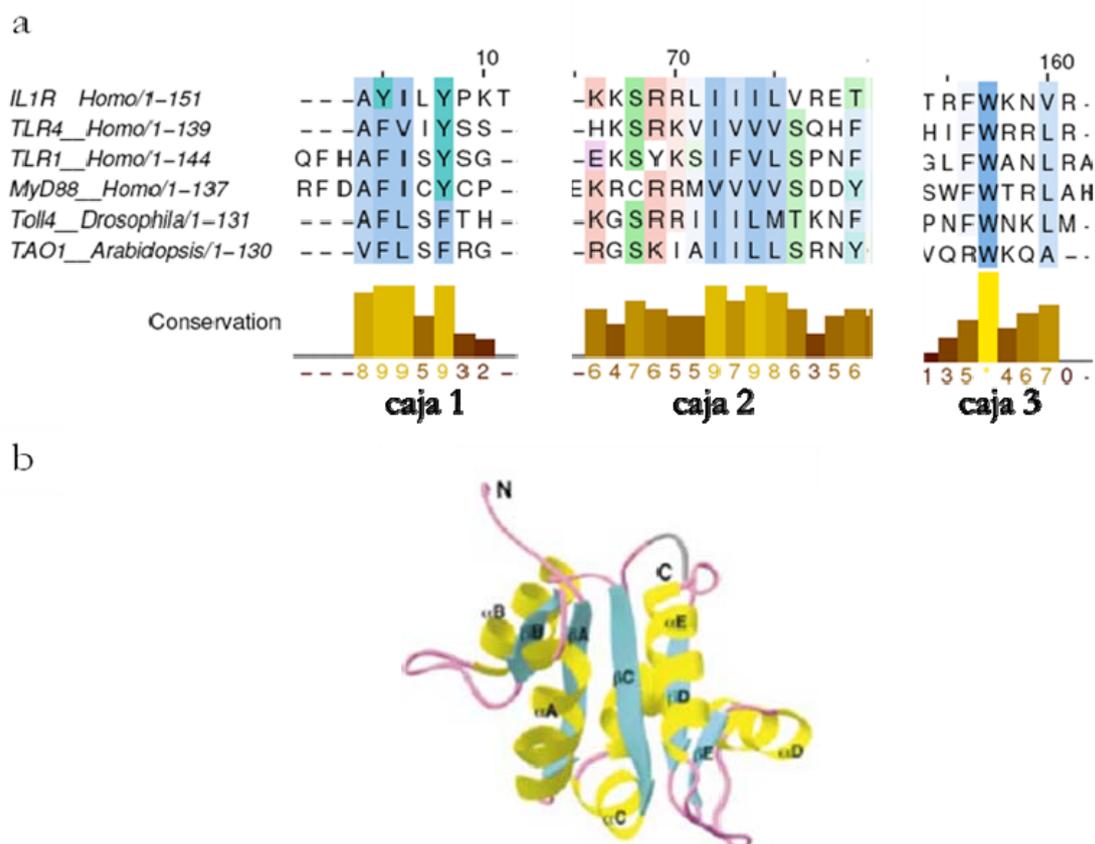


Figura 1. Conservación de la secuencia de aminoácidos y estructura del dominio TIR. a) Alineamiento de las secuencias Toll-4 de *Drosophila*, IL-1R, TLR1, TLR4, MyD88 de *Homo sapiens* y TAO1 de *Arabidopsis thaliana*. Alineamiento generado en el servidor EXPRESSO de T-COFFEE. b) Estructura del dominio TIR del TLR2 humano que está compuesto de 5 cadenas α hélices (A-E) y 5 cadenas β plegadas (A-E) entrelazadas por asas flexibles.

Dominio TIR en animales.

La activación de los mecanismos celulares por los cuales el sistema inmune responde a heridas, infecciones o desequilibrio homeostático está mediada por diversas vías de señalización, entre éstas, se conoce la del factor nuclear κ B (NF κ B) y diversas cinasas de estrés, donde algunas de las proteínas “señalizadoras” involucradas contienen el dominio TIR. Estas proteínas interactúan de manera homotrópica entre sí (TIR:TIR) favoreciendo la activación de diferentes vías de señalización que desencadenan diversas respuestas celulares (Gay y Keith, 1991; Schooley *et al.*, 2003). Algunos ejemplos de estas proteínas son: el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), la proteína asociada a TIR/adaptador tipo MyD88 (TIRAP/MAL), la proteína adaptadora contenedora del dominio TIR inductora de interferon- β /molécula contenedora del dominio TIR-1 (TRIF/TICAM-1) y la molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM) (Yamamoto *et al.*, 2003; Oshiumi *et al.*, 2003; Blander y Medzhitov, 2004; Akira *et al.*, 2006;). Por otra parte, se ha observado que las mutaciones en alguna de las cajas 1, 2 ó 3 compromete importantemente la respuesta inmune de las células efectoras (Slack *et al.*, 2000).

Una de las principales respuestas de activación celular frente al reconocimiento de células dañadas o agentes extraños es la fagocitosis, el cual es un proceso que permite la internalización de partículas sólidas por endocitosis y es llevado a cabo por células denominadas “fagocíticas”. Este mecanismo está evolutivamente conservado entre los organismos, es indispensable para la defensa contra agentes invasores, y es realizada por organismos del grupo metazoa (como los macrófagos en los mamíferos), y algunos protozoarios. Dentro de este último grupo, se cree que los miembros del grupo Amebozoa representan una de las más tempranas ramificaciones de los ancestros comunes de todos los eucariontes (Eichinger y Noegel, 2005), de los cuales, los más estudiados son *Dictyostelium discoideum* y *E. histolytica* (Okada y Nozaki, 2006).

Fagocitosis de macrófagos mamíferos

En los mamíferos, la fagocitosis es un proceso utilizado por muchas células para ingerir microbios patógenos, y cuerpos necróticos y apoptóticos. Este proceso incluye diversas etapas secuenciales que son comunes entre las células fagocíticas, como son el reconocimiento de la partícula, la activación de vías de señalización, movilización del citoesqueleto, formación del fagosoma con vacuolas endocíticas, y finalmente la digestión de la partícula (Greenberg y Grinstein, 2002).

Para el reconocimiento de las partículas que serán fagocitadas, se han descrito diversos receptores, entre ellos receptores Fc, integrinas, CD14, TLRs, etc., los cuales reconocen específicamente moléculas de dichas partículas, y dependiendo del receptor que se active, se iniciaran diferentes vías de señalización para comenzar el proceso fagocítico (Greenberg, y Grinstein, 2002). Todas estas vías de señalización se llevan a cabo por la movilización de Ca^{2+} intracelular, activación de fosfolipasas y proteínas de la familia de las proteínas-cinasas C (PCK), formación de segundos mensajeros como los fosfoinositidos, y GTPasas, que favorecen la acumulación focal de F-actina y miosina, iniciando la internalización de la partícula por medio de la formación de los pseudópodos, los cuales son extensiones de la membrana que contienen endoplasma, libres de organelos, y contienen abundantes cantidades de actina y proteínas asociadas a actina (May y Machesky, 2001; Qualmann y Mellor, 2003; Lanzetti, 2007).

En los macrófagos, particularmente cuando la fagocitosis es mediada por los receptores Fc γ R y CR3, los pseudópodos se extienden a lo largo de la partícula y la atraen hacia adentro de la célula a consecuencia de la polimerización de actina, lo cual sucede por la señalización vía GTPasas de la familia Rho (Greenberg y Grinstein, 2002). Posteriormente se requiere la actividad enzimática de PI 5-cinasa y las GTPAsas, Rac, Cdc42 y ARF6, que llevan a la nucleación inicial de los filamentos de actina mediada por el complejo Asp2/3 para la formación inicial del fagosoma (Kalman *et al.*, 1999; Honda *et al.*, 1999; Higgs y Pollard, 2001).

Posterior a la internalización de la partícula, la F-actina es despolimerizada del fagosoma, quedando la membrana de las vacuolas formadas predispuesta a la fusión con endosomas, a través de una serie de eventos de fusión-fisión de las membranas de los fagosomas con los lisosomas. Estos últimos eventos son controlados por Rab GTPasas; de esta forma, el contenido de las vacuolas fusionadas madura hasta formar los fagolisosomas. El fagolisosoma tiene además la capacidad de fusionarse con otras vacuolas (Aderem y Underhil, 1999). La maduración del fagosoma, también involucra la incorporación de diversas proteínas y lípidos que contribuyen a la segregación de componentes en microdominios, los cuales favorecen el reclutamiento de enzimas como la NADPH oxidasa (Vilhardt y van Deurs, 2004), la cual, junto con diversas enzimas hidrolíticas, acidificación del fagolisosoma, y la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, intervienen en la destrucción de la partícula, para finalmente expulsar los desechos por exocitosis (Greenberg y Grinstein, 2002; Jutras y Desjardins, 2005).

Dominio TIR en plantas.

En las plantas, al igual que en los animales, el reconocimiento de moléculas exógenas provenientes de agentes patógenos, está bajo el control de receptores especializados, tanto de superficie como intracelulares, que intervienen en la activación de la respuesta específica para la defensa del hospedero. Dentro de estos receptores se encuentran las proteínas de resistencia (proteínas R), que están compuestas de un dominio central de unión a nucleótidos (NB), una región LRR en el extremo carboxilo, y un dominio “rollo-enrollado” (coiled-coil, CC) o un dominio TIR en su extremo amino (Tameling y Takken, 2008). La estructura del dominio TIR presente en organismos de este reino son muy semejantes a las que se presentan en los mamíferos, pero en las plantas, la región alpha-3D-hélice contiene un grupo de aminoácidos adicional que están involucrados en la función de señalización para provocar una respuesta hipersensitiva contra la infección (Chan *et al.*, 2009). Además, el dominio TIR de plantas puede ser utilizado tanto en las moléculas adaptadoras para transmitir la señal, como en las moléculas de reconocimiento de agentes patógenos, o directamente como factor de transcripción nuclear (Burch-Smith y Dinesh-Kumar, 2007) para la expresión de genes que llevan a la producción de especies reactivas de oxígeno, como la DPAH oxidasa, y la deposición de callosa para el reforzamiento de la pared celular, con lo cual, se previene el crecimiento bacteriano. La pérdida estructural del dominio TIR de las proteínas R altera importantemente la señalización que lleva a la expresión de genes de defensa mediados por factores de transcripción específicos (Martin *et al.*, 2003; Burch-Smith y Dinesh-Kumar, 2007).

Como se mencionó antes, la presencia del dominio TIR es evidente en proteínas de múltiples taxa de plantas y animales; así, este motivo pudiera ser trazable a los orígenes de los organismos eucariontes, donde un organismo progenitor a ambos reinos pudiera haberlo presentado. Esta idea puede estar respaldada por el análisis filogenético realizado por Kimbrell y Beutler, donde se compararon las secuencias de proteínas que contienen el dominio TIR, tanto de plantas como de animales, y cuyos resultados sugieren que este dominio pudiera haber estado desde hace 2000 millones de años en los orígenes de la vida eucarionte (Kimbrell y Beutler, 2001).

Dominio TIR en protozoarios

D. discoideum (también conocida como amiba social) es un organismo unicelular, el cual, al encontrarse bajo condiciones de estrés, ya sea por falta de nutrientes, invasión de agentes patógeno o sustancias tóxicas, forma colonias celulares de aproximadamente 100 000 unidades. Estas colonias se comportan como un organismo multicelular, donde cada unidad celular adquiere características

especiales con funciones específicas. Dentro de éstas se encuentran las células centinelas (S) que proveen a la comunidad de un mecanismo especializado para la destoxificación y defensa “tipo-inmune” contra agentes invasores (Chisholm y Firtel, 2004; Leslie, 2007). Dichas células, a su vez, contienen dos genes que codifican para proteínas que presentan el dominio TIR, TirA y TirC, de las cuales, la primera es empleada por las células S como un componente de los mecanismos de señalización intracelular interviniendo, a través de la fagocitosis, en la defensa contra agentes patógenos naturales y en la ingestión de bacterias como sustrato natural de nutrición (Chen *et al.*, 2007, Sillo *et al.*, 2008); de la segunda proteína aún no se ha caracterizado su función.

Por otra parte, se cree que este mecanismo de señalización mediado por el dominio TIR, o uno muy parecido, ya descrito en plantas, animales y en el protozooario *D. discoideum*, está involucrado en un mecanismo de señalización celular antiguo que ha sido adaptado en los sistemas de defensa y adquisición de nutrientes en los organismos que aparecieron aún antes de la diversificación de los eucariontes, y probablemente estuviese ya presente en organismos progenitores u otros filogenéticamente relacionados a *D. discoideum* como lo es *E. histolytica* (Song *et al.*, 2005).

Características generales de *Entamoeba histolytica*

E. histolytica es un protozooario intestinal de los humanos que causa la amibiasis, la cual muestra niveles altos de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo (Stanley Jr, 2003). La amibiasis presenta mayor prevalencia en áreas pobres de países en vías de desarrollo e infecta a alrededor de 500 millones de personas en el mundo. Por otra parte, datos epidemiológicos reportan que el 9% de la población mexicana está infestada con *E. histolytica* en la Ciudad de México (WHO/PAHO/UNESCO, 1997), y anualmente 110,000 personas mueren por sus complicaciones. Así, dentro de las parasitosis, la amibiasis es la tercera causa de mortalidad a nivel mundial después de la malaria y la esquistosomiasis (Pinilla *et al.*, 2008).

Las personas infectadas se dividen en dos grupos de acuerdo a sus manifestaciones clínicas: asintomáticos y sintomáticos. El grupo de asintomáticos también se conoce como portadores sanos y corresponde al 90% de los casos. El grupo de pacientes sintomáticos corresponde al 10% de los casos y se subdivide en: afecciones a nivel intestinal (disentería amebiana, rectocolitis aguda, colitis no disentérica crónica, ameboma) y afecciones extraintestinales (absceso hepático amebiano, absceso cerebral, enfermedad genitourinaria y cutánea); el 1% de las personas infectadas pueden desarrollar patologías potencialmente fatales como colitis amebiana fulminante o absceso hepático amebiano (Haque *et al.*, 2003; Pinilla *et al.*, 2008).

***E. histolytica*. Morfología**

E. histolytica presenta cuatro fases del ciclo de vida: 1) los quistes, esferoidales o esféricos, y cuyo diámetro varía entre 5 y 20 μm , constituyen una fase bien definida del parásito. Cada quiste, por lo general, tiene cuatro núcleos, pero a veces suelen observarse de uno a tres. Los caracteres morfológicos que se observan al microscopio denotan que la pared quística mide aproximadamente de 125 a 150 μm de espesor y está constituida por material fibrilar que forma una red compacta (Pinilla *et al.*, 2008); 2) los prequistes y 3) los metaquistes, que son fases intermedias o transitorias. En la fase prequistica, las amibas son esferoidales, están inmóviles, aún cuando a veces emiten lentamente pseudópodos muy cortos y anchos; 4) los trofozoitos o forma vegetativa, tienen formas muy variables, su contorno puede ser redondo, irregular o alargado, sus dimensiones varían entre 10 y 50 μm . Los trofozoitos plenamente desarrollados, examinados en fresco y a temperatura cercanas a los 37°C, se mueven relativamente con rapidez mediante la formación de pseudópodos hialinos, con lo cual los movimientos de las amibas son en una sola dirección (Espinosa-Castellano y Martínez-Palomo, 1991).

La membrana plasmática de los trofozoitos mide aproximadamente 10 nm de espesor y es semejante en composición a las membranas celulares de eucariontes superiores. La superficie del trofozoito es de un aspecto rugoso con pequeñas invaginaciones circulares que miden entre 0.2 y 0.4 μm de diámetro, que corresponden a las bocas de vesículas micropinocíticas. Una de las características que presenta esta cubierta celular es la rápida distribución de algunos de sus componentes por su interacción con varios ligandos externos, como lectinas, anticuerpos poliespecíficos, ferritina catiónica y células que le sirven de sustentos nutricionales al trofozoito; entre éstas, bacterias y eritrocitos. Algunos eventos que ponen de manifiesto la importancia de la membrana plasmática en la subsistencia de la amiba son: 1) la permanente producción de pseudópodos, 2) el recambio constante que sufre por medio de endocitosis y exocitosis, 3) la fagocitosis, 4) la distribución de los antígenos y receptores a la parte posterior de la amiba. Por otra parte, en el citoplasma se han identificado granos electrodensos denominados “cuerpos paranucleares”, de los cuales se desconoce su composición y su función. El citoplasma amibiano presenta, además, ribosomas libres que están organizados en grupos helicoidales de 300 nm de longitud y 40 nm de diámetro; también se ha detectado DNA extranuclear, contenido en estructuras citoplásmicas (denominadas EhKOs) que se ha sugerido como un genoma remanente del proceso endosimbiótico de la mitocondria (Orozco *et al.*, 1997); otros estudios sugirieron la existencia de criptonos (organelos derivados de mitocondrias que contienen DNA) con un genoma organelar que

corresponde a un 2.2 % del genoma nuclear; a pesar de estas diferencias, las proteínas del citoesqueleto de *E. histolytica* presentan alto grado de similitud con las de los organismos superiores (Ghosh *et al.*, 200). A la fecha se han caracterizado tres proteínas importantes del citoesqueleto en los trofozoitos; actina, miosina y tubulina así como otras proteínas que se unen a ellos. Además, los trofozoitos contienen en el citoplasma vacuolas con glucógeno, de contorno poco definido, y uno o varios cromidios (gránulos de cromatina extranuclear en el citoplasma de una célula, rico en RNA, y se tiñe intensamente por los colorantes básicos) (Meza *et al.*, 1983; Guillén, 1996).

El núcleo se caracteriza por tener forma esférica, de gran volumen, dimensiones de 4 a 7 μm de diámetro, y con una membrana delgada con granos de cromatina uniformemente pequeños. El cariosoma o endosoma tiene forma esferoidal, posee un diámetro aproximado de 0.5 μm , se encuentra localizado, por lo general, en el centro del núcleo (Torres-Guerrero *et al.*, 1991). El tamaño del genoma se estima que es de aproximadamente 20 Mb con un contenido de A-T del 78%. El número exacto de los cromosomas no se ha definido, se calcula que existen entre 6 a 14 cromosomas. El genoma contiene numerosos elementos extracromosomales circulares, incluyendo un episoma que contiene genes del rDNA. El genoma cromosómico también contiene una variedad de elementos repetidos que incluyen elementos similares a los transposones. Los elementos promotores de *E. histolytica* tienen un rasgo común que incluye un elemento GAAC. Los intrones están presentes solamente en el 15% de los genes que codifican para las proteínas (Sterling *et al.*, 2004). La membrana nuclear de los trofozoitos está formada por una doble membrana con numerosos poros nucleares de aproximadamente 65 nm de diámetro.

***E. histolytica*. Ciclo de vida**

E. histolytica tiene un ciclo de vida simple en las infecciones en el humano. La infección se adquiere por la ingestión de la forma de quiste tetranucleado maduro el cual es resistente a los jugos gástricos. Posteriormente, el parásito sufre la exquistación en el intestino delgado, donde surge una amiba tetranucleada que multiplica sus núcleos para formar una amiba de 8 núcleos, misma que se fragmenta en 8 pequeñas amibas que reciben el nombre de amébulas metaquísticas (Adedayo y Nasiiri, 2004). Éstas se transforman en los trofozoitos que finalmente se establecen en el colon, donde se alimentan de bacterias y de restos celulares, y se reproducen por fisión binaria (Figura 2) (Pinilla *et al.*, 2008). Los trofozoitos pueden enquistarse, que es un proceso aparentemente estimulado por condiciones intestinales adversas (Ackers y Mirelman, 2006). Los quistes formados continúan con su metabolismo hasta la división nuclear para la formación de 4 núcleos. Después de

ser eliminados con las heces los quistes pueden permanecer viables por semanas o meses, dependiendo de las condiciones ambientales, y la infección puede producirse con tan sólo un quiste en el agua o en alimentos contaminados (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000; Haque *et al.*, 2003; Pinilla *et al.*, 2008).

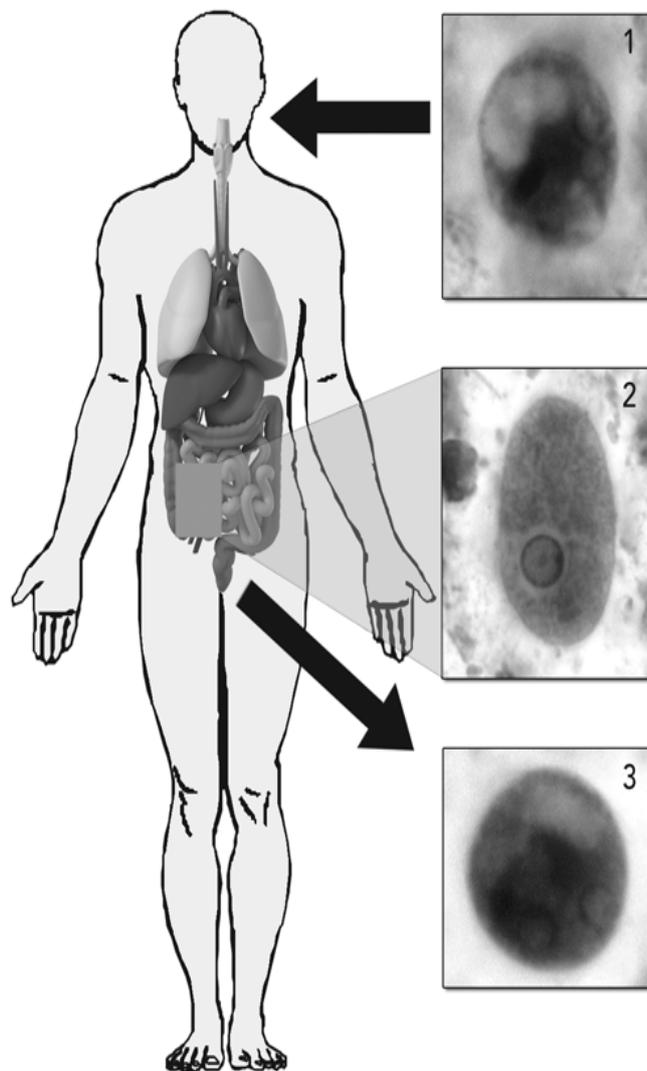


Figura 2. El ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. La infección ocurre por la ingestión del quiste maduro (1). La exquistación ocurre en el intestino delgado liberándose los trofozoitos (2), los cuales migran al intestino grueso. Los trofozoitos se multiplican por fisión binaria y producen quistes, los cuales pueden ser desechados por las heces (3). Imagen aumentada x1000. Tinción de hierro-hematoxilina modificada (van Hal *et al.*, 2007).

A pesar de que se ha descrito ampliamente la capacidad patogénica de los trofozoitos de *E. histolytica* en los tejidos afectados, principalmente en el intestino grueso o en el hígado, en la actualidad todavía se desconocen muchos de los mecanismos intrínsecos de la amiba y los factores del hospedero que conducen a la producción de las lesiones.

Mecanismos de patogenicidad

E. histolytica puede generar diversas lesiones en el hospedero, y los daños son esencialmente llevados a cabo por los trofozoítos, siendo la única forma del ciclo vital capaz de ocasionar enfermedad. Los trofozoítos, al estar en contacto con el hospedero, se adhieren a las células epiteliales de la mucosa intestinal, a las células endoteliales, o a las células efectoras del sistema inmune, entre éstas, células polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos (Ravdin *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1994; Berninghausen y Leippe, 1997; Leroy *et al.*, 2000; Huston *et al.*, 2003). Esta unión se lleva a cabo por una lectina de unión a galactosa-N-acetil-galactosamina (Gal/GalNAc), misma que puede inhibirse por la galactosa (Ravdin y Guerrant, 1981; Petri Jr., y Schnaar, 1995; Espinosa-Cantellano and Martinez-Palomo 2000), y puede ser el primer paso para iniciar la fagocitosis o la lisis de las células por mecanismos dependientes de contacto. La lisis de las células del hospedero lleva a cabo por diversas moléculas, entre las que se incluyen fosfolipasas amebianas, microfilamentos de actina, iones de calcio, activación de la caspasa 3, exposición de fosfatidilserina (PS) en el exterior de la membrana de la célula del hospedero y la fosfolipasa A dependiente de calcio (Stanley Jr, *et al.*, 1992; Leroy *et al.*, 1995; Espinosa-Cantellano y Martinez-Palomo, 2000; Huston *et al.*, 2000; Huston *et al.*, 2003); Por otro lado, existe una manera indirecta de causar la lisis de las células del hospedero, en la cual intervienen citolisinas leucocitarias resultantes de la lisis de leucocitos por el mecanismo anteriormente descrito. En este caso, las células polimorfonucleares que constituyen la respuesta inicial del hospedero contra los trofozoítos son invariablemente destruidas por estos y los productos de la lisis aumentan el daño a los tejidos (Espinosa-Cantellano y Martinez-Palomo, 2000).

Entre los diversos factores de virulencia, se han descrito diversas moléculas, como una proteína de 77 aminoácidos formadora de poros (amebaporos), la cual puede lisar bacterias y células eucarióticas. Esta proteína induce en las células blanco la salida de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Bruchhaus *et al.*, 1996; Leippe, 1997; Ravdin *et al.*, 1988). *E. histolytica* también secreta enzimas proteolíticas, en las que se incluyen cisteín-proteasas, las más abundantes en los trofozoítos, proteinasas de unión a membrana, la amepainina, la catepsina B, proteinasas ácidas, histolisinas, colagenasas y proteinasas neutrales, muchas de las cuales están implicadas en la destrucción de la matriz extracelular, y que ayudan los trofozoítos a infiltrarse en los tejidos (Scholze y Schulte 1988; Schulte y Scholze, 1989; Reed *et al.*, 1989a; Reed *et al.*, 1989b; Avila y Calderon, 1993; Scholze y Tannich, 1994; Bruchhaus *et al.*, 1996; Jacobs *et al.*, 1998; Perreault *et al.*, 1998; Espinosa-Cantellano y Martinez-Palomo, 2000; Huston *et al.*, 2000; Huston *et al.*, 2003).

Otro factor de virulencia que influye importantemente en la patogénesis de *E. histolytica* es la fagocitosis (Guzman-Medrano *et al.*, 2005; Okada y Nozaki, 2006), proceso que está involucrado en la recolección de células apoptóticas opsonizadas y necróticas, además de la ingestión de bacterias (*E. coli* y *S. marcescens*) y eritrocitos, los cuales pueden servir como fuente de hierro (Bracha *et al.*, 1982; Serrano-Luna *et al.*, 1998; Huston *et al.*, 2003, Ackers y Mirelman, 2006).

La fagocitosis en *E. histolytica*

En los organismos del grupo de los metazoa, la fagocitosis, además de estar implicada en la defensa contra agentes patógenos, e ingesta de algunos nutrientes, está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis celular con la eliminación de desechos celulares necróticos y apoptóticos. A diferencia de los metazoa, los protozoarios se valen de la fagocitosis como un mecanismo de internalización de nutrientes del medio exterior, pero tanto en organismos del grupo de los metazoa como en los protozoarios, la fagocitosis suele ser dividida en diversos pasos de acuerdo a los cambios bioquímicos y morfológicos que se presentan, los cuales son: 1) el reconocimiento de partículas o células por la unión de ligando-receptor; 2) la activación de diversas series de eventos, incluyendo vías de señalización y la reorganización del citoesqueleto que llevan a la extensión de los pseudópodos; 3) el cierre de los pseudópodos alrededor de la partícula formando el fagosoma, el cual se fusiona secuencialmente con endosomas tempranos o tardíos; 4) y la fusión del fagosoma con el lisosoma llevando a la digestión de la partícula internalizada. Muchos trabajos realizados sobre este tema indican que la especificidad de las interacciones entre la partícula y los receptores de superficie activan vías de señalización que guiarán el destino de la partícula fagocitada y, por ende, la respuesta montada por la célula fagocítica (Espinosa-Castellano y Martínez-Palomo, 1991; Baxt y Singh, 2008; Boettner *et al.*, 2008).

Poco se ha descrito en *E. histolytica* acerca del reconocimiento de las partículas que serán fagocitadas. Se ha reportado que las lectinas de Gal-GalNAc tienen un papel muy importante para el reconocimiento de fosfatidilserina (PS) en la superficie de las células diana (Huston *et al.*, 2003; Boettner *et al.*, 2005), y en particular de los eritrocitos, a través de un miembro de la familia de las cinasas transmembranales denominado PATMK (cinasa transmembranal asociada a fagosoma) que inicia el proceso de la fagocitosis en un mecanismo dependiente de miosina IB (Voigt *et al.*, 1999). Estos eventos desencadenan diversas vías de señalización que implican, al igual que en los metazoa, movilización de Ca^{2+} , formación de fosfoinosítidos y diferentes tipos de cinasas (Janmey, 1994), lo cual lleva al reclutamiento de moléculas de F-actina, α -actina y forminas, para comenzar la

internalización de la partícula por medio de la formación de los pseudópodos, que pueden ser tan largas como una tercera parte de la amiba (Marion *et al.*, 2005; Okada y Nozaki, 2006). Estas extensiones son organizadas por proteínas de unión a actina como la profilina, que concentra G-actina al punto de contacto receptor-partícula; el complejo Arp2/3, que une profilina y participa en la regulación de la polimerización de actina (por su capacidad de nucleación) y comunicar los filamentos de actina; el factor de gelación ABP-120 implicado en la reorganización del citoesqueleto; y la miosina no-convencional IB que no forma filamentos (Binder *et al.*, 1995; Vargas *et al.*, 1996; Vargas *et al.*, 1997; Voigt *et al.*, 1999). Esta reorganización coordinada del citoesqueleto se encarga de la formación del fagosoma. Esta última estructura principalmente madurará a través de ameboporos y cisteín-proteasas para la destrucción de la partícula ingerida para finalmente ser expulsada por exocitosis (Que *et al.*, 2002; Andra *et al.*, 2003).

Entre los protozoarios y los organismos pertenecientes al grupo metazoa, se han descrito diversas proteínas homólogas que se han mantenido conservadas a través de la evolución de estas dos ramas de organismos eucariontes, y además tienen un papel específico en la realización de eventos tan complejos como la fagocitosis. Es de esperarse que las moléculas claves en procesos evolutivamente conservados estén presentes en organismos filogenéticamente distantes. Para el caso de la fagocitosis, estas moléculas incluyen proteínas que posean al dominio TIR, que se ha demostrado en múltiples organismos que es muy importante para iniciar la señalización requerida para los eventos indispensables en fagocitosis. Proceso que tanto para las amibas como para otros organismos es fundamental tanto para la ingesta de nutrientes, como para defensa en contra de agentes extraños.

JUSTIFICACIÓN

Entamoeba histolytica es el agente causal de la enfermedad parasitaria intestinal denominada amibiasis, la cual presenta una mayor prevalencia en las áreas pobres del planeta e infesta a alrededor de 500 millones de personas en el mundo. A pesar de que sólo el 10 % de las personas que son infectadas por el parásito desarrollan síntomas, las consecuencias de esta enfermedad pueden ir desde una simple diarrea hasta lesiones cerebrales o la muerte. Uno de los principales mecanismos de patogenicidad con los que cuenta *E. histolytica* es la fagocitosis de células epiteliales, endoteliales, eritrocitos, leucocitos y bacterias comensales; sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales la amiba lleva a cabo este proceso están poco estudiados.

Recientemente se describió una proteína con un dominio intracelular denominado TIR que sirve para mediar el proceso de fagocitosis en la amiba de vida libre *Dictyostelium discoideum*, la cual se encuentra filogenéticamente relacionada con *E. histolytica*. Dicho dominio TIR también se encuentra en las células fagocíticas de los mamíferos y es de gran importancia para iniciar las diferentes vías de señalización necesarias para montar la respuesta inmune ante la presencia de agentes externos. Lo anterior sugiere que *E. histolytica* también puede presentar proteínas que contengan al dominio TIR, y que estas podrían estar involucradas en el proceso de fagocitosis. Como la fagocitosis es un mecanismo de patogenicidad de *E. histolytica*, las proteínas que participan en este proceso pueden servir como blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevos fármacos contra la amibiasis.

HIPÓTESIS

E. histolytica posee proteínas con el dominio TIR que median el proceso de fagocitosis en los trofozoitos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia del dominio TIR en proteínas de *Entamoeba histolytica*, y evaluar su posible participación en el proceso de fagocitosis.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Buscar, por medio de análisis *in silico*, secuencias que presenten el dominio TIR en diferentes bases de datos que contengan el proteoma de *Entamoeba histolytica*.
- Determinar, mediante RT-PCR, la presencia de secuencias de mRNA que codifiquen para proteínas que contengan el dominio TIR en *E. histolytica*.
- Diseñar RNAs de interferencia que disminuyan la cantidad de transcritos que codifiquen para proteínas que contengan el dominio TIR en *E. histolytica*.
- Determinar la participación del dominio TIR en el proceso de fagocitosis por *E. histolytica*.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Esquema general de trabajo

La figura 3 describe esquemáticamente la estrategia que se seguirá para la solución del problema planteado.

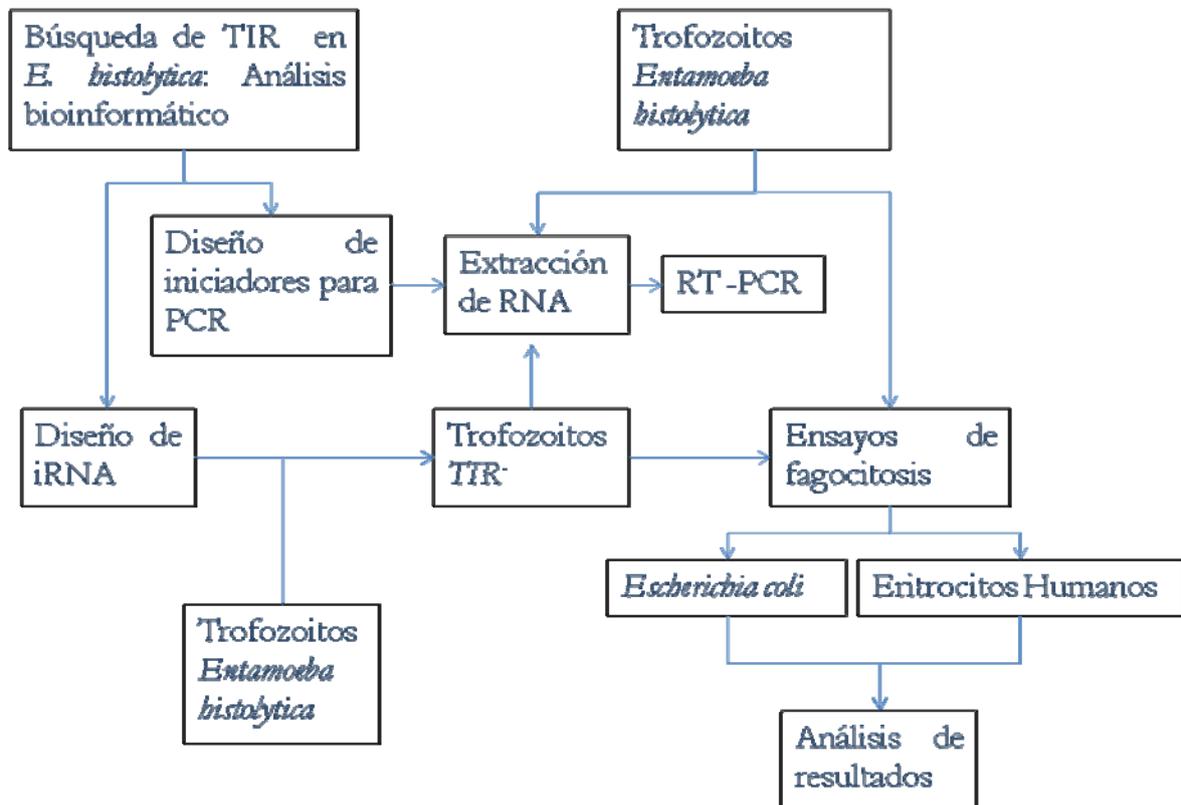


Figura 3. Esquema general de trabajo.

1. Búsqueda del dominio TIR en *E. histolytica* por análisis bioinformático.

Para la búsqueda del dominio TIR en proteínas de *Entamoeba histolytica* se realizaron cuatro estrategias que hacen uso de técnicas bioinformáticas:

1) Se diseñó una matriz de puntajes de posiciones específicas, o PSSM por sus siglas en inglés, con el programa PSI-BLAST del NCBI (National Center for Biotechnology Information) a partir de la secuencia de aminoácidos que corresponde al dominio TIR de la proteína TirA de *Dictyostelium discoideum* realizando 4 iteraciones, lo cual permite identificar proteínas homólogas en diversos organismos evolutivamente alejados y afinar la búsqueda de secuencias específicas. La PSSM fue utilizada en el programa BLAST con la limitación de búsqueda al grupo taxonómico *Amoebozoa*.

Para las dos estrategias siguientes se descargó el proteoma de *E. histolytica* de la base de datos del NCBI y del Instituto Sanger en el formato FASTA, y el alineamiento semilla de diferentes secuencias del dominio TIR de diversos organismos, a partir de la base de datos del servidor Pfam, con número de acceso PF01582.

2) Con el programa Bayes-Block Aligner, el cual calcula la probabilidad de que una matriz de sustitución empleada en un alineamiento relacione correctamente nuevas secuencias de prueba (que pueden estar contenidas en una base de datos) a un alineamiento determinado (como los alineamientos semilla), se generó un banco de datos que contenía los alineamientos de cada una de las secuencias del proteoma de *E. histolytica* (tanto del NCBI como del Instituto Sanger) con el alineamiento semilla; este banco de datos también incluía la puntuación de diversas matrices de sustitución de aminoácidos con cada alineamiento. Aquellas secuencias donde alguna matriz de sustitución utilizada mostró altos puntajes de alineamiento ($P \approx 1$) fueron propuestas como secuencias que contienen el dominio TIR.

3) Con el paquete de programas de HMMER se diseñó un modelo oculto de Markov, o HMM, los cuales son modelos estadísticos basados en una cadena de Markov y describen los estados de un sistema en etapas sucesivas; el sistema puede realizar transiciones desde un estado a otro y la probabilidad de estos cambios es independiente de las condiciones pasadas y depende solo de su estado actual. En el caso particular de los modelos de Markov para el alineamiento de secuencias, los estados del sistema representan las columnas del alineamiento y los símbolos son aminoácidos que componen a las secuencias. Los HMM pretenden calcular los parámetros desconocidos (las probabilidades de emisiones y transiciones) a partir de parámetros observables. La utilidad de los

HMM en los alineamientos múltiples, el cálculo de los parámetros puede modelarse a partir de un alineamiento previo o un alineamiento semilla. De esta manera, el HMM obtenido puede considerarse como un perfil estadístico (como una matriz de puntuación) que puede emplearse para incluir otras secuencias al alineamiento o bien para realizar búsquedas de secuencias similares a las que lo componen en una base de datos (Eddy, 2004).

El HMM se construyó con el programa HMMBUILD a partir del alineamiento semilla PF01582 y fue calibrado con el programa HMMCALIBRATE para disminuir problemas de interpretación incorrecta del alineamiento por baja representatividad de algunos residuos en el alineamiento. Posteriormente, a partir del HMM construido, se realizó la búsqueda del dominio en cuestión con el programa HMMSEARCH sobre la base de datos de proteínas descargada del NCBI y del Instituto Sanger, lo que generó un archivo que muestra los resultados de los alineamientos de aquellas secuencias que tienen la probabilidad más alta de que presenten el dominio TIR.

4) Finalmente, se realizó la búsqueda del dominio TIR en el servidor Pathema del Instituto J. Craig Venter con la herramienta “**Motif Search**”, que hace uso de HMMs del servidor Pfam, en tres diferentes especies del género *Entamoeba*: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* y *Entamoeba invadens*. Las proteínas que daban puntuaciones positivas a la búsqueda se sometieron al programa HMMSEARCH para localizar los sitios específicos donde se encontraba el dominio TIR; con ello, se realizó una búsqueda de secuencias homólogas en BLAST, del NCBI, limitándola a la especie *E. histolytica*.

Las secuencias de proteínas que dieron puntajes positivos a secuencias homólogas del dominio TIR se sometieron a un análisis estructural con el programa PHYRE (Protein Homology/analogy Recognition Engine) para verificar su correspondencia con la estructura terciaria descrita en la literatura.

2. Diseño de iniciadores

De las proteínas propuestas que presentan el dominio TIR, se buscó el mRNA en la base de datos del NCBI. Esta secuencia se sometieron al diseño de iniciadores para PCR en el programa Primer3 (v. 0.4.0).

3. Estandarización de métodos

Cultivo de *E. histolytica*

Los siguientes ensayos se realizaron a partir de un cultivo axénico de trofozoitos de *E. histolytica* cepa C-26 crecidos en medio TYI-S-33 de acuerdo al método descrito por Diamond en 1961. Se cosecharon 20×10^6 trofozoitos/mL a partir de un inóculo de 8×10^6 trofozoitos en botellas de 175 cm² con 100 mL de medio TYI-S-33. El conteo de las células se efectuó en cámara de Neubauer.

Extracción del RNA de trofozoitos de *E. histolytica*.

Se extrajo el RNA total de 1×10^6 , 5×10^6 y 1×10^7 trofozoitos por el método estándar para células animales con isotiocianato de guanidinio, fenol y cloroformo, el cual consiste en adicionar 1 ml de TRIzol (Invitrogen®) por cada 10 cm² de células, 200 µl de cloroformo (Merck) para formar el gradiente de DNA, proteínas y RNA, separación manual de este último y posterior precipitación con 300 µL de isopropanol. La calidad del RNA extraído fue puesta a prueba por su patrón de corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio comparado con un marcador de tamaño molecular de 1000 bases. La imagen se observó en un documentador de geles bajo la exposición de luz ultravioleta.

Ensayo de fagocitosis de *Escherichia coli*.

Se suspendieron 1×10^6 trofozoitos en 1 mL de medio TYI-S-33 en placas de 12 pozos y se pusieron en contacto con 50 µL de un cultivo *E. coli* cepa DH-5α o con 50 µL *E. coli* transformada con el plásmido que expresa la proteína verde fluorescente (“green fluorescent protein”, GFP) crecidos en medio LB, correspondiente a aproximadamente 50×10^6 UFC en cada pozo. Se incubaron durante 0, 15, 30 y 45 min con agitación constante a 150 rpm y se adicionó 15 µL de gentamicina (1 µg/mL) con el fin de eliminar a las bacterias no fagocitadas. Transcurridos 10 min de la adición de la gentamicina se centrifugó la placa a 250 g, se decantó el sobrenadante por inversión y el botón celular fue resuspendido en PBS frío. Se realizó la lectura de los trofozoitos en suspensión en el citómetro de flujo BD FACSAria capturando al menos 10 000 eventos en el lector de FITC (isotiocianato de fluoresceína) y los datos se analizaron con el programa Summit.

Ensayo de fagocitosis de eritrocitos.

Para este ensayo se pusieron en contacto 1×10^6 trofozoitos suspendidos en 1 mL de medio TYI-S-33 con 1×10^8 eritrocitos humanos extraídos por el método del gradiente de Ficoll en placas de 12 pozos durante 0, 15 y 30 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, cada muestra se transfirió a un tubo de ensayo y se les adicionaron 5 mL de agua destilada fría dejándolo reposar por 10 min. Se centrifugaron los tubos a 2 300 g durante 60 s y se resuspendió el paquete celular en 1 mL de ácido fórmico concentrado, entonces se midió la absorbancia de cada una de las condiciones en un espectrofotómetro a 400 nm, comparándolas con un blanco de ácido fórmico.

4. Búsqueda por RT-PCR del dominio TIR en *E. histolytica*.

A partir de 1×10^7 trofozoitos se extrajo el RNA total por el método de isotiocianato de guanidinio, fenol y cloroformo, el cual fue tratado con el reactivo DNasa Qiagen con el fin de eliminar residuos de DNA.

A partir de 1 µg de RNA total se realizó la retrotranscripción con el sistema *SuperScript II RNase-reverse transcriptase* para obtener así el cDNA correspondiente. Se realizaron además dos controles: 1) la reacción se llevó a cabo sin el RNA total con el sistema de retrotranscripción; 2) la reacción con RNA total sin el sistema de retrotranscripción.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las genes en estudio se realizó según se reporta en la bibliografía (Pinheiro *et al.*, 2004). En un volumen final de 25 µL se mezclaron 2.5 µL de la solución “Mg free Thermophylic DNA poly buffer 10x (Promega)”, 0.5 µL de una mezcla de dNTPs 10 mM, 1.5 µL de una solución de MgCl₂ 25 mM (Promega), 0.25 µL de Dimetilsulfóxido (Sigma), sin o con 0.25 µL de Taq Polimerasa (Promega), 2.5 µL de los iniciadores, sentido y antisentido que determinan la presencia de los transcritos de proteínas que poseen el dominio TIR en una concentración 100 pM (10 pmol, cada iniciador), y 1 µg, 0.1 µg o 0.01 µg de cDNA de *E. histolytica*, y el volumen de agua nanopura necesario para completar 25 µL del volumen de reacción. Los ciclos térmicos consistieron de una desnaturalización inicial a 94°C por 1min, seguido de 50 ciclos a 94°C por 1min, 59°C a 90s, 72°C a 90s, y extensión final a 72°C por 5min. Los productos de la PCR se aislaron en un gel de electroforesis de agarosa al 2% con bromuro de etidio, junto con un marcador de tamaño molecular de 1000 bases, y la imagen se obtuvo de un documentador de geles bajo la exposición de luz ultravioleta.

5. Búsqueda de la participación del dominio TIR de *E. histolytica* en el proceso de fagocitosis

Diseño del dsRNA para el silenciamiento de los transcritos que codifican para proteínas con el dominio TIR

Una vez comprobada la existencia de los transcritos de proteínas que contenían el dominio TIR se diseñaron iRNAs (RNAs de interferencia) específicos para cada secuencia (3 para cada transcrito que se silencie con el objetivo de hacer más eficiente el proceso de silenciamiento de cada transcrito) con ayuda del programa “IDT’s RNAi design” de Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/RNAi/RNAi.aspx>). Cada una de las secuencias obtenidas fueron oligonucleótidos de 21 a 23 nt de RNA de doble cadena que además poseían 2 nt sobresalientes en los extremos 3’ y contenían sitios de reconocimiento de la enzima Dicer, la cual es una ribonucleasa miembro de la familia de las RNasas III que separa RNAs de doble cadena (dsRNA) (Berstein *et al.*, 2001). Por otro lado, con el programa BLAST, las secuencias obtenidas se sometieron a la búsqueda de secuencias de otros transcritos que también pudieran ser silenciados, siendo que no se encontró secuencia alguna, diferente para las secuencias que fueron diseñadas, que fueran blanco de silenciamiento.

Silenciamiento de los transcritos que codifican para proteínas con el dominio TIR mediante RNAi

El método utilizado se denomina “soaking”, el cual consiste en adicionar los RNAi de doble cadena al medio de cultivo, con la expectativa de que estos difundan al citoplasma de los trofozoitos, y por medio de los mecanismos de los RNAi innatos de los organismos eucariontes se espera que disminuyan los transcritos de las secuencias para los cuales los RNAi fueron diseñados. Cada una de las secuencias de RNAi generadas sintéticamente (3 para cada transcrito: PATMK como control positivo de silenciamiento, la tiorredoxina y la GTPasa) se adicionaron, de manera separada a una concentración final de 10 µg/mL, a 200 000 trofozoitos de un cultivo axénico de *E. histolytica* con una confluencia del 50 % contenidas en 1 mL de medio TYI-S-33 en placas de cultivo de 24 pozos y se incubaron durante 20 horas a 37°C en un ambiente microaerofílico. A cada cultivo con los diferentes RNAs de interferencia utilizado se les denominó: cepa silvestre (WT), PATMK⁻, Tiorredoxina⁻, y GTPasa⁻, correspondientemente al uso de RNAi específicos. Tras el tiempo de incubación de los trofozoitos con los diferentes RNAi, se verificó la disminución de los transcritos de las secuencias de la PATMK, la tiorredoxina y la GTPasa por medio de RT-PCR con la estrategia señalada anteriormente. Posteriormente las bandas resultantes fueron analizadas por densitometría con el programa “ImageJ” con el fin de verificar el nivel de silenciamiento.

Evaluación de la participación del dominio TIR de *E. histolytica* en el proceso de fagocitosis

A partir de los cultivos silenciados de cada transcrito (Tiorredoxina⁻, GTPasa⁻), incluyendo el control positivo de silenciamiento (PATMK⁻), se realizaron los ensayos de fagocitosis, tanto de bacterias como de eritrocitos, de la misma manera en que se realizó la estandarización de dichos ensayos con tiempos de exposición trofozoito-*E.coli* o trofozoito-eritrocito de 45 min y se evaluó la capacidad de fagocitosis para cada una de las condiciones comparándolas con los trofozoitos sin la adición de RNAi (cepa silvestre, WT)

RESULTADOS

Análisis *in silico*: en búsqueda del dominio TIR

A partir de la secuencia TirA de *D. discoideum* se generó una PSSM en el programa PSI-BLAST del NCBI, misma que se utilizó en el programa BLAST con la limitación de búsqueda al grupo taxonómico **Amoebozoa**; con esto únicamente se encontró la proteína TirA de *D. discoideum* en dicho grupo, sin encontrar proteínas homólogas del dominio TIR en algún otro género perteneciente al taxa.

Debido a la limitación que tiene el programa BLAST del NCBI para acceder a la base de datos actualizada de proteínas de algunos organismos, se descargó el proteoma de *E. histolytica* de la base de datos del NCBI y del Instituto Sanger en el formato FASTA; en esta base de datos se observaron diferencias en el número de secuencias de proteínas; por ejemplo, la base de datos del NCBI contiene 16338 secuencias, mientras que la base de datos del Instituto Sanger contiene 17149 secuencias. Lo anterior se efectuó con el fin de realizar una búsqueda más sensible con el programa Bayes-Block Aligner y el paquete de programas de HMMER que hace el uso de HMMs.

Los resultados encontrados con el programa Bayes-Block Aligner sugieren la presencia del dominio TIR en las proteínas gi|56468548|gb|EAL46385.1, una GTPasa de la familia Rab, y gi|56472248|gb|EAL49747.1, una proteína hipotética, las cuales mostraron altos puntajes con matrices de sustitución BLOSUM 80 y BLOSUM 40, respectivamente. Por otro lado, al someter las secuencias de las proteínas al análisis con el programa PHYRE, solamente el fragmento de la secuencia de la GTPasa parecido al dominio TIR, se asemeja ligeramente a la estructura TIR modelo (Figura 1b).

Por otra parte, con el paquete de programas HMMER se diseñó un HMM para el dominio TIR a partir del alineamiento semilla que contiene 1377 secuencias de diferentes organismos con este dominio. El HMM puede visualizarse con el programa HMM logos del servidor Pfam (Figura 4). Esta gráfica muestra la aparición relativa de un aminoácido (representado como una letra) en una posición específica (entropía), de tal manera que entre mayor sea el tamaño de letra de un aminoácido en una posición específica, la aparición de este aminoácido entre las secuencias que presentan el dominio TIR será más frecuente, y por lo tanto, la conservación en esta posición es mayor. Dicha gráfica muestra alta conservación en el grupo de aminoácidos situados cerca de las posiciones 10 y 70, que concuerda con lo reportado en la literatura (Xu *et al.*, 2000); no así en la región situada en la posición 145 que se describe estar en la posición 160.

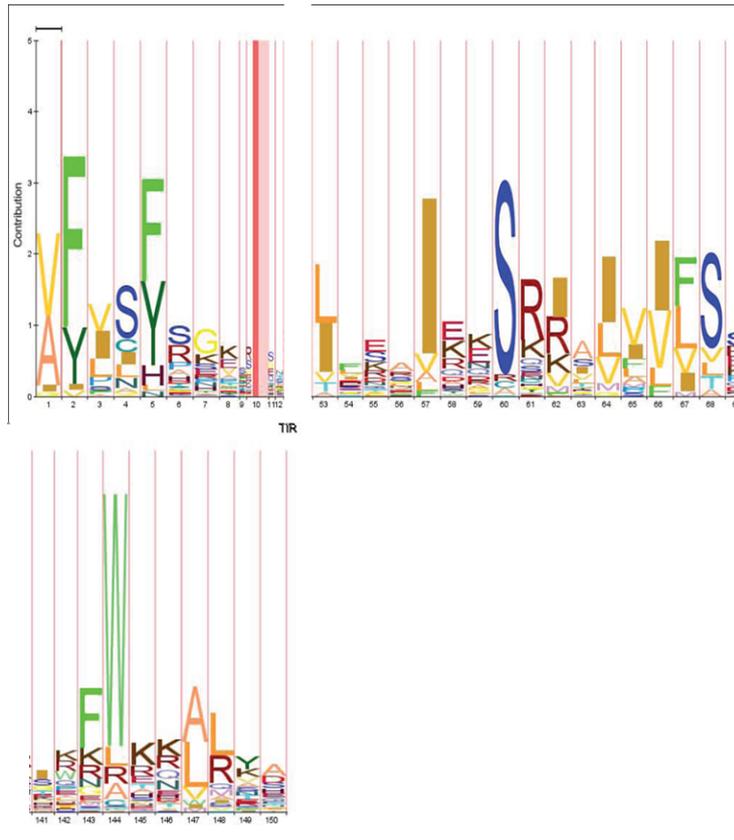


Figura 4. Representación gráfica del HMM del dominio TIR. Esta grafica muestra la frecuencia de aparición de un aminoácido (representado cada aminoácido con una letra mayúscula) entre las secuencias que contienen al dominio TIR, en una posición específica del dominio TIR, según el HMM generado a partir de un alineamiento semilla que contiene 1377 secuencias con el dominio TIR.

Sin embargo, al someter las bases de datos de proteínas, tanto del NCBI como la del Instituto Sanger, a la búsqueda de secuencias con el dominio TIR con el HMM generado, no se observaron secuencias con puntuaciones significativas, ya todas las secuencias mostraron valores de expectación <0.01 para considerar una proteína dentro de este grupo (la expectación es la medición estadística del número de alineamientos que se podrían encontrar al azar con una puntuación igual o mayor a la encontrada, durante una búsqueda en la base de datos). Con ello se decidió realizar la búsqueda del dominio en cuestión a través de secuencias homólogas de otros organismos del género *Entamoeba* en el servidor Pathema; este servidor permite buscar familias de proteínas, a través de HMMs, con el programa HMMSEARCH en la base de datos que contiene el proteoma de las diferentes especies de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. invadens*.

Con la estrategia anterior se encontraron cuatro proteínas con puntajes estadísticamente significativos en *E. invadens*: las proteínas EIN_052840, y EIN_134280, las cuales son proteínas hipotéticas; y la proteína EIN_092020 y EIN_191870, dos supuestos factores de alargamiento 1-alpha. Para determinar las posiciones específicas que presentan el dominio TIR, se generó una pequeña base de datos con estas cuatro proteínas, con ello se realizó la búsqueda de las regiones homólogas correspondientes al dominio TIR con el programa HMMSEARCH y el HMM. Las

secuencias de estas posiciones se sometieron al programa BLAST del NCBI limitando la búsqueda al organismo *E. histolytica* HM1-IMSS para encontrar secuencias homólogas en este organismo. Con esta última búsqueda se encontró solo un homólogo de esta secuencia en la proteína con número de acceso XP_649779, una tiorredoxina de *E. histolytica*, en la posición comprendida entre los aminoácidos 344 y 442.

Esta proteína se analizó con el programa PHYRE para verificar que la estructura terciaria predicha correspondía con la estructura de cinco cadenas alfa hélices y 5 cadenas beta plegadas y se observó una estructura muy similar a la que presenta el dominio TIR (Figura 5).

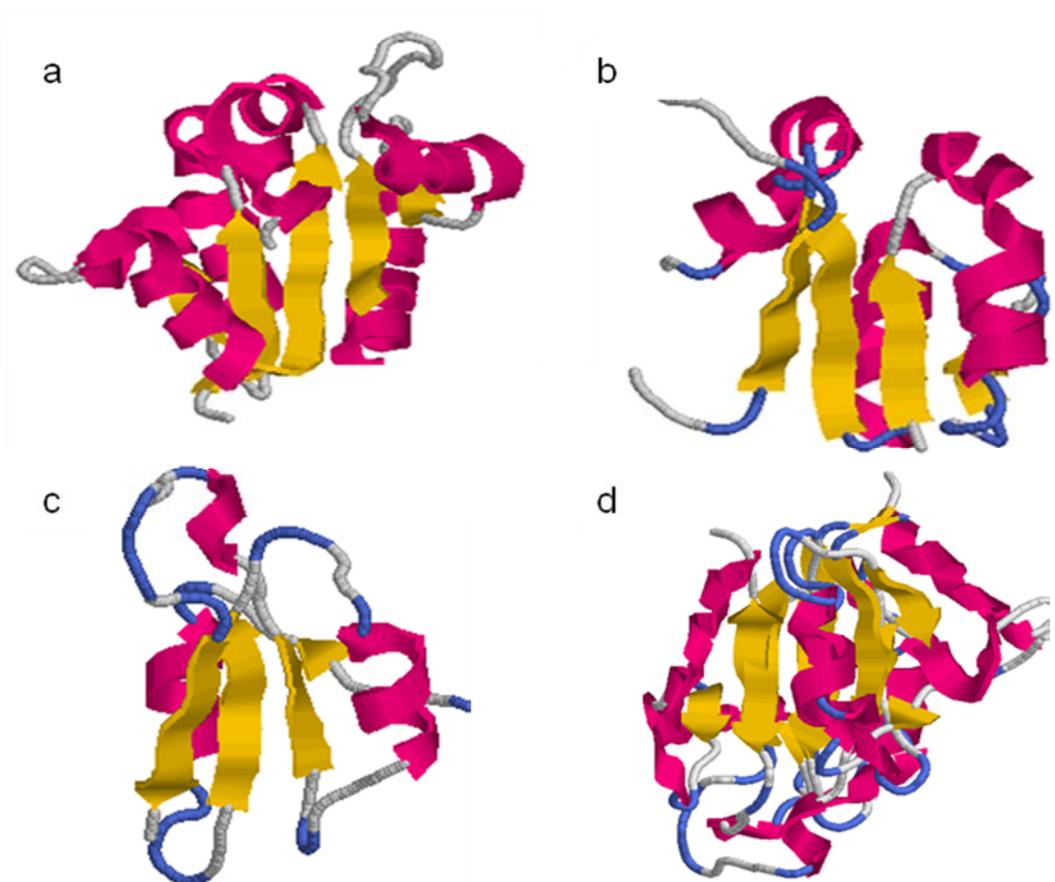


Figura 5. Comparación de la estructura del dominio TIR de una tiorredoxina de *E. histolytica*, con la de TLR2 de *H. sapiens* y la de TirA de *D. discoideum*. Estructura del dominio TIR de: a) TLR2 de *H. sapiens* descargada de la base de datos de PDB (Protein Data Bank); b) Estructura predicha por el programa PHYRE de *D. dicoideum*; y c) Estructura predicha por el programa PHYRE de *E. histolytica* que pudiera corresponder al dominio TIR. d) Alineamiento en tres dimensiones del dominio TIR del TLR-2 humano y de la tiorredoxina de *E. histolytica* generado con el programa “Combinatorial Extension (CE)”. Vistas generadas con el programa RasMol.

Diseño de iniciadores para la RT-PCR

Para el diseño de iniciadores se realizó la búsqueda del mRNA de la tiorredoxina y la GTPasa que presenta el dominio TIR (No. de acceso XP_649779 y EAL46385 respectivamente), y de la proteína PATMK (esta secuencia será utilizada como control positivo de la técnica de RT-PCR y como control positivo de silenciamiento, No. de acceso XP_655593.1) en la base de datos del NCBI, encontrando la secuencias de mRNA con los números de acceso XM_644687.2, EHI_114210A y XM_650501, respectivamente. Con dichas secuencias se realizó el diseño de iniciadores para PCR con el programa Primer3 (v. 0.4.0). Estos iniciadores se utilizaron para la amplificación de secuencias de cDNA correspondientes a secuencias de RNA total de *E. histolytica*. Las características de los iniciadores se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Características generales de los iniciadores para el ensayo de RT-PCR del cDNA de la tiorredoxina, la GTPasa y la PATMK de *E. histolytica*.

Iniciadores	Longitud del amplicon (nt)	Oligo	Sitio de Inicio (nt)	Tm	%GC	Secuencia (Dirección 5'→3')
XP_649779, tiorredoxina	219	Iniciador sentido	389	59.53	50.00	GGAGGTAATGGCTGAAATGC
		Iniciador antisentido	572	58.86	42.86	GGAGGTAATGGCTGAAATGC
GTPasa	196	Iniciador sentido	124	59.69	45.00	TCCATCACCAGTTTTTGCTG
		Iniciador antisentido	290	58.86	50.00	GGGCAAGGGACATCACTTAT
PATMK (Cinasa Transmembranal asociada al fagosoma) *	186	Iniciador sentido	2059	60.01	45.00	AATGGGTGTGCTGTTTGTC A
		Iniciador antisentido	2277	59.26	55.00	CCCTTCAGCACATCTGT CAC

* Esta secuencia será utilizada como control positivo de la técnica de RT-PCR y como control positivo de silenciamiento.

Estandarización de métodos

Extracción de RNA

Para realizar los ensayos de RT-PCR se determinó la cantidad de trofozoitos necesarios para obtener concentraciones adecuadas de RNA para dicha prueba. Así, 1×10^6 , 5×10^6 y 1×10^7 trofozoitos fueron sometidos a extracción de RNA total por el método de isotiocianato de guanidinio, fenol y cloroformo. Se verificó la integridad del RNA obtenido en base a su patrón de corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% marcado con bromuro de etidio, comparándolo con un

marcador de tamaño molecular y revelado con luz UV (Figura 6). El patrón de corrimiento muestra que los carriles 2 y 3, que corresponden a muestras de RNA empleando 1×10^6 trofozoitos, y, 4 y 5 que corresponden a muestras de RNA empleando 5×10^6 trofozoitos, tienen bajo rendimiento de extracción. Por otro lado, los carriles 6 y 7, donde se emplea RNA de 10×10^6 trofozoitos, tienen suficiente cantidad de RNA para realizar la PCR. Las bandas de referencia son las correspondientes a los RNAs ribosomales 28.5S y 18.5S.

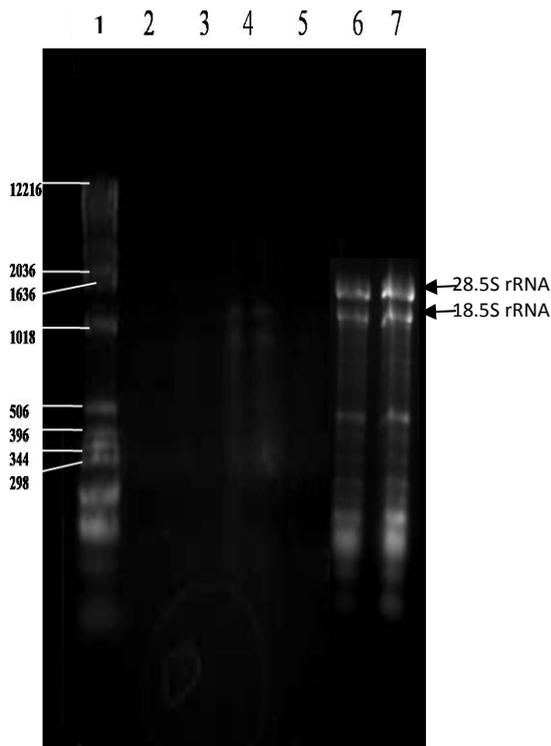


Figura 6. Electroferograma del RNA total de *E. histolytica*. Las muestras corresponden a la extracción de RNA por el método de isotiocianato de guanidinio, fenol y cloroformo, donde los carriles corresponden a: 1) marcador de tamaño molecular (MW); 2) y 3) RNA extraído a partir de 1×10^6 trofozoitos; 4) y 5) RNA extraído a partir de 5×10^6 trofozoitos; 6) y 7) RNA extraído a partir de 1×10^7 trofozoitos.

Amplificación de las secuencias con el dominio TIR por RT-PCR

Se extrajo el RNA total de 1×10^7 trofozoitos y se procedió a la obtención de cDNA por retrotranscripción. Se realizó la PCR para amplificar secuencias que correspondieran a los mRNAs que codificaran para las proteínas con el dominio TIR. Como se observa en la figura 7, *E. histolytica* expresa los transcritos de las proteínas predichas que tienen el dominio TIR (Figura 7; carriles 7, 8, 10 y 11), de los cuales, la longitud de los fragmentos corresponden a la longitud esperada de los mismos, que es de aproximadamente 200 nucleótidos cada uno (Tabla 1).

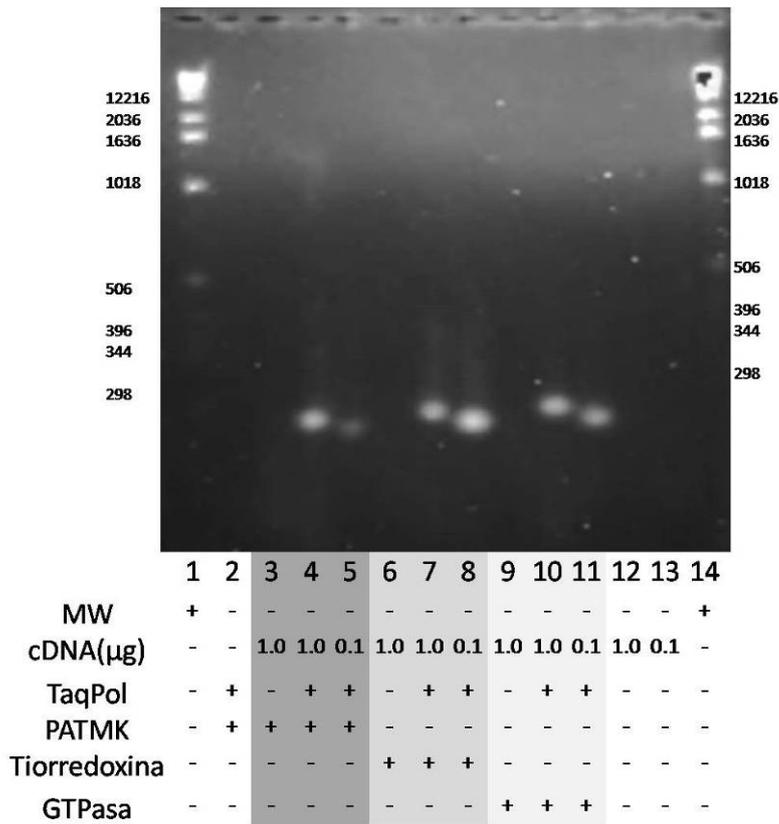


Figura 7. *E. histolytica* posee transcritos que codifican proteínas con el dominio TIR. Ensayos de RT-PCR para detectar transcritos que codifiquen para proteínas que poseen el dominio TIR a partir de RNA total de trofozoitos de *E. histolytica*. Los pares de iniciadores empleados corresponden a oligonucleótidos sintetizados para amplificar fragmentos de cDNA que correspondan a transcritos de las proteínas PATMK (transcrito esperado de 219 nucleótidos), la tiorredoxina (transcrito esperado de 193 nucleótidos), y la GTPasa (transcrito esperado de 186 nucleótidos). Las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, y el cuadro fue capturado en un documentador de imágenes bajo la exposición a luz UV. (+), presencia del reactivo; (-), ausencia del reactivo.

Fagocitosis de *E. coli* por trofozoitos de *E. histolytica*

Se estandarizó la capacidad fagocítica de bacterias como el nivel máximo de bacterias endocitadas por trofozoito. La cepa utilizada fue *E. coli* DH-5α, transformada con el plásmido que contiene la proteína verde fluorescente (GFP) (en proporción de 100:1), lo que permite su análisis cualitativo por citometría de flujo. Como se muestra en la figura 8, el proceso de fagocitosis no modifica la autofluorescencia natural del trofozoito (trofozoito vs trofozoito-*E.coli*-DH5α en contacto 45 min), y la intensidad media de fluorescencia (mean fluorescence intensity) se incrementa conforme aumenta el tiempo de exposición entre trofozoitos y *E.coli* DH5αGFP, sugiriendo que a mayor tiempo de contacto, mayor ingesta de bacterias por los trofozoitos (proceso de fagocitosis). En nuestro modelo, los trofozoitos ingieren mayor cantidad de bacterias a los 45 minutos. Cabe mencionar que no se realizaron ensayos de fagocitosis con tiempos superiores a 45 min de exposición trofozoito/*E.coli* debido a que en la literatura se reporta que transcurrido este tiempo, las partículas proteicas contenidas en las vacuolas fagocíticas comienzan ser degradadas con mayor eficiencia (Okada y Nozaki, 2006).

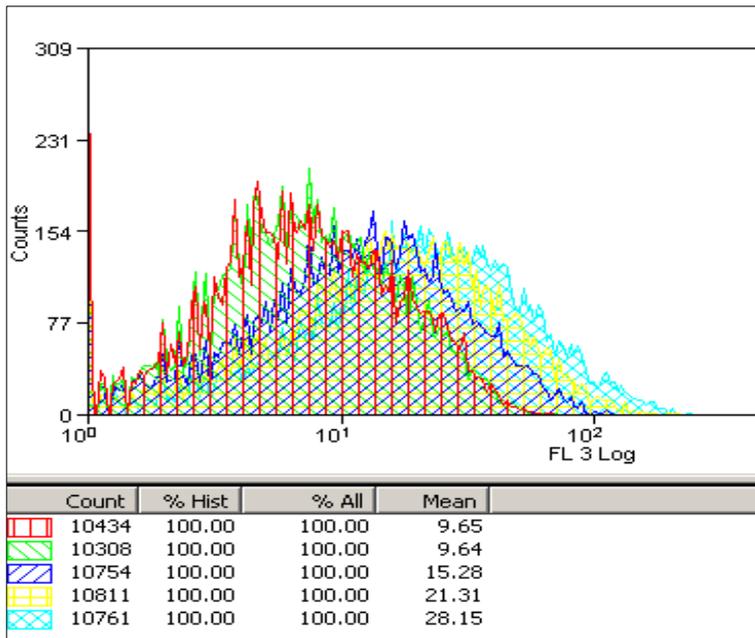


Figura 8. Estandarización del ensayo de fagocitosis de bacterias. Los tiempos y las condiciones son:
 ◇ *E. histolytica*, ◇ *E. histolytica-E.coli* DH5α puestas en contacto 45 min,
 ◇ *E. histolytica-E. coli* DH5α-pGFP puestas en contacto 15 min,
 ◇ *E. histolytica-E. coli* DH5α-pGFP puestas en contacto 30 min y
 ◇ *E. histolytica-E. coli* DH5α-pGFP puestas en contacto 45 min. GFP; proteína verde fluorescente. Resultados analizados en el programa Summit.

Eritrofagocitosis por trofozoitos de *E. histolytica*

Se realizó la estandarización de ingestión máxima de eritrocitos por trofozoitos de *E. histolytica* puestas en contacto con una relación de 1:50. La capacidad eritrofagocítica fue medida como la cantidad relativa de hemoglobina ingerida a diferentes tiempos de exposición. Para ello, los trofozoitos se pusieron en contacto durante 0, 15 y 30 minutos con eritrocitos humanos y el índice de fagocitosis fue el resultado de la absorbancia medida a 400nm, que es la región del espectro electromagnético donde la hemoglobina tiene un máximo pico de absorción. Como se muestra en la figura 9, el incremento de la hemoglobina ingerida se ve en aumento desde los primeros 15 min respecto a los trofozoitos que no son expuestos a eritrocitos, y parece llegar a una meseta de máxima ingestión de hemoglobina al transcurrir 45 min posterior al contacto Trofozoito-Eritrocito (Abs = 1.089)

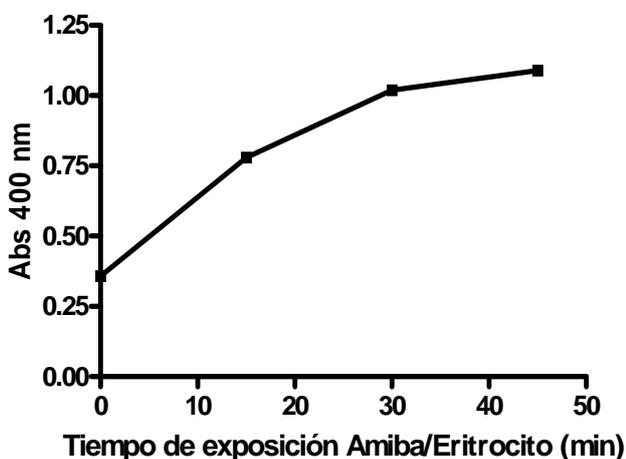


Figura 9. Estandarización del ensayo de eritrofagocitosis. En este ensayo se pusieron en contacto 50 eritrocitos por cada trofozoito durante 0, 15, 30 y 45 min. El grado de fagocitosis está definido como la absorbancia medida a 400 nm comparada con un blanco de ácido fórmico.

Diseño de los RNAi para el silenciamiento de transcritos que codifiquen para proteínas que contienen el dominio TIR

Para el diseño de los RNAi utilizamos el programa “IDT’s RNAi design” de “Integrated DNA Technologies”, el cual predice secuencias susceptibles al reconocimiento de la enzima Dicer. A partir de estos resultados se mandaron sintetizar tres secuencias de dsRNA para cada transcrito, los cuales comprenden sitios iniciales, sitios intermedios y sitios finales de los transcritos, esto, con el fin de incrementar la eficiencia de silenciamiento. Las características de cada dsRNA se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Características de los RNAi de doble cadena para el silenciamiento de los transcritos de la tiorredoxina, la GTPasa y la PATMK de *E. histolytica*.

Transcrito blanco	Sitio de silenciamiento	Secuencia y características
Tiorredoxina	Inicio	<p>5' rG rG rC rA rC rU rU rG rA rA rG rU rG rC rU rG rA rA rU rG U G T rU rA rC rC rG rU rG rA rA rC rU rC rA rC rG rA rC rU rU rA rC rA rA</p> <p>5'</p> <p>Posición sentido 123 Position antisentido: 147 Longitud sentido: 25 Longitud antisentido: 27 MW* Sentido: 7986.9 MW antisentido: 8539.1 MW total: 16526.0 Core GC%: 36.8</p>
	Medio	<p>5' rG rG rA rA rU rA rA rA rG rG rU rA rG rA rC rC rA rA rC rA A A rU rA rC rC rU rA rU rU rC rC rA rA rU rC rU rG rG rU rG rU rU rU</p> <p>5'</p> <p>Posición Sentido: 991 Posición Antisentido: 1015 Longitud Sentido: 25 Longitud Antisentido: 27 MW Sentido: 8067.0 MW Antisentido: 8447.0 MW Total: 16514.0 Core GC%: 47.4</p>
	Final	<p>5' rG rA rA rC rC rU rU rC rU rA rC rA rU rC rU rA rC rA rA rU rU T A rU rC rU rU rG rA rA rG rA rU rG rU rA rG rA rU rG rU rA rA rA rU</p> <p>5'</p> <p>Posición Sentido: 1635 Posición Antisentido: 1659 Longitud Sentido: 25 Longitud Antisentido: 27 MW Sentido: 7863.7 MW Antisentido: 8626.2 MW Total: 16490.0 Core GC%: 36.8</p>
GTPasa (Rab)	Inicio	<p>5' rC rA rU rU rG rU rG rA rA rG rC rU rG rU rG rU rA rG rU rA A A rC rA rG rU rA rA rC rA rC rU rU rC rG rA rC rA rC rA rU rC rA rU rU</p> <p>5'</p> <p>Posición Sentido: 48 Posición Antisentido: 72 Longitud Sentido: 25 Longitud Antisentido: 27 MW Sentido: 8070.9 MW Antisentido: 8457.1 MW Total: 16528.0 Core GC%: 47.4</p>
	Medio	<p>5' rC rA rA rG rG rA rC rA rU rC rA rC rU rA rU rU rA rU rG rC rU T C rC rG rU rU rC rC rU rG rU rA rG rU rG rA rA rU rA rA rU rA rC rG rA rG</p> <p>5'</p> <p>Posición Sentido: 326 Posición Antisentido: 350 Longitud Sentido: 25 Longitud Antisentido: 27 MW Sentido: 7885.8 MW Antisentido: 8617.2 MW Total: 16503.0 Core GC%: 36.8</p>

	Final	<p>5' rG rU rA rG rU rA rG rA rU rG rA rC rA rC rU rG rA rU rA rC rU rG rU C C rC rA rC rA rU rC rA rU rC rU rG rU rG rA rC rU rA rU rG rA rC rA rG 5'</p> <p>Posición Sentido: 538 Posición Antisentido: 562 Longitud Sentido: 25 Longitud Antisentido: 27 MW Sentido: 7950.8 MW Antisentido: 8577.2 MW Total: 16528.0 Core GC%: 36.8</p>
PATMK	Inicio	<p>5' rG rC rA rU rU rC rA rG rC rA rU rA rC rU rC rA rA rU A G rA rU rC rG rU rA rA rG rU rC rG rU rA rA rU rG rA rG rG rU rU rA rU rC 5'</p> <p>Posición Sentido: 116 Posición Antisentido: 140 Longitud Sentido: 25 Longitud Antisentido: 27 MW Sentido: 7821.7 MW Antisentido: 8690.3 MW Total: 16512.0 Core GC%: 36.8</p>
	Medio	<p>5' rA rG rA rA rG rA rU rG rC rA rG rA rU rG rA rA rU rU rG rU rA A T rU rU rC rU rC rU rA rC rG rU rC rU rA rC rU rA rA rA rC rA rA rU rA 5'</p> <p>Posición Sentido: 1996 Posición Antisentido: 2020 Longitud Sentido: 25 Longitud Antisentido: 27 MW Sentido: 7991.8 MW Antisentido: 8538.2 MW Total: 16530.0 Core GC%: 42.1</p>
	Final	<p>5' rG rA rC rA rC rA rG rC rA rG rU rC rA rA rG rA rA rG rU rU T A rU rA rC rU rG rU rC rG rU rC rA rG rU rC rU rU rU rC rA rA rU 5'</p> <p>Posición Sentido: 3062 Posición Antisentido: 3086 Longitud Sentido: 25 Longitud Antisentido: 27 MW Sentido: 8117.0 MW Antisentido: 8312.9 MW Total: 16429.9 Core GC%: 31.6</p>

*MW, Tamaño molecular (nt)

Los RNAi silencian la expresión de los transcritos de las proteínas que tienen el dominio TIR

En estos ensayos utilizamos la técnica de “soaking”, la cual consiste en adicionar los RNAi de doble cadena esperando que, por medio de los mecanismos de RNAi innatos de los organismos eucariontes, disminuyan los transcritos de las secuencias para los cuales los RNAi fueron diseñados. Como se observa en las figuras 10a y 10b, el número de amplificadores de cada secuencia control (los cuales generamos usando iniciadores de PCR para secuencias diferentes a las de los genes en estudio), se mantiene constante, mientras que los amplificadores de las secuencias a las que se les inhibió la expresión de sus transcritos se encuentran disminuidos. Como se muestra en la tabla 3, la expresión de los transcritos de la PATMK; disminuye aproximadamente el 18% con los RNAi específicos de la PATMK, la expresión de los transcritos de la tiorredoxina disminuyen en un 60 % cuando se utilizan sus RNAi específicos, y los transcritos de la GTPasa disminuyen en un 33% cuando se inhiben sus transcritos. Cabe mencionar que los amplificadores controles no muestran

diferencias en la expresión de sus transcritos cuando no se emplean RNAi específicos diferentes para estos transcritos.

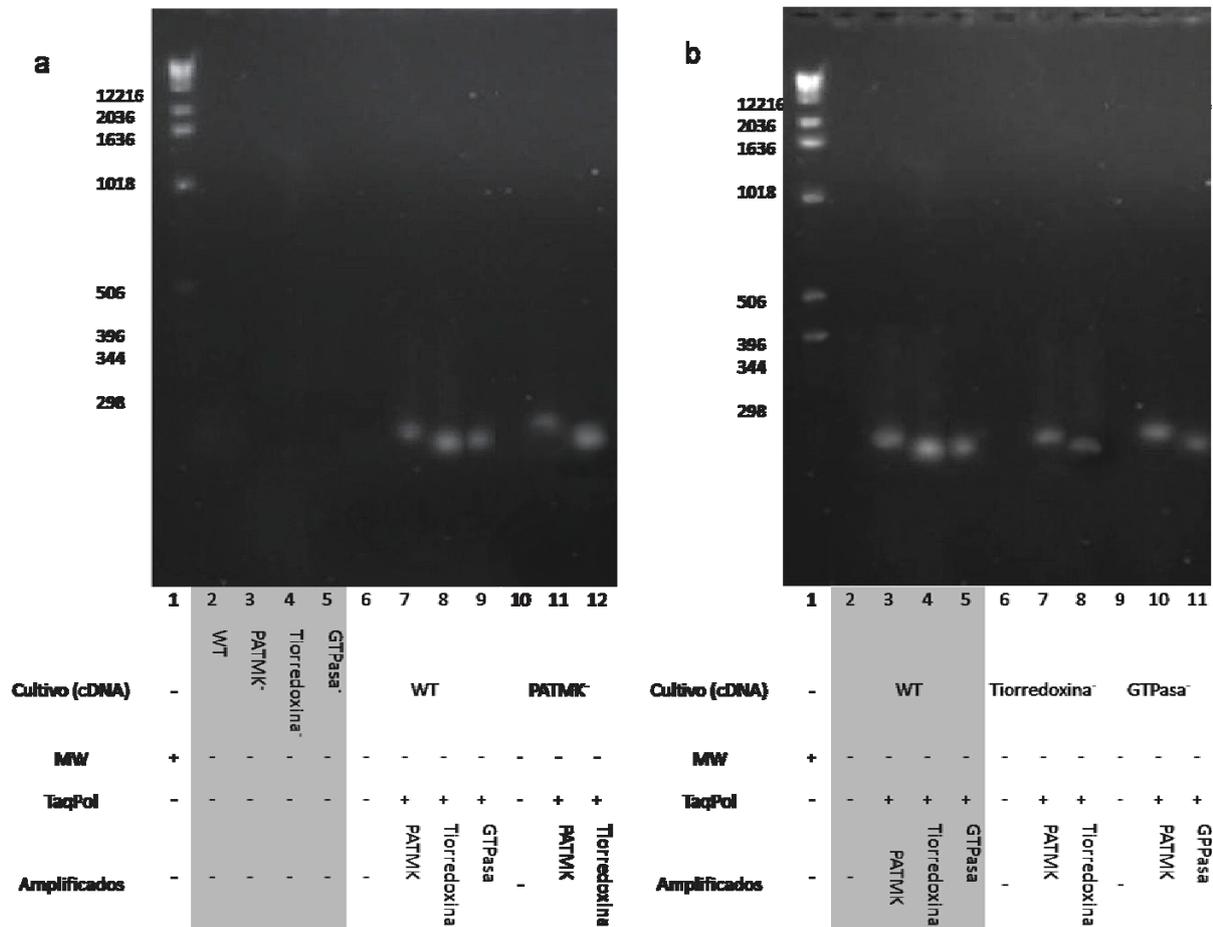


Figura 10. Los RNAi de doble cadena disminuyen la expresión de los transcritos de PATMK, la tiorredoxina y la GTPasa de manera específica. Los electroferogramas muestran el resultado de la inhibición de los transcritos por medio de RNAi de doble cadena por el método de “soaking”. a) Los carriles 6-9 exponen los niveles normales de los transcritos de PATMK, la tiorredoxina y la GTPasa (cultivo WT); los carriles 10-12 muestran los niveles de los transcritos de PATMK y la tiorredoxina, respectivamente, del cultivo PATMK⁻. b) los carriles 2-5 representan los niveles normales de los transcritos de PATMK, la tiorredoxina y la GTPasa; los carriles 6-8 muestran los niveles de los transcritos de PATMK y de la tiorredoxina, en el cultivo Tiorredoxina⁻; los carriles 9-11 exponen los niveles de los transcritos de PATMK y la GTPasa usando en el cultivo GTPasa⁻.

Tabla 3. Niveles de silenciamiento de los transcritos de la tiorredoxina, la GTPasa y la PATMK de *E. histolytica*, por el uso de RNAi de doble cadena.

Cultivo	Secuencias amplificadas		
	PATMK	Tiorredoxina	GTPasa
WT	100.0	100.0	100.0
PATMK ⁻	82.5	96.3	-
Tiorredoxina ⁻	100.8	40.5	-
GTPasa ⁻	96.3	-	77.7

La inhibición de la expresión de los transcritos de la tiorredoxina y la GTPasa favorecen la fagocitosis de *E. coli* por *E. histolytica*

Una vez demostrado la funcionalidad del sistema de inhibición de los transcritos seleccionados, se realizaron los ensayos de fagocitosis de bacterias. De acuerdo a lo que se muestra en la figura 11a, la inhibición de los transcritos de las proteínas PATMK, la tiorredoxina y la GTPasa favorecen el proceso de fagocitosis de *E. coli*, ya que el índice de fagocitosis (valores normalizados de la intensidad media de fluorescencia respecto a la autofluorescencia de los trofozoitos) tienden a aumentar en todas las condiciones respecto a la condición normal de fagocitosis, pero únicamente la inhibición de los transcritos de la tiorredoxina muestran valores estadísticamente significativos (índice de fagocitosis: WT, 2.693 ± 0.2492 , vs PATMK⁻, 2.906 ± 0.3202 , vs Tiorredoxina⁻, 3.183 ± 0.2518 , vs GTPasa⁻, 2.894 ± 0.1583). Con lo anterior, se observa que cuando se silencian los transcritos de la tiorredoxina se obtiene el mayor índice de fagocitosis, seguido de la GTPasa y de la PATMK.

La inhibición de la expresión de los transcritos de la tiorredoxina y la GTPasa favorecen la fagocitosis de eritrocitos por *E. histolytica*

Además de los ensayos de fagocitosis de bacterias con la inhibición de la expresión de transcritos, tanto de la tiorredoxina y la GTPasa, se realizaron ensayos de fagocitosis de eritrocitos en las mismas condiciones. Se observó que el silenciamiento de la PATMK inhibe la fagocitosis de eritrocitos (Índice de fagocitosis: WT, 1.000 ± 0.013 , vs PATMK⁻, 0.910 ± 0.015). A diferencia del resultado anterior y al igual que en el ensayo de fagocitosis de bacterias, el silenciamiento de los transcritos de la tiorredoxina y de la GTPasa favorecen la fagocitosis de eritrocitos (Índice de fagocitosis: WT, 1.000 ± 0.013 , vs Tiorredoxina⁻, 1.052 ± 0.029 , vs GTPasa⁻, 1.042 ± 0.014) (Figura 11b).

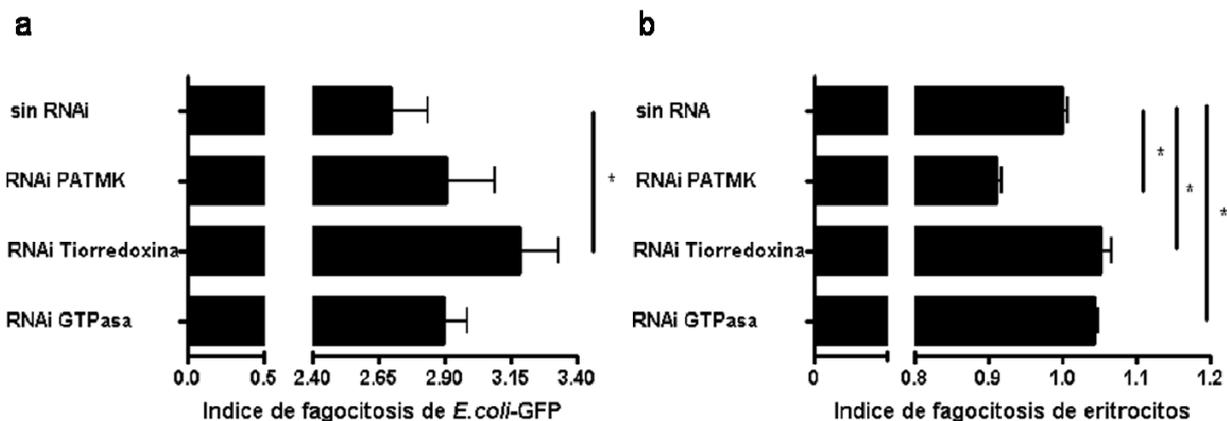


Figura 11. El silenciamiento de la expresión de tiorredoxina y GTPasa favorece la fagocitosis. Para observar la funcionalidad de las proteínas tiorredoxina y GTPasa, se silenció la expresión de los transcritos de dichas proteínas por el método de “soaking”. 200 000 trofozoitos fueron expuestos a 10 µg/mL de cada RNAi de doble cadena específicos para los transcritos de PATMK, la tiorredoxina y la GTPasa durante 20 horas y se realizaron los ensayos de fagocitosis de a) *E. coli*-GFP (datos normalizados a la MIF de los trofozoitos) y b) eritrocitos (datos normalizados a la absorbancia emitida a 400nm de la condición sin silenciamiento de transcritos). Los datos fueron analizados por la prueba de ANOVA de una cola con postprueba de Kruskal-Wallis. $P < 0.05$.

DISCUSIÓN

Por medio de los análisis *in silico*, el campo de la biología molecular ha podido crear diversas estrategias bioinformáticas, por medio de las cuales, los procesos biológicos pueden ser comprendidos, predichos y optimizados, con el fin de desarrollar conocimiento y resolver problemas en las áreas de la biología y de la medicina. En este trabajo se han empleado múltiples estrategias bioinformáticas para la búsqueda de moléculas que presenten estructuras (dominios proteicos) comunes entre los organismos, que se piensa participan en muchos procesos celulares filogenéticamente conservados entre especies de diversos reinos. La estructura aquí estudiada fue el dominio TIR, el cual está compuesto por aproximadamente 200 aminoácidos que forman 5 cadenas β -plegadas rodeadas por 5 α -hélices (Xu *et al.*, 2000). Tanto en animales como en plantas y en la ameba de vida libre *Dictyostelium discoideum* se ha encontrado que TIR participa en diversos procesos celulares, destacando los procesos de defensa contra agentes patógenos (Nurnberger *et al.*, 2004; Akira *et al.*, 2006; Burch-Smith *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Sillo *et al.*, 2008) y fagocitosis. La pregunta entonces fue si podría este dominio expresarse en organismos progenitores a los animales, como lo es *Entamoeba histolytica* que se encuentra filogenéticamente relacionada con *D. discoideum*.

Como se mencionó anteriormente, una de las dificultades para buscar este dominio, es la baja conservación de la estructura modelo del dominio TIR, ya que sus mayores sitios de conservación se encuentran localizados en tres sitios cortos que presentan un alto grado de entropía, es decir, la frecuencia de aparición de un aminoácido en una posición específica es baja (Figura 4). Esto parece estar asociado a la amplia distribución del dominio entre los organismos eucarióticos, los cuales, como se sabe, han pasado por diversos cambios evolutivos, y por lo tanto sufrieron múltiples cambios en la información genética, cambios que se ven reflejados en las diferencias de la composición en las secuencias de aminoácidos de las proteínas. Esta es una razón por la que se dificulta la comparación de secuencias peptídicas de organismos filogenéticamente distantes, como lo son los metazoa y los protozoarios. Adicionalmente, existen diversas bases de datos en las cuales se almacena una amplia cantidad de secuencias de nucleótidos y de proteínas; sin embargo, muy pocas de estas bases de datos cuentan con la existencia de una extensa colección de secuencias que, pueden incluso no representar en muchas ocasiones el genoma o proteoma íntegro de una especie. En el caso de *E. histolytica*, que durante años ha padecido de la falta de interés en este campo de estudio, se dispone de fragmentos aislados, lo que dificulta realizar estudios *in silico* de este organismo. Con todo esto, la búsqueda de proteínas que presentaran el dominio TIR se tornó difícil, ya que de las

múltiples bases de datos que se encuentran en línea de acceso libre, solo la base de datos del NCBI, la base de datos del instituto Sanger y la base de datos del servidor Pathema del instituto Craig Venter, ofrecen la posibilidad de interactuar eficazmente con las secuencias contenidas. Por otro lado, tanto el número, como las secuencias presentes, difiere entre las bases de datos que se utilizaron (cada una posee aproximadamente 15 000 secuencias), ya que en gran medida, las secuencias que suelen estar presentes son de carácter predictivo y son el resultado de la secuenciación de genomas completos de los organismos, donde las instituciones que realizan estas predicciones suelen utilizar diferentes algoritmos computacionales. Entonces, si se usan algoritmos bioinformáticos diferentes para la búsqueda de secuencias se obtienen también resultados poco similares dichas las diferentes bases de datos.

Una vez que se seleccionó la forma de analizar las secuencias contenidas en las bases de datos, ya sea por la localización en las redes de comunicación global o la descarga de las mismas, se usaron cuatro estrategias bioinformáticas que suelen utilizarse en la detección de secuencias homólogas (Karlin y Altschul, 1993; Altschul *et al*, 1997; Eddy, 2004). Estas estrategias se basan en el alineamiento de cada una de las secuencias contenidas en la base de datos con la secuencia de búsqueda, y posteriormente este alineamiento es evaluado estadísticamente para determinar si las secuencias pueden ser consideradas homólogas. El uso de PSI-BLAST no mostró resultados significativos ($E > 0.01$) en la búsqueda de secuencias homólogas, debido a la baja conservación de la estructura del dominio TIR. Entonces, los programas que permitieron la detección de secuencias poco conservadas, fue a través de técnicas bayesianas y a través del uso de modelos ocultos de Markov.

A diferencia de los algoritmos de búsqueda de secuencias que emplea BLAST, el cual usa un limitado repertorio de matrices puntuación, las técnicas bayesianas permiten usar diversas matrices de puntuación con la expectativa de que relacionen correctamente secuencias de prueba en un alineamiento dado (que puede ser un alineamiento semilla) con la matriz de sustitución que mejor describa las variaciones en la composición de aminoácidos presentes. Con esta estrategia se encontró una GTPasa de la familia Rab y una proteína hipotética en la base de datos del NCBI, de las cuales únicamente la GTPasa presenta una estructura terciaria ligeramente parecida al dominio TIR modelo del TLR2 humano (Xu *et al*, 2000). Sin embargo, al superponer las estructuras no se encontró relación alguna.

Por otro lado, con el uso de HMM se pudo detectar una tiorredoxina, una secuencia poco conservada que presenta el dominio TIR, la cual fue el resultado de una proteína homóloga a una proteína de *E. invades* detectada por HMMs. Esta proteína mostró bajos puntajes estadísticos, pero suficientes, para considerarla como proteína con un dominio TIR ($E=0.0016$). Además, la estructura terciaria mostró ser muy parecida al modelo del dominio TIR del TLR2 humano, de acuerdo al modelaje realizado con el programa Phyre, donde se observa que la superposición de las secuencias no altera la estructura primaria de la estructura modelo (Figura 5). El programa PHYRE (*Protein Homology/analogy Recognition Engine*), desarrollado por *The Imperial College of London*, permite obtener un modelo de la estructura tridimensional de una proteína en base en el reconocimiento de secuencias homólogas y análogas con las proteínas de las bases de datos (Kelley y Sternberg, 2009). Además, este programa muestra modelos de estructuras tridimensionales a los cuales la secuencia de búsqueda puede ser relacionada. Sin embargo, con esta herramienta no se detectó algún modelo que se pareciera al dominio TIR en relación a la tiorredoxina.

Una vez detectada la presencia de estas proteínas que poseen el dominio TIR en *E. histolytica*, se decidió buscar su intervención en los mecanismos de fagocitosis, debido a que en los organismos superiores pertenecientes al grupo de los metazoa, y en *Dictyostelium discoideum*, se ha observado la participación de este dominio en la iniciación de las vías de señalización que llevan a la activación de proteínas adaptadoras-efectoras, y con ella a la preparación de las células para endocitar a las partículas reconocidas para tal efecto (Greenberg y Grinstein, 2002; Polentarutti *et al.*, 2003; Wald *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2007).

Como un primer acercamiento para averiguar si las proteínas con el dominio TIR de *E. histolytica* están implicadas en los mecanismos de fagocitosis, se realizó una búsqueda en la literatura acerca de la participación de estas proteínas en dicho proceso. A la GTPasa de la familia Rab, se le han atribuido funciones de señalización en diversos procesos celulares, pero relacionado con la fagocitosis muestra un papel importante en el tráfico de vesículas y el rearrreglo del citoesqueleto (Baxt y Singh, 2008; Clark *et al.*, 2007). Por otro lado, la tiorredoxina estaba considerada como una proteína de carácter hipotética, de la cual, en este trabajo se ha comprobado la existencia de sus RNA mensajeros (Figura 7). A otras proteínas a las que se les ha descrito actividad como tiorredoxina en *E. histolytica*, y son homólogas a la tiorredoxina con el dominio TIR, se les ha atribuido participación en la reducción del peróxido de hidrógeno dependiente de NADPH como un sistema de destoxicación (Arias *et al.*, 2007). Sin embargo, la región correspondiente a la actividad

de tiorredoxina, con la que comparte secuencias homólogas con otras tiorredoxinas, no forma parte de la región en que se localizó el dominio TIR.

Para evaluar la participación de estas proteínas en el proceso de fagocitosis, se escogió un modelo en el que se pudieran inhibir los transcritos de manera específica. Revisando en la literatura, la principal estrategia que se ha utilizado para el silenciamiento de genes en *E. histolytica* es la inserción de vectores que expresen RNAs de interferencia. Un ejemplo de esto, es el caso del silenciamiento del gen que codifica para la cinasa transmembranal asociada al fagosoma (PATMK, por sus siglas en inglés). Este sistema estuvo basado en la inserción de un elemento episomal que conduce a la expresión de RNAs cortos (de horquilla), los cuales son similares en estructura y función a los pequeños RNAs de interferencia (Boettner *et al.*, 2008; Linford *et al.*, 2009). Lo que se observó fue la participación de PATMK en la iniciación del reconocimiento de eritrocitos en los mecanismos de fagocitosis. Sin embargo, el uso de vectores de clonación para la expresión de genes, a veces suele causar citotoxicidad a los organismos a los que se les introduce, ya sea por el mismo vector o los productos de expresión, o por la baja efectividad de los mecanismos de silenciamiento seleccionados y dificultades en el mantenimiento de cepas estables que mantengan el vector (Cottrell y Doering, 2003; Robinson y Beverley, 2003).

Por otro lado, se ha descrito una poderosa herramienta para el silenciamiento de genes denominada “soaking”, la cual consiste en adicionar a los medios de cultivo pequeños RNAs de interferencia de doble cadena que miden entre 21 y 25 pb, esto con el fin de esperar que las secuencias difundan al citoplasma, y por medio de los mecanismos naturales de silenciamiento de los organismos eucariontes, que involucran el reconocimiento y activación por la enzima Dicer, y utilizados por el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés), se espera que los RNAm para los cuales los RNAi fueron diseñados sean degradados, evitando así la traducción de los mismos (Vayssie *et al.*, 2004).

Con estos antecedentes se decidió utilizar este sistema de silenciamiento para los transcritos que codifican para la tiorredoxina y la GTPasa, en el que se emplearon RNAi sintéticos de doble cadena, tres para cada secuencia, incluyendo el control positivo de silenciamiento para PATMK. El objetivo de utilizar tres secuencias para cada transcrito fue aumentar la eficiencia de silenciamiento, los cuales están diseñados para hibridar específicamente en los sitios localizados en la parte inicial, media y final de las regiones de los transcritos que codifican para el dominio TIR. De esta manera se

pudo evaluar la participación de las proteínas con dominio TIR en la fagocitosis, tanto de bacterias como de eritrocitos por *E. histolytica*.

Como se observó en la figura 10 y tabla 3, los niveles de expresión de los transcritos, tanto de PATMK, la tiorredoxina y la GTPasa disminuyeron la cantidad de transcritos basales de manera específica en 18, 60 y 33%, respectivamente, evidenciando de esta manera la utilidad de este sistema para el silenciamiento de transcritos, así como esta reportado este sistema en el silenciamiento de la gamma-tubulina (Vayssie *et al.*, 2004).

Al someter a los trofozoitos a los ensayos de fagocitosis observamos que las amibas de los cultivos Tiorredoxina⁻ y GTPasa⁻, adquirieron la capacidad de ingerir mayor cantidad, tanto de *E. coli* (debido al aumento de la MIF respecto a la autofluorescencia de los trofozoitos), como de eritrocitos (por incremento en la absorbancia a 400nm) (Figura 11). En ambos ensayos, el efecto mayor se observa en el caso de la tiorredoxina, lo cual concuerda por el mayor grado de inhibición de los transcritos de la tiorredoxina por RNAi. Este hallazgo podría sugerir que los mecanismos por los cuales estas proteínas están involucradas en la fagocitosis, son mecanismos de regulación negativa, lo cual es un resultado que no se esperaba, ya que en la mayoría de los reportes, tanto de animales y *D. discoideum*, las proteínas con el dominio TIR promueven el proceso de fagocitosis (regulación positiva). Sin embargo, en el caso de los mamíferos, las proteínas con dominio TIR también pueden regular negativamente la señalización mediada por interacciones TIR:TIR, como es el caso del receptor relacionado a IL-1 de dominio único de inmunoglobulina Ig con los TLRs (SIGIRR, por sus siglas en inglés) (Polentarutti *et al.*, 2003; Wald *et al.*, 2003). Otras explicaciones alternativas a estos resultados son:

- a) No se encontraron proteínas con el dominio TIR que favorezcan el proceso de fagocitosis, y que aún así estén presentes en la maquinaria que regula la fagocitosis.
- b) los bajos puntajes obtenidos en la búsqueda del dominio TIR *in silico*, pudieran no ser lo suficientemente adecuados para considerar las estructuras encontradas dentro de este grupo de secuencias, ya que no se han descrito proteínas homólogas a las proteínas que se utilizaron, con actividad de tiorredoxina y GTPasa, que funcionen de la misma manera en que funcionen las proteínas con el dominio TIR, es decir, a través de interacciones homotrópicas (TIR:TIR).
- c) las proteínas encontradas tienen la función de regular negativamente la fagocitosis, sin implicar al dominio TIR de las proteínas en estos mecanismos de señalización.

d) su presencia esta asociada a otros procesos celulares, como por ejemplo, la muerte celular programada o en el metabolismo de ácidos nucleicos, como lo es para las bacterias, las cuales también suelen presentar el dominio TIR (Iyer *et al.*, 2008; Spear *et al.*, 2009).

Por otro lado, una observación muy importante de este trabajo es el resultado obtenido del silenciamiento de PATMK en los ensayos de fagocitosis. Nosotros observamos que la disminución de la expresión de los transcritos de PATMK, desfavorecen el proceso de fagocitosis de eritrocitos, respecto a la condición de fagocitosis de trofozoitos silvestres (Figura 11b), lo cual sugiere que esta proteína está implicada en los mecanismos de iniciación de fagocitosis, concordante a lo que señala la literatura (Voigt *et al.*, 1999; Boettner *et al.*, 2008). Sin embargo, cuando se realizaron los ensayos de fagocitosis de bacterias bajo las mismas condiciones, se observó que los trofozoitos de los cultivos PATMK⁻, tienden a favorecer el proceso de fagocitosis de *E. coli*, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas respecto a las condiciones de los trofozoitos silvestre. Este resultado podría sugerirnos que la PATMK únicamente está implicada en la iniciación de los mecanismos celulares que llevan a la fagocitosis de eritrocitos y no de *E. coli*.

Finalmente, los resultados del presente trabajo sugieren que *E. histolytica* posee dos proteínas que indican la presencia del dominio TIR, una GTPsasa de la familia Rab y una tiorredoxina, las cuales juegan un papel en los mecanismos de fagocitosis como reguladores negativos de este proceso.

CONCLUSIONES

1. Por medio de análisis *in silico*, se encontraron dos proteínas que presentan el dominio TIR en el proteoma de *Entamoeba histolytica*.

2. A través de RT-PCR se determinó la presencia de transcritos que expresan el dominio TIR en *E. histolytica*.

3. Se diseñaron RNAs de interferencia que inhibieron los transcritos que codifican para proteínas con el dominio TIR en cultivos axénicos de *E. histolytica*.

4. Con ayuda de los RNAs de interferencia se determinó la participación de los transcritos de las proteínas de *E. histolytica* que presentan el dominio TIR en el proceso de fagocitosis de *Escherichia coli* y de eritrocitos humanos, en el cual, dichas proteínas tienen un papel de reguladores negativos en la fagocitosis.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se realizó la búsqueda de proteínas con el dominio TIR. Encontramos dos proteínas, una GTPasa de la familia Rab y una tiorredoxina, en la colección de proteínas de las bases de datos disponibles, de las cuales se evaluó la participación de los transcritos de estas proteínas en la fagocitosis de bacterias *E. coli* y eritrocitos. Sin embargo, no se evaluó la participación del dominio en dicho proceso, por ello las perspectivas de este trabajo consisten en los siguientes puntos:

- Identificar la presencia de las proteínas en trofozoitos de *E. histolytica* y verificar la conformación de su estructura terciaria mediante cristalografía de rayos X.
- Realizar estudios que nos ayuden a evaluar la participación del dominio TIR de las proteínas utilizadas en este trabajo, como puede ser la mutagénesis dirigida.
- Evaluar la participación de estas proteínas, específicamente del dominio TIR, en otros procesos celulares, como por ejemplo, la muerte celular programada y el metabolismo de ácidos nucleicos.
- Determinar si estas proteínas pudieran servir como blanco terapéuticos en la amibiasis.

BIBLIOGRAFÍA

- Ackers J.P. and Mirelman D.. 2006. Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr.Opin.Microbiol.* 9:367-373.
- Adedayo O. and Nasiiro R.. 2004. Intestinal parasitoses. *J Natl.Med Assoc.* 96:93-96.
- Aderem A. and Underhill D.M. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol* 17:593-623.
- Akira S., Uematsu S. and Takeuchi S.. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124:783-801.
- Altschul S.F., Madden T.M., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z, , Miller W., and Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
- Anderson K.V., Bokla L., and Nusslein-Volhard C. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42:791-798.
- Andra J., Herbst R., and Leippe M.. 2003. Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. *Dev. Comp. Immunol.* 27:291–304.
- Arias D.G., Gutierrez C.E., Iglesias A.A. and Guerrero S.A. 2007. Thioredoxin-linked metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Free Radical Biol. Med.* 42:1496-1505
- Avila E.E. and Calderon J.. 1993. *Entamoeba histolytica* trophozoites: a surface-associated cysteine protease. *Exp.Parasitol.* 76:232-241.
- Baxt L.A. and Singh U.. 2008 New insights into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr.Opin.Infect.Dis.* 21:489-494.
- Berninghausen O. and Leippe M.. 1997. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun.* 65:3615-3621.
- Bernstein E., Caudy A., Hammond S. and Hannon G.. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 409:363-366.
- Binder M., Ortner S., Erben H., Scheiner O., Wiedermann O., Valenta R. and Duchene M.. 1995. The basic isoform of profilin in pathogenic *Entamoeba histolytica*. cDNA cloning, heterologous expression, and actin-binding properties. *Eur. J. Biochem.* 233:976-981.
- Blander J.M. and Medzhitov R.. 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science.* 304:1014-1018.
- Boettner D.R., Huston C.D., Sullivan J.A. and Petri W.A., Jr. 2005. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* utilize externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of erythrocytes. *Infect Immun.* 73:3422-3430.

- Boettner D.R., Huston C.D., Linford A.S., Buss S.N., Houpt E., Sherman N.E., Petri W.A., Jr. 2008. *Entamoeba histolytica* phagocytosis of human erythrocytes involves PATMK, a member of the transmembrane kinase family. *PLoS Pathog.* 4:e8.
- Bracha R., Kobilier D., and Mirelman D. 1982. Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun.* 36:396-406.
- Bruchhaus I., Jacobs T., Leippe M., and Tannich E. 1996. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol Microbiol.* 22:255-263.
- Burch-Smith T.M., Schiff M., Caplan J.L., Tsao J., Czymmek K. and Dinesh-Kumar S.P.. 2007. A novel role for the TIR domain in association with pathogen-derived elicitors. *PLoS.Biol.* 5:68.
- Burch-Smith T.M. and Dinesh-Kumar S.P.. 2007. The Functions of Plant TIR Domains. *Sci. STKE.* 401:46.
- Chan S.L., Mukasa T., Santelli E., Low L.Y., and Pascual J.. 2009. The crystal structure of a TIR domain from *Arabidopsis thaliana* reveals a conserved helical region unique to plants. *Protein Sci.* Epub ahead of print.
- Chen G., Zhuchenko O., and Kuspa A.. 2007. Immune-like Phagocyte Activity in the Social Amoeba. *Science.* 317:678-681.
- Chisholm R.L. and Firtel R.A.. 2004. Insights into morphogenesis from a simple developmental system. *Nat Rev.Mol Cell Biol.* 5:531-541.
- Clark.C.G., Alsmark U.C., Tazreiter M., Saito-Nakano Y., Ali V., Marion S., Weber C., Mukherjee C., Bruchhaus I., Tannich E., Leippe M., Sicheritz-Ponten T., Foster P.G., Samuelson J., Noel C.J., Hirt R.P., Embley T.M., Gilchrist C.A., Mann B.J., Singh U., Ackers J.P., Bhattacharya S., Bhattacharya A., Lohia A., Guillen N., Duchene M., Nozaki T., and Hall N.. 2007. Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Adv.Parasitol.* 65:51-190.
- Cottrell T.R. and Doering T.L.. 2003. Silence of the strands: RNA interference in eukaryotic pathogens. *Trends Microbiol.* 11:37-43.
- Diamond L.S.. 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science.* 134: 336-337.
- Eddy S.R.. 2004. What is a hidden Markov model? *Nat.Biotechnol.* 22: 1315-1316.
- Eichinger L., and Noegel A.A.. 2005. Comparative genomics of *Dictyostelium discoideum* and *Entamoeba histolytica*. *Curr.Opin.Microbiol.* 8:606-611.
- Espinosa-Cantellano M., and Martinez-Palomo A.. 1991. The plasma membrane of *Entamoeba histolytica*: structure and dynamics. *Biol.Cell* 72:189-200.
- Espinosa-Cantellano M., and Martinez-Palomo A.. 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin.Microbiol.Rev.* 13:318-331.
- Eulgem T.. 2005. Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Sci.* 10:71-78.
- Gay N.J., and Keith F.J.. 1991. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature.* 351:355-356.

- Ghosh S., Field J., Rogers R., Hickman M., Samuelson J.. 2000. The *Entamoeba histolytica* mitochondrion-derived organelle (Crypton) contains double-stranded DNA and appears to be bound by a double membrane. *Infect. Immun.* 68:4319-4322.
- Greenberg S., and Grinstein S.. 2002. Phagocytosis and innate immunity. *Curr.Opin.Immunol* 14:136-145.
- Guillén N.. 1996. Role of signaling and cytoskeletal rearrangements in the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Trends Microbiol.* 4:191-197
- Guzman-Medrano R., Castillo-Juarez B.A., Garcia-Perez R.M., Salas-Casas A., Orozco E., and Rodriguez M.A.. 2005. *Entamoeba histolytica*: alterations in EhRabB protein in a phagocytosis deficient mutant correlate with the *Entamoeba dispar* RabB sequence. *Exp.Parasitol.* 110:259-264.
- Haque R., Huston C.D., Hughes M., Houpt E., and Petri W.A., Jr. 2003. Amebiasis. *N.Engl.J Med.* 348:1565-1573.
- Higgs H., N. and Pollard T.D.. 2001. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu. Rev Biochem.* 70:649-676.
- Honda, A., Nogami M., Yokozeki T., Yamazaki M., Nakamura H., Watanabe H., Kawamoto K., Nakayama K., Morris A.J., Frohman M.A., and Kanaho Y.. 1999. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell.* 99:521-532.
- Huston C.D., Boettner D.R., Miller-Sims V., and Petri W.A., Jr. 2003. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity.* 71:964-972.
- Huston,C.D., Houpt E.R., Mann B.J., Hahn C.S., and Petri, W.A., Jr. 2000. Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol.* 2:617-625.
- Isibasi A., Santa C.M., Montano-Soto X., Ramirez A., and Kumate J.. 1982. Localization of a lipopeptidophosphoglycan extracted by phenol-water from trophozoites of the HK-9 strain of *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med.(Mex)* 13 Suppl 3:57-62.
- Iyer L.M., Abhiman S., and Aravind L.. 2008. MutL homologs in restriction-modification systems and the origin of eukaryotic MORC ATPases. *Biol.Direct.* 3:8.
- Jacobs T., Bruchhaus I., Dandekar T., Tannich E., and Leippe M.. 1998. Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol.* 27:269-276.
- Janmey P.A.. 1994. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu. Rev Physiol* 56:169-191.
- Jutras I. and Desjardins M.. 2005. Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 21:511-527.
- Kalman D., Weiner O.D., Goosney D.L., Sedat J.W., Finlay B.B., Abo A., and Bishop J.M.. 1999. Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. *Nat Cell Biol.* 1:389-391.

- Karlin S. and Altschul S.F.. 1993. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:5873-5877.
- Kelley L.A., and Sternberg M.J.. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc.* 4:363-371.
- Kimbrell D.A and Beutler B.. 2001. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet* 2:256-267.
- Krogh A.. 1998. An Introduction to Hidden Markov Models for Biological. *Elsevier*, Edited by S. L. Salzberg, D. B. Searls and S. Kasif, pp: 45-63.
- Lanzetti L.. 2007. Actin in membrane trafficking. *Curr.Opin.Cell Biol.* 19:453-458.
- Leippe M.. 1997. Amoebapores. *Parasitol.Today.* 13:178-183.
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., and Hoffmann J.A.. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
- Leroy A., De Bruyne G., Mareel M., Nokkaew C., Bailey G., and Nelis. H.. 1995. Contact-dependent transfer of the galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica* to the lateral surface of enterocytes in culture. *Infect. Immun.* 63:4253-4260.
- Leslie M.. 2007. IMMUNOLOGY: A Slimy Start for Immunity? *Science.* 317:584.
- Li E., Stenson W.F., Kunz-Jenkins C., Swanson P.E., Duncan E., and Stanley S.L., Jr. 1994. *Entamoeba histolytica* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *Infect.Immun.* 62:5112-5119.
- Linford A.S., Moreno H., Good K.R., Zhang H., Singh U., and Petri W.A., Jr. 2009. Short hairpin RNA-mediated knockdown of protein expression in *Entamoeba histolytica*. *BMC Microbiol.* 9:38.
- Maldonado C., Trejo W., Ramirez A., Carrera M., Sanchez J., Lopez-Macias C., and Isibasi A.. 2000. Lipophosphopeptidoglycan of *Entamoeba histolytica* induces an antiinflammatory innate immune response and downregulation of toll-like receptor 2 (TLR-2) gene expression in human monocytes. *Arch Med.Res* 31:S71-S73.
- Marion S., Laurent C., and Guillen N.. 2005. Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cell Microbiol.* 7:1504-1518.
- Martin G.B., Bogdanove A.J., and Sessa G.. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu.Rev.Plant Biol.* 54:23-61.
- May R.C. and Machesky L.M.. 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J.Cell Sci.* 114:1061-1077.
- Medzhitov R. and Janeway C.A., Jr. 1998. Self-defense: the fruit fly style. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 429-430.
- Meza I., Sabanero M., Cazares F., Bryan J.. 1983. Isolation and characterization of actin from *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 258:3936-3941

- Nurnberger T., Brunner F., Kemmerling B., and Piater L.. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev.* 198:249-66.:249-266.
- Okada M., and Nozaki T.. 2006. New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Arch. Med Res.* 37:244-252.
- Orozco E., Gharaibeh R., Riveron A.M., Delgadillo D.M., Mercado M., Sanchez T., Gomez-Conde E., Vargas M.A., Lopez-Revilla R.. 1997. A novel cytoplasmic structure containing DNA networks in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Mol. Gen. Genet.* 254:250-257
- Oshiumi H., Matsumoto M., Funami K., Akazawa T., and Seya T.. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4:161-167.
- Okada M. and Nozaki T.. 2006. New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Arch. Med Res.* 37:244-252.
- Perreault N., Herring-Gillam F.E., Desloges N., Belanger I., Pageot L.P., and Beaulieu J.F.. 1998. Epithelial vs mesenchymal contribution to the extracellular matrix in the human intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248:121-126.
- Petri W.A., Jr, and Schnaar R.L.. 1995. Purification and characterization of galactose- and N-acetylgalactosamine-specific adhesin lectin of *Entamoeba histolytica*. *Methods Enzymol.* 253:98-104.:98-104.
- Pinheiro S.M.B., Carneiro R.M., ACA I.S., Irmao J.I., Morais M.A., Jr., Coimbra M.R.M., and Carvalho L.B., Jr. 2004. Determination of the prevalence of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in the pernambuco state of northeastern brazil by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 70:221-224.
- Pinilla A.E., Lopez M.C., and Viasus D.F.. 2008. History of the *Entamoeba histolytica* protozoan. *Rev. Med Chil.* 136:118-124.
- Polentarutti N., Rol G.P., Muzio M., Bosisio D., Camnasio M., Riva F., Zoja C., Benigni A., Tomasoni S., Vecchi A., Garlanda C., and Mantovani A.. 2003. Unique pattern of expression and inhibition of IL-1 signaling by the IL-1 receptor family member TIR8/SIGIRR. *Eur Cytokine Netw.* 14:211-218.
- Qualmann B. and Mellor H. 2003. Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases. *Biochem.J.* 371:233-241.
- Que X., Brinen L.S., Perkins P., Herdman S., Hirata K., Torian B.E., Rubin H., McKerrow J.H., and Reed S.L.. 2002. Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119:23-32.
- Ravdin J.I. and Guerrant R.L.. 1981. Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J Clin. Invest.* 68:1305-1313.
- Ravdin J.I., Moreau F., Sullivan J.A., Petri W.A., Jr., and Mandell G.L.. 1988. Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 56:1505-1512.

- Reed S.L., Keene W.E., and McKerrow J.H.. 1989a. Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Clin.Microbiol.* 27:2772-2777.
- Reed S.L., Keene W.E., McKerrow J.H., and Gigli I.. 1989b. Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Immunol.* 143:189-195.
- Robinson K.A., and Beverley S.M.. 2003. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 128:217-228.
- Scholze H., and Schulte W.. 1988. On the specificity of a cysteine proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Biomed.Biochim.Acta.* 47:115-123.
- Scholze H., and Tannich E.. 1994. Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica*. *Methods Enzymol.* 244:512-23.:512-523.
- Schooley K., Zhu P., Dower S.K., and Qwarnstrom E.E.. 2003. Regulation of nuclear translocation of nuclear factor-kappaB relA: evidence for complex dynamics at the single-cell level. *Biochem.J.* 369:331-339.
- Schulte W., and Scholze H.. 1989. Action of the major protease from *Entamoeba histolytica* on proteins of the extracellular matrix. *J Protozool.* 36:538-543.
- Serrano-Luna J.J., Negrete E., Reyes M., and de la Garza G.M.. 1998. *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS: hemoglobin-degrading neutral cysteine proteases. *Exp.Parasitol.* 89:71-77.
- Shen Q.H., Saijo Y., Mauch S., Biskup C., Bieri S., Keller B., Seki H., Ulker B., Somssich I.E., and Schulze-Lefert P.. 2007. Nuclear Activity of MLA Immune Receptors Links Isolate-Specific and Basal Disease-Resistance Responses. *Science.* 315:1098-1103.
- Sillo A., Bloomfield G., Balest A., Balbo A., Pergolizzi B., Peracino B., Skelton J., Ivens A., and Bozzaro S. Genome-wide transcriptional changes induced by phagocytosis or growth on bacteria in *Dictyostelium*. *BMC.Genomics* 9:291, 2008.
- Slack J.L., Schooley K., Bonnert T.P., Mitcham J.L., Qwarnstrom E.E., Sims J.E., and Dower S.K.. 2000. Identification of Two Major Sites in the Type I Interleukin-1 Receptor Cytoplasmic Region Responsible for Coupling to Pro-inflammatory Signaling Pathways. *J Biol Chem.* 275:4670-4678.
- Song J., Xu Q., Olsen R., Loomis W.F., Shaulsky G., Kuspa A., and Sugang R.. 2005. Comparing the *Dictyostelium* and *Entamoeba* genomes reveals an ancient split in the Conosa lineage. *PLoS.Comput.Biol.* 1:e71.
- Spear A.M., Loman N.J., Atkins H.S., and Pallen M.J.. 2009. Microbial TIR domains: not necessarily agents of subversion? *Trends Microbiol.* 17:393-398.
- Stanley S.L., Jr. 2003. Amoebiasis. *Lancet.* 361:1025-1034.
- Stanley S.L., Jr., Huizenga H., and Li. E. 1992. Isolation and partial characterization of a surface glycoconjugate of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem.Parasitol.* 50:127-138.
- Sterling Ch.R., Adam R.D.. 2004. The pathogenic enteric protozoa: *Giardia*, *Entamoeba*, *Cryptosporidium* and *Cyclospora*. Chapter: *Entamoeba histolytica genome. Springer US.* p. 141-152

- Takeda K., and Akira S.. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 301:640-643.
- Tameling W.I.L., and Takken F.L.W.. 2008. Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *Eur J Plant Pathol*. 121:243-255.
- Torres-Guerrero H., Peattie D.A., Meza I.. 1991. Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biol. Parasitol*. 45:121-130
- van Hal S.J., Stark D.J., Fotedar R., Marriott D., Ellis J.T., and Harkness J.L.. 2007. Amoebiasis: current status in Australia. *Med J Aust*. 186:412-416.
- Vargas M., Sansonetti P., and Guillen N.. 1996. Identification and cellular localization of the actin-binding protein ABP-120 from *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol*. 22:849-857.
- Vargas M., Voigt H., Sansonetti P., and Guillen N.. 1997. Molecular characterization of myosin IB from the lower eukaryote *Entamoeba histolytica*, a human parasite. *Mol. Biochem. Parasitol*. 86:61-73.
- Vayssie L., Vargas M., Weber C., and Guillen N.. 2004. Double-stranded RNA mediates homology-dependent gene silencing of gamma-tubulin in the human parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol.Biochem.Parasitol*. 138:21-28.
- Vilhardt F., van Deurs B.. 2004. The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly. *EMBO J*. 23:739-48
- Voigt H., Olivo J.C., Sansonetti P., and Guillen N.. 1999. Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. *J Cell Sci*. 112:1191-1201.
- Wald D., Qin J., Zhao Z., Qian Y., Naramura M., Tian L., Towne J., Sims J.E., Stark G.R., and Li X.. 2003. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol*. 4:920-927.
- WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiol.Bull*. 18:13-14
- Xu Y., Tao X., Shen B., Horng T., Medzhitov R., Manley J.L., and Tong L.. 2000. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*. 408:111-115.
- Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Sanjo H., Takeuchi O., Sugiyama M., Okabe M., Takeda K., and Akira S.. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301 :640-d643.