



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y
HOMEOPATÍA**

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**

POSGRADO EN BIOMEDICINA MOLECULAR

**“EXPRESION DIFERENCIAL EN GENES
DURANTE LA INDUCCIÓN DE MUERTE
CELULAR EN *Entamoeba histolytica*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN BIOMEDICINA MOLECULAR**

P R E S E N T A

M. en C. VIRGINIA SÁNCHEZ MONROY



MÉXICO, D.F. 2010.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biomedicina Molecular No.1 de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara.

Parte del trabajo se realizó en el Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad de la Universidad del Ejército y Fuerza Aérea Mexicana.

Los recursos empleados para desarrollar esta investigación fueron proporcionados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el proyecto Número 83197 y por la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) con el proyecto 2007, 2008 y 2009. Adicionalmente, la autora del trabajo disfruto de la Beca de Doctorado del programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI).

AGRADECIMIENTOS:

A el Dr. Guillermo Pérez Ishiwara por asesorarme para la realización de este trabajo y por su gran paciencia.

A Los sinodales: Dra. María del Consuelo Gómez García, Dra. Laurence Marchat Marchau, Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza y Dr Julio Cesar Carrero Sánchez por haber revisado mi trabajo y hacerme sugerencias para una mejor presentación del mismo.

A mis compañeros M en C. María Olivia Medel Flores y Dr. José D'Artagnan Villalba Magdaleno por su gran ayuda en el trabajo de laboratorio.

A Natalia, Valeria y Fernando

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS.....	iii
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Muerte Celular Programada.....	1
1.2. Características de la MCP.....	1
1.3. Mecanismos moleculares de MCP.....	4
1.3.1. Mecanismos dependientes de Caspasas.....	4
1.3.1.1. Vía extrínseca o de los receptores de muerte.....	5
1.3.1.2. Vía intrínseca o mitocondrial.....	6
1.3.2. Mecanismos Independientes de Caspasas.....	8
1.4. MCP en parásitos unicelulares.....	8
1.4.1. Generalidades de <i>E. histolytica</i>	10
1.4.1.1. Morfología.....	10
1.4.1.2. Ciclo Biológico.....	11
1.4.1.3. Epidemiología.....	13
1.4.1.4. Patogenia molecular de la amibiasis.....	14
1.4.1.4.1. Adhesión.....	15
1.4.1.4.2. Citólisis dependiente de contacto.....	16
1.4.1.4.3. Fagocitosis.....	17
1.4.1.4.4. Relación hospedero-parásito.....	17

1.4.1.5. La MCP en la infección por <i>E. histolytica</i>	21
2. JUSTIFICACIÓN	25
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
5. MATERIAL Y MÉTODOS	29
5.1. Cultivo de <i>E. histolytica</i> y condiciones de crecimiento.....	29
5.2. Incorporación de ³⁵ S durante el proceso de MCP.....	29
5.3. Extracción de RNA.....	29
5.4. Cuantificación del RNA por espectrofotometría.....	30
5.5. Determinación de los Transcritos derivados de Fragmentos (TDFs) con la Técnica de cDNA-AFLPs (Polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados).....	31
5.5.1. Síntesis de cDNA de doble cadena.....	31
5.5.2. Cuantificación del cDNA de doble cadena por espectrofotometría.....	33
5.5.3. Digestión del cDNA de doble cadena con las enzimas de restricción <i>EcoRI</i> y <i>TaqI</i>	33
5.5.4. Preparación de adaptadores de doble cadena.....	34

5.5.5. Reacción de ligación de los adaptadores a los fragmentos de restricción.....	34
5.5.6 Amplificación de los fragmentos de cDNA por medio de la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa.....	35
5.5.6.1. Amplificación de los fragmentos de cDNA por PCR preselectiva.....	35
5.5.6.2. Amplificación de los fragmentos de cDNA por PCR selectiva.....	36
5.5.7. Análisis de fragmentos por electroforesis.....	38
5.6. Reproducibilidad y especificidad de la técnica cDNA-AFLPs.....	38
5.7 Búsqueda de transcritos derivados de fragmentos (TDFs) que se expresan diferente en los trofozoítos no estimulados y estimulados con G418.....	38
5.8. Purificación, clonación y secuenciación de TDFs.....	39
5.9. Identificación en el genoma de <i>E. histolytica</i> de genes reportados en otros parásitos relacionados con MCP mediante análisis <i>in silico</i> ..	40
5.10. Cuantificación de RNAm por PCR en tiempo real.....	41
5.10.1. Síntesis del cDNA para la amplificación en tiempo real....	42
5.10.2. Amplificación de genes por PCR en tiempo real.....	43
5.10.3. Curvas de disociación de los genes amplificados.....	44
5.10.4. Método de cuantificación.....	44
5.10.5. Selección del control endógeno.....	46

5.10.6. Eficiencia de la amplificación.....	47
5.10.7. Análisis estadístico.....	47
6. RESULTADOS.....	48
7. DISCUSIÓN.....	77
8. CONCLUSIÓN.....	89
9. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS.....	90
10. BIBLIOGRAFÍA.....	91
11. PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN DERIVADOS DEL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLPs	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
AIF	Factor Inductor de apoptosis
Apaf-1	Factor activador de apoptosis
ATP	Adenosin trifosfato
Ca ⁺²	Calcio
CPs	Cistein proteasas
CT	Ciclo umbral
DD	Dominio de muerte
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIABLO	Proteínas de bajo pl de unión directa a proteínas inhibidoras de apoptosis
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
DNA	Acido desoxirribonucleico
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
Gal-Lec	Galactosa lectina
GalNac	N-acetil-D-Galactosamina
G3PDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
h	hora
HSP	Proteínas de choque térmico
IAPs	Proteínas inhibidoras de apoptosis
ICE	Enzima convertidora de interleucina
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
K ⁺¹	Potasio
kDa	Kilodaltones
M	molar

MCP	Muerte Celular Programada
Mg ⁺²	Magnesio
mg	miligramos
µg	microgramos
µl	microlitros
µM	Micromolar
MUC2	Proteína 2 de la mucina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NO	Óxido nítrico
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfatos salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RACK	Receptor que activa a la proteína cinasa c
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
s	Segundos
Sir-2	Regulador silenciador de información-2
Smac	Segundo activador de caspasas derivado de mitocondrias
SREHP	Proteínas ricas en serina
TDFs	Transcritos derivados de fragmentos
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis

RELACION DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1. Mecanismos moleculares de Muerte Celular Programada.....	5
Figura 2. Estadios morfológicos de <i>E. histolytica</i>	11
Figura 3. Ciclo de Vida de <i>E. histolytica</i>	13
Figura 4. Cinética de Incorporación de metionina marcada con ³⁵ S durante la inducción de MCP.....	49
Figura 5. Pureza e integridad del RNA de los trofozoítos en estudio.....	50
Figura 6. Amplificación de un fragmento del gen de actina a partir de RNA tratado con DNasa.....	51
Figura 7. Amplificación de un fragmento del gen de actina a partir de cDNA de doble cadena.....	52
Figura 8. Análisis electroforético de la hibridación de los adaptadores de doble cadena para el sitio <i>Eco</i> RI.....	53
Figura 9. Patrones polimórficos generados durante la amplificación preselectiva y selectiva	54
Figura 10. Patrones representativos de los TDFs obtenidos con la metodología de cDNA-AFLP en trofozoítos sin y con inducción a MCP durante 3 y 6 h.....	58
Figura 11. Secuencias de las clonas analizadas para los diferentes TDFs obtenidos.....	60

Figura 12. Alineamientos de la secuencia de aminoácidos para Sir-2 y porcentajes de identidad y homología de Graininas entre <i>E. histolytica</i> y otros parásitos.....	63
Figura 13. Aplicación del método $2^{-\Delta C_T}$ para la selección del control endógeno.....	67
Figura 14. Determinación de la eficiencia de amplificación para los genes analizados y el control endógeno.....	70
Figura 15. Curvas de disociación para los genes analizados.....	72
Figura 16. Expresión relativa de los genes analizados durante la inducción de MCP.....	76
Tabla I. Mezcla de reacción para síntesis de la segunda cadena de cDNA.....	32
Tabla II. Secuencias de adaptadores y oligonucleótidos utilizados en el análisis de AFLP's.....	37
Tabla III. Oligonucleótidos usados para la RT-PCR Cuantitativa.....	42
Tabla IV. Mezcla de reacción para síntesis cDNA de una cadena.....	43
Tabla V. Combinación de oligonucleótidos selectivos que generaron polimorfismo.....	56
Tabla VI Resultados del análisis de cDNA-AFLPs.....	57
Tabla VII. Fragmentos diferencialmente expresados en <i>E. histolytica</i> después de la inducción de MCP con G418.....	61
Tabla VIII. Resumen del análisis de datos para la selección del control endógeno.....	66

Tabla IX. Resumen de CTs obtenidos para el cálculo de la eficiencia de reacción.....	69
Tabla X. Resumen del los valores de expresión relativa en los genes estudiados.....	75

RESUMEN

Recientemente nuestro grupo demostró que la Muerte Celular Programada (MCP) en *Entamoeba histolytica*, es inducida *in vitro* por el antibiótico aminoglicósido G418. En este trabajo estudiamos la expresión diferencial de genes durante etapas tempranas de MCP inducida por G418, para determinar si los cambios bioquímicos y morfológicos de la muerte celular, coinciden con los cambios moleculares que reflejen un programa genético. Utilizando la tecnología de cDNA-Polimorfismo de longitud en fragmentos amplificados (AFLP's) y análisis *in silico*, demostramos una expresión diferencial en genes durante fases tempranas de MCP en *E. histolytica* inducida por G418. Los genes que identificamos codifican para proteínas homólogas a la Glutaminil-tRNA sintasa, las Subunidades Ribosomales 40S y 16S, a la Saposina-like, al Regulador silenciador de información-2 (Sir-2), y a las Graininas 1 y 2. Utilizando retrotranscripción y PCR cuantitativa en tiempo real (RT-Q-PCR) encontramos que *glutaminil t-RNA sintetasa*, *sir-2*, *graininas* y *saposina-like* se sobreexpresaron 55.63, 122.52, 80.26, 132.11 y 194.09 veces mas respectivamente, en relación al control después de 30 min de la inducción de MCP, mientras que esta expresión disminuyó dramáticamente a los 60 min. Por otro lado la sobreexpresión de genes ribosomales incrementó solo 7 veces por arriba del nivel basal de expresión, mostrando una disminución progresiva después de los 90 min. *Glutaminil t-RNA sintetasa*, *sir-2* y las *graininas* 1 y 2 pudieran estar actuando como reguladores negativos de la MCP, intentando controlar los cambios bioquímicos relacionados con la activación de dicho fenómeno. En contraparte, la sobreexpresión de

saposina-like, pudiera estar actuando como un regulador positivo de apoptosis activando algunas de las rutas de muerte celular.

Nuestros resultados dan evidencia de los primeros genes identificados durante estadios tempranos de MCP en *E. histolytica*, que pudieran estar implicados en la regulación de rutas apoptóticas.

ABSTRACT

Recently our group demonstrated that Programmed Cell Death (PCD) in *Entamoeba histolytica*, is induced *in vitro* by G418 aminoglycoside antibiotic. In this work we studied the differential gene expression during early stages of PCD induced by G418, to ascertain if biochemical and morphological changes previously observed are paired to molecular changes that reflect a genetic program.

Using cDNA-amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) and *in silico* derived analysis we showed in *E. histolytica* a differential gene expression during PCD induced by G418. The genes identified encoded for proteins homologous to Glutamyl-tRNA synthase, Ribosomal Subunit Proteins 40S and 18S, Saposin-like, Silent Information Regulator-2 (Sir-2), and Grainins 1 and 2. Using real-time quantitative PCR (RT Q-PCR), we found that *glutamyl-tRNA synthetase*, *sir-2*, *grainins* and *saposin-like* genes were overexpressed 55.63, 122.52, 80.26, 132.11 y 194.09 fold respectively, relative to control after 30 min of PCD induction, while its expression dramatically decreased up to 60 min. On the other hand, overexpression of *ribosomal* genes increased only 7 fold of basal expression, showing a progressive down regulation up to 90 min. *glutamyl-tRNA synthetase*, *sir-2* and *grainins* could act as negative regulators of PCD, trying to control the biochemical changes related to PCD activation. Overexpression of *saposin-like* gene could act as up regulator of some cell death pathways. Our results give evidence of the first genes identified during the early stage of PCD in *E. histolytica* that could be implicated in regulation of apoptotic pathways.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Muerte Celular Programada

La Muerte celular programada (MCP) comúnmente mencionada como sinónimo de apoptosis es un proceso evolutivamente conservado, activo, genéticamente regulado en el cual la célula sistemáticamente se inactiva, degradando su propia estructura hasta completar su muerte (Jiang y cols 2004).

En organismos pluricelulares este proceso es esencial para el apropiado desarrollo, función, eliminación, y mantenimiento de homeostasis celular y en organismos unicelulares se describe como fundamental en la regulación y mantenimiento de poblaciones celulares bajo condiciones fisiológicas y patológicas.

El concepto de MCP fue descrito morfológicamente por Kerr y colaboradores en 1972 (Kerr y cols 1972) y se comprobó molecularmente en los años noventas por Horvitz, al mostrar en *Caenorabditis elegans*, rutas de señalización que controlaban la muerte celular de un grupo de células neuronales durante su desarrollo (Horvitz y cols 1994).

1.2. Características de la MCP

Durante la MCP se observan cambios morfológicos consecuencia de los eventos bioquímicos y moleculares. Uno de los eventos tempranos de la apoptosis es la deshidratación celular y por consecuencia la pérdida del balance iónico que ocasiona pérdida de potasio, reducción de pH, condensación del citoplasma y cambios en la forma y el tamaño celular.

Una característica específica de la apoptosis en la fase inicial, es la conservación de la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática, de los lisosomas y de la mitocondria, aunque en esta última el potencial transmembranal disminuye (Castedo y cols 1996, Darzynkiewicz y cols 1982).

Uno de los cambios característicos de una célula en apoptosis, es la condensación y agregación de la cromatina nuclear. La condensación comienza en la periferia nuclear, con un patrón en forma de media luna y la membrana nuclear se desintegra, produciendo fragmentación nuclear (Magno y cols 1995). El estudio molecular de la cromatina revela una degradación ordenada, primero en fragmentos largos de 30-50 kilobases y luego en fragmentos internucleosomales de 180-200 pb (Arends y cols 1990, Compton y cols 1992, Wyllie y cols 1992). Estos productos de degradación del DNA generan el típico patrón en escalera en una electroforesis de geles de agarosa. Sin embargo, a pesar de ser el cambio más característico de una célula en apoptosis, se ha reportado que no ocurre en todos los tipos celulares aún y cuando presentan los otros cambios típicos de apoptosis (Jacobson y cols 1994, Schulze-Osthoff y cols 1994).

Otros cambios característicos de una célula en apoptosis son la liberación del calcio intracelular (McConkey y cols 1989), la activación de la transglutaminasa que une proteínas citoplásmicas (Piacentini y cols 1995), la pérdida de microtúbulos (Endersen y cols 1995), la dilatación del retículo endoplásmico y su fusión con la membrana plasmática, la pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la membrana plasmática, que permite la exposición de la fosfatidilserina en la

cara externa de la membrana plasmática (Fadok y cols 1992) y la generación de especies reactivas de oxígeno (Chen y cols 2005).

En la fase final de la apoptosis los fragmentos nucleares junto con los constituyentes del citoplasma y orgánulos, son empaquetados y envueltos por la membrana plasmática formando pequeñas vesículas que son separadas de la célula como fragmentos que se denominan cuerpos apoptóticos. Cuando la apoptosis sucede *in vivo*, los cuerpos apoptóticos son fagocitados, sin desencadenar ninguna respuesta inflamatoria en el tejido (Compton y cols 1992, Kerr y cols 1972, Magno y cols 1995, Wyllie 1992, Wyllie y cols 1992).

La mayoría de los cambios que se observan en la apoptosis son ejecutados por una subfamilia de cisteín aspartato proteasas conocidas como caspasas (Alnemri y cols 1996). El análisis filogenético indica que esta familia de genes está compuesta por dos grandes subfamilias que están relacionadas con la enzima convertidora de interleucina-1 b (ICE grupo inflamatorio), o con el homólogo de mamíferos del gen *ced-3* (grupo apoptótico). Todas comparten similitudes en la secuencia de aminoácidos, en la estructura y especificidad de sustratos (Budihardjo y cols 1999).

Las caspasas son sintetizadas como zimógenos enzimáticamente inactivos que deben ser cortadas proteolíticamente para ser activadas. Contienen tres dominios: un prodominio N-terminal, un dominio grande (p20) que contiene el centro activo con cisteína dentro de un motivo conservado QACXG, y un dominio pequeño (p10) en el C-terminal. Como su nombre lo indica son proteasas que cortan después de un residuo de ácido aspártico. (Stennicke y cols 1998).

Por la función de señalización que median en el proceso apoptótico se clasifican como caspasas iniciadoras (2, 8, 9, 10, y 12) a las que activan proteolíticamente a otras caspasas y son activadas por interacciones reguladas proteína-proteína, mientras que las caspasas efectoras (3, 6 y 7) son aquellas que procesan a su vez otros sustratos proteicos que actuarán en las distintas vías de apoptosis.

1.3. Mecanismos moleculares de MCP

Como mencionamos anteriormente la MCP es un proceso activo, genéticamente regulado, que responde a estímulos intracelulares y extracelulares, y que ha sido identificado en todos los organismos multicelulares analizados y en un número considerable, y que va en aumento, de organismos unicelulares (Amitai y cols 2004, Madeo y cols 2002, Nasirudeen y cols 2004 Welburg y cols 1996, Kosec y cols 2006, Billaut y cols 1996, Lee y cols 2002).

Dependiendo de la participación de las caspasas, los mecanismos se han clasificado como dependientes e independientes de caspasas (figura 1).

1.3.1. Mecanismos dependientes de Caspasas

Las dos principales vías que conducen a la activación de las caspasas han sido bien caracterizadas en eucariontes superiores y son: i) la vía extrínseca, en la que la señal de muerte es generada por la unión de un ligando de muerte a su receptor de la superficie celular y ii) la vía intrínseca en la que la señal de muerte es generada en el interior de la célula y es regulada por las mitocondrias (figura 1).

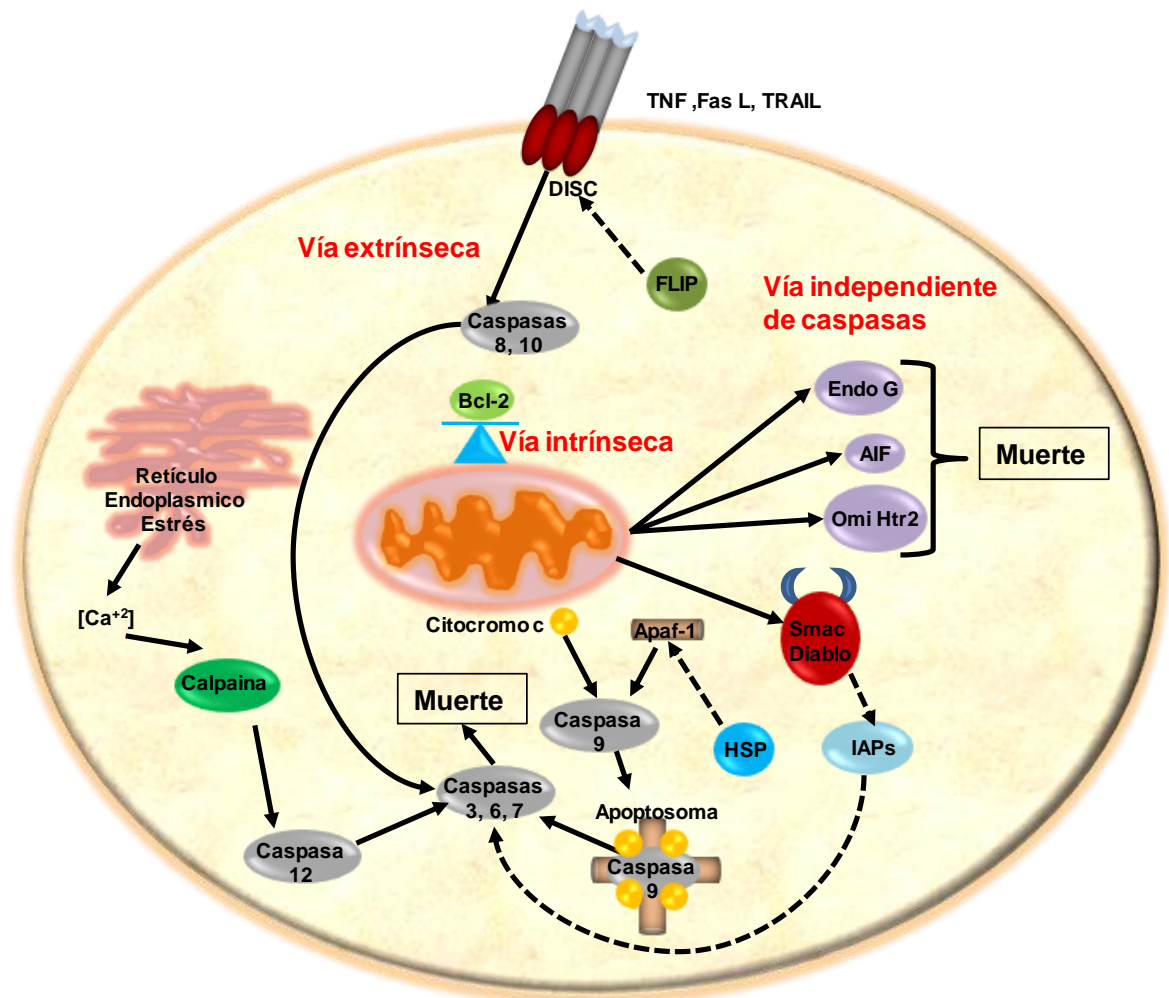


Figura 1. Mecanismos moleculares de Muerte Celular Programada. Las líneas continuas indican activación y las líneas discontinuas indican inhibición. (V.Sánchez, 2010)

1.3.1.1. Vía extrínseca o de los receptores de muerte

Esta ruta es iniciada por hormonas o agonistas de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), que incluyen TNFR1, Fas (CD95), DR3/WSL y los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (*TRAIL* del inglés TNF-related apoptosis-inducing ligand,) TRAIL/Apo-2L (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5). Estos agonistas reconocen y activan sus correspondientes

receptores miembros de la familia de receptores TNF/NGF tales como TNFR1, Fas/CD95 y Apo2 (Ashkenazi y cols 1998). La interacción proteína-proteína involucra dominios que incluyen el dominio de muerte (*DD* del inglés death domain) y el dominio efector de muerte. Los receptores reclutan proteínas específicas adaptadoras que forman un complejo llamado complejo de señalización que induce muerte (*DISC* del inglés death-inducing signalling complex,), el cual activa a la caspasa iniciadora 8 y a la caspasa 10 que posteriormente activan a caspasas ejecutoras como la caspasa 3 y 7.

La inhibición de esta ruta es realizada por proteínas que se unen al complejo, evitando el reclutamiento y la activación de la caspasa 8 (Thome y cols 1997, Hu y cols 1997, Bertin y cols 1997, Yeh y cols 2000).

Otro mecanismo de regulación en esta vía es a través de las proteínas de choque térmico (*HSP* del inglés heat-shock proteins,) que pueden actuar inhibiendo la activación de caspasas al interactuar directamente con el factor activador de apoptosis (Apaf-1) (Jiang y cols 2004, Jaattela 1999, Xanthoudakis y cols 2000).

1.3.1.2. Vía intrínseca o mitocondrial

La vía intrínseca o mitocondrial se ejecuta en respuesta al daño celular interno tales como el daño genético, el desbalance electrolítico y el estrés oxidativo, entre muchos otros. Esta vía se inicia con la liberación del citocromo c de la mitocondria, el cual se une al Apaf-1 para formar el complejo denominado apoptosoma que activa a la caspasa 9, requiriendo para esto dATP o ATP, posteriormente la caspasa 9 activa las procaspasas 3 y 7.

La regulación de esta vía es sumamente compleja, y depende en gran medida de la participación de la familia de proteínas Bcl-2 regulando la liberación del citocromo c (Adams y cols 1998, Antonsson y cols 2000). Esta familia consta de 19 miembros que se han clasificado en tres grupos, basándose en similitudes estructurales y funcionales. Cada miembro posee al menos uno de los cuatro motivos conservados denominados BH: BH1-BH4. Los miembros del grupo I, como Bcl-2 y Bcl-X L, poseen actividad antiapoptótica y se caracterizan por tener los cuatro dominios BH. El grupo II consta de miembros de la familia de Bcl-2 con actividad proapoptótica, como Bax y Bak, éstos solo presentan tres dominios BH (BH1-BH3). Los miembros del grupo III como Bid, Bad, Bim, Bik, Puma, también tienen actividad proapoptótica; todos ellos se caracterizan por la presencia de un único dominio BH3. La activación de estos miembros proapoptóticos puede producirse a través de proteólisis, defosforilación y probablemente otros mecanismos aún no determinados (Adams y cols 1998; Antonsson y cols 2000).

Otro proceso relevante de regulación en esta vía es a través del retículo endoplasmático, el cual es un importante sensor del estrés celular provocando la liberación del calcio en el citoplasma, induciendo la permeabilización de la mitocondria y liberación de citocromo c, así como otras vías de muerte mitocondrial. Además, el calcio promueve la activación de calpaínas y catepsinas que activan a caspasas (Lee y cols 1993).

Las proteínas mitocondriales Smac (del inglés second mitochondria-derived activator of caspases) (Du y cols 2000) o DIABLO (del inglés direct IAP-binding

protein with low pI) (Verhagen y cols 2000) regulan esta vía inactivando a las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs).

Normalmente las IAPs protegen a las caspasas de ser activadas en forma errática en el estado de supervivencia celular, por lo que Smac neutraliza su actividad, y favorece la muerte a través de las caspasas (Du y cols 2000).

1.3.2. Mecanismos Independientes de Caspasas

Independientemente de la participación de caspasas se han descrito varias proteínas que actúan directamente promoviendo el proceso de apoptosis como el factor inductor de apoptosis (AIF) (Susin y cols 1999) y la endonucleasa G (Li y cols 2001); ambos están involucrados en la fragmentación del DNA y subsecuentemente en la condensación de cromatina.

Además se ha descrito también la proteína Omi (Htr2) (del inglés high-temperature requirement) la cual también es liberada de la mitocondria y tiene un doble papel en la muerte celular: i) la inactivación de las IAPs y ii) la actividad de serin-proteasa (Suzuki y cols 2001, Martins y cols 2002, Hegde y cols 2002, Van Loo y cols 2002) (figura 1).

1.4. MCP en parásitos unicelulares

La MCP es un proceso fundamental en organismos unicelulares, descrito desde la década de los noventas en algunos parásitos unicelulares como tripanosomátidos (Ameisen y cols 1995, Welburn y cols 1996, Moiera y cols 1996), *Blastocystis hominis* (Tan y cols 2001), *Plasmodium falciparum* (Picot y cols 1997, Al-Olayan y cols 2002) y recientemente en *Entamoeba histolytica* (Villalba y cols 2007, Ramos y col 2007, Ghosh y cols 2010). En parásitos protozoarios unicelulares se

especula que la MCP es un factor importante para la selección clonal, para evadir la respuesta inmune y para regular el tamaño de la población (Bruchhaus y cols 2007). La MCP en organismos unicelulares se ha descrito como un evento que comparte características morfológicas y bioquímicas con los eucariontes superiores, incluyendo la participación de genes homólogos a los organismos superiores, aunque no se han descrito aún rutas precisas de señalización molecular.

Algunos de los genes que recientemente se han descrito son la caspasa like-3 en *B. hominis* (Nasirudeen y cols 2004), metacaspasas en *P. falciparum* (Le Chat y cols 2007), y una endonucleasa G en tripanosomátidos similar a eucariontes superiores liberada de mitocondria y con actividad nuclear (Gannavaran y cols 2008). Así mismo, se ha demostrado la participación del factor de elongación 1-alfa como regulador de la expresión de genes involucrados en el evento de MCP (Billaut y cols 1996, Ouaisi 2003).

En *Tripanosoma*, la MCP se ha correlacionado con la inducción de los genes que codifican para la prohibitin (regulador de crecimiento celular) y RACK (receptor que activa a la proteína cinasa c) (Welburg y cols 1998). En *T. brucei*, se ha demostrado un mecanismo para MCP dependiente de calcio (Ridgley y cols 1999), y recientemente se han identificado metacaspasas (Kosec y cols 2006) y se ha demostrado la sobreexpresión de una superóxido dismutasa mitocondrial dependiente de hierro que tiene una actividad citoprotectora (Piacenza y cols 2007).

En *Leishmania*, la MCP se ha relacionado con la actividad de una caspasa-like (Lee y cols 2002, Zangger y cols 2002, Das y cols 2001), y proteína centrin, una proteína que une calcio (Selvapandiyan y cols 2004), y con la liberación de citocromo c (Arnoult y cols 2002). Por otra parte, la sobreexpresión de los genes *sir-2* (del inglés Silent Information Regulator) y peroxirredoxina mitocondrial, ha sido relacionada con actividad antiapoptótica (Vergnes y cols 2002, Vergnes y cols 2005, Harder y cols 2006).

En *E. histolytica*, se ha descrito características morfológicas y bioquímicas similares a la MCP de los eucariontes superiores, pero aún no se ha descrito algún mecanismo molecular ni se ha demostrado la participación de genes relacionados a MCP.

1.4.1. Generalidades de *E. histolytica*

1.4.1.1. Morfología

E. histolytica es el parásito protozooario entérico causante de la amibiasis intestinal y extraintestinal, que se presenta en la naturaleza en tres estadios morfológicos: trofozoíto, prequiste y quiste (figura 2).

El trofozoíto corresponde a la forma vegetativa y móvil que emite pseudópodos a base de material protoplásmico locomotor, su diámetro varia de entre las 10 y 60 micras, su citoplasma presenta dos zonas bien diferenciadas i) el ectoplasma que es hialino y transparente sin inclusiones, y ii) el endoplasma que presenta una gran cantidad de inclusiones por lo que es granuloso.

En el endoplasma se observan vacuolas, lisosomas, cisternas aplanadas semejantes a los sistemas de Golgi y un sistema reticular membranoso similar a

un retículo endoplásmico (Chávez-Munguía y cols 2008), ribosomas, polirribosomas, un núcleo esférico, sin posición fija de aproximadamente 5 a 7 micras con un endosoma central y se han detectado estructuras que contienen DNA extracromosomal (Orozco y cols 1997).

El prequiste es el estadio que se presenta cuando las condiciones del medio ambiente en que se mueve el trofozoíto son desfavorables para su vida, es esférico, inmóvil, sin diferenciación de ectoplasma y endoplasma, con pared gruesa y con un solo núcleo.

El quiste es la forma infectante en la naturaleza, esférico con un tamaño aproximado de entre 5 y 20 micras, con cuatro núcleos y una pared gruesa, presenta en ocasiones una vacuola con glucógeno.

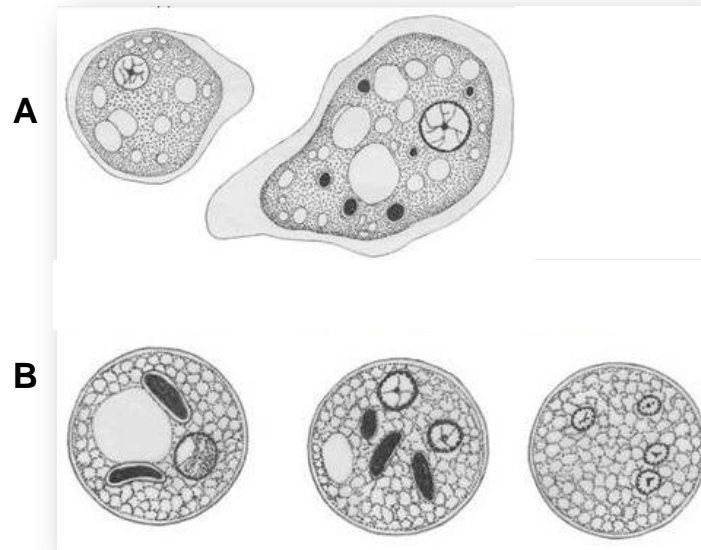


Figura 2. Estadíos morfológicos de *E. histolytica*. A. Trofozoítos y B. Prequistes y Quistes. Tomado de (<http://jpkc.sysu.edu.cn/jscx/Textbook/six-2.html>)

1.4.1.2. Ciclo Biológico

La parasitosis se adquiere al ingerir los quistes que corresponden a la fase infectante para el humano. Estos se transmiten principalmente a través de alimentos y bebidas contaminadas, o a través de otros mecanismos menos frecuentes que incluyen algunos tipos de prácticas sexuales. Una vez que el quiste es ingerido, viaja por el aparato digestivo hasta el íleon donde desenquistan, originando un protoplasto desnudo tretranucleado que da lugar a ocho trofozoítos metaquísticos, que migran al ciego y se adhieren a la mucosa intestinal. Los trofozoítos pueden invadir la mucosa intestinal y producir desde síntomas leves hasta disentería grave. Una vez invadido el epitelio intestinal, el parásito puede diseminarse a través de la sangre, originando lesiones extraintestinales principalmente en hígado, y con menos frecuencia en pulmón, cerebro, piel, órganos genitales, bazo y riñón. Alternativamente, bajo condiciones aún no determinadas, los trofozoítos pueden enquistarse, salir al ambiente con las heces y contaminar agua y alimentos e infectar nuevamente a otros individuos, completando así su ciclo de vida (Martínez-Palomo 1989) (figura 3).

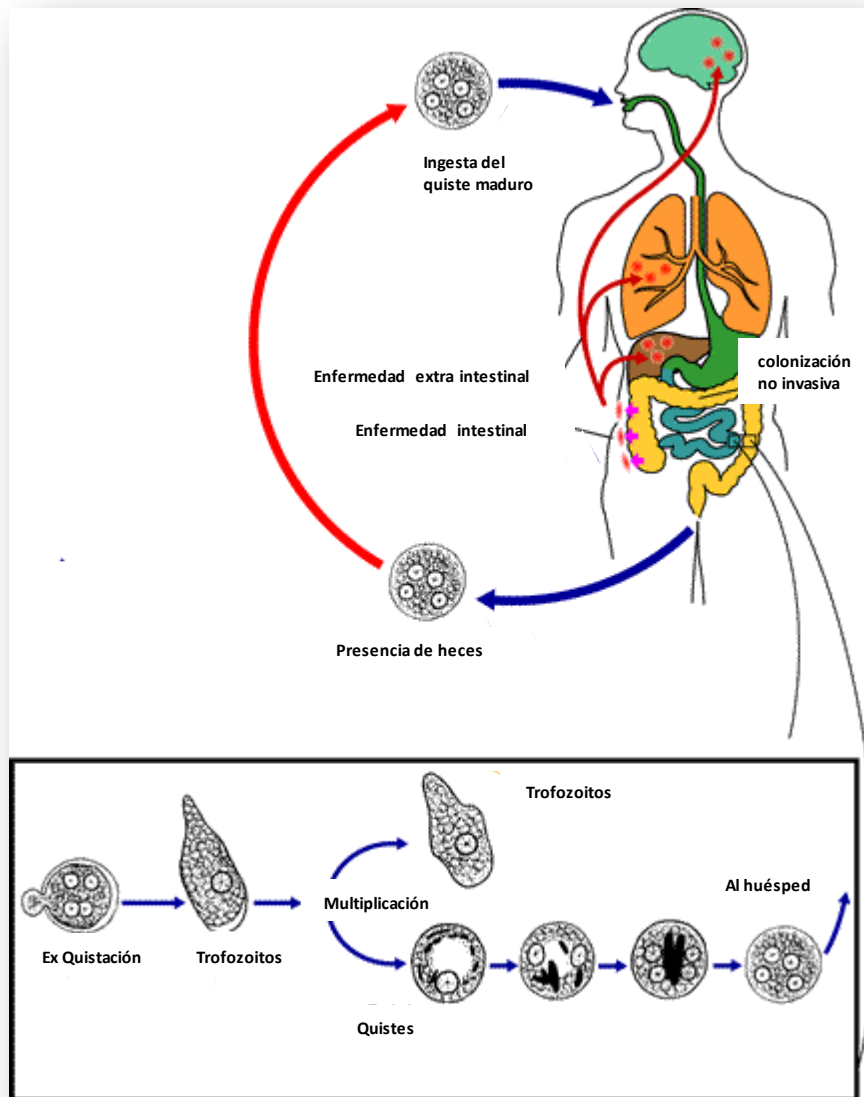


Figura 3. Ciclo de vida de *E. histolytica*
Tomado de (<http://www.dpd.cdc.gov/DPD/HTML/Amebiasis>)

1.4.1.3. Epidemiología

E. histolytica tiene una distribución mundial que afecta en especial a los países en vías de desarrollo, infecta alrededor del 10% de la población mundial

(aproximadamente 600 millones de personas), ocasiona anualmente alrededor de 100,000 muertes por complicaciones (Organización Mundial de la Salud 1997).

Los datos más recientes sobre la prevalencia de la infección en México evaluados mediante un método molecular (PCR), muestran que existe una prevalencia de infección por *E. histolytica* del 13.8%, mientras que para la especie de *E. dispar* (morfológicamente indistinguible de *E. histolytica*) es de 9.7%, lo que hace un total de 21% de la población infectada por *Entamoeba* (Acuña y cols 1993, Ramos y cols 2005).

1.4.1.4. Patogenia molecular de la amibiasis

La amibiasis presenta diferentes cuadros clínicos que se clasifican en i) amibiasis no invasiva que incluye la tifoappendicitis amibiana, el ameboma y la colitis amibiana fulminante y ii) amibiasis invasiva que incluye el abscesos hepático amibiano, la amibiasis pulmonar, amibiasis cutánea y mucosa y absceso cerebral amibiano (Bernal y cols 1997).

Esta amplia variedad de manifestaciones clínico-patológicas de la enfermedad, no esta asociada totalmente con los mecanismos moleculares que participan en la expresión de los diferentes fenotipos de virulencia en la amiba, así como de los factores externos del hospedero y del ambiente que los activa.

En el mecanismo patogénico de *E. histolytica* se distinguen tres etapas sobre la célula blanco: adhesión, citólisis dependiente de contacto y fagocitosis (Martinez-Palomo y cols 1986, Orozco y cols 1982, Ravdin 1986).

1.4.1.4.1. Adhesión

El primer paso en la invasión intestinal por los trofozoítos de *E. histolytica* es el contacto y la adherencia a las células del hospedero, esta requiere de un mecanismo específico que involucra moléculas de superficie del parásito llamadas adhesinas y sus receptores presentes en las células blanco (Martínez-Palomo y cols 1986).

Se han reportado varias proteínas de *E. histolytica* involucradas en el contacto con las células blanco, entre ellas se encuentran las lectinas Gal-Lec y Gal/GalNac (Ravdin y cols 1981, Petri y cols 1987), una adhesina de 112 kDa (Arroyo y cols 1987), la proteína de superficie celular de 220 kDa (Meza y cols 1987), el antígeno lipofosfoglicano (Isibasi y cols 1982), las proteínas ricas en serina (SREHP) de 52 kDa (Stanley y cols 1990) y las proteínas de 90,70,50 y 24 kDa (Rodríguez y cols 1989).

De las proteínas que participan en la adhesión, las lectinas presentes en la membrana plasmática de la amiba son las principales mediadoras de la adherencia del parásito a células epiteliales, eritrocitos, y neutrófilos entre otros (Ravdin y cols 1981, Chadee y cols 1987). Además se ha observado su participación en citólisis (Chade 1987, Petri y cols 1990, Li y cols 1989) y evasión del sistema inmune a través de la unión a factores del complemento y la interrupción de la formación del ensamble del complejo del complemento sobre la membrana de los trofozoítos (Braga y cols 1992, Reed 1986, 1990).

1.4.1.4.2. Citólisis dependiente de contacto

Una vez que *E. histolytica* establece contacto con las células blanco ocurre la citólisis, que esta mediada principalmente por dos proteínas: i) las cisteín-proteasas (CP) (Keene y cols 1990), y ii) péptidos formadores de poros llamados ameboporos (Leippe y cols 1992, 1994, Young y cols 1992, Lynch y cols 1982, Rosenberg y cols 1985, Bracha y cols 2002).

Las CP son proteínas de secreción, críticas para la invasión de tejido por su capacidad para degradar componentes de la matriz extracelular como colágena, elastina, fibrinógeno y laminina (Keene y cols 1990, Muñoz y cols 1982, Serrano y cols 1994). Se ha demostrado también su capacidad de interferir con la función del sistema inmune, al inactivar al precursor inactivo de la IL-18 (Que y cols 2003), hidrolizar a C3, IgG, IgA y las anafilatoxinas, como C3a y C5a (Quezada –Calvillo y cols 1986, Kelsall y cols 1993, Tran y cols 1998, Reed y cols 1989).

Los ameboporos están formados por una pequeña proteína que forma canales iónicos entre los fosfolípidos de la membrana celular. Diversos estudios *in vitro* han demostrado su actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares humanas y bacterias (Andra y cols 1994, Bracha y cols 2002, Berninghausen y cols 1997).

Además de las CP y los ameboporos se ha descrito que los microfilamentos y el flujo transmembranal de calcio son factores necesarios para que los trofozoítos de *E. histolytica* puedan lisar a la célula (Ravdin y cols 1981, 1982, 1985).

1.4.1.4.3. Fagocitosis

Consiste en la ingestión de fragmentos celulares, células vivas, partículas inertes y la típica ingestión de glóbulos rojos (eritrofagocitosis). En este proceso la unión del parásito puede estar mediada por fuerzas electrostáticas, pero también existen mecanismos altamente específicos donde intervienen moléculas de superficie (Arroyo y cols 1987), CP (Ankri y cols 1998) y componentes del citoesqueleto (Godbold y cols 1998). Este proceso está acompañado por la formación del fagolisosoma (Stuart y cols 2005) dirigido por GTPasas y proteínas Rab, que actúan como moduladores en la regulación de la fusión vesicular con las membranas de la célula blanco.

1.4.1.4.4. Relación hospedero-parásito

La relación hospedero-parásito implica una serie de interacciones entre los mecanismos de defensa del hospedero para la expulsión del patógeno y las estrategias que desarrolla el parásito para modular la respuesta del hospedero y favorecer su supervivencia.

En el intestino, los factores ambientales interactúan con los trofozoítos tratando de modular sus factores de virulencia. La mucina como principal constituyente de la capa de mucosa intestinal, constituye una de las primeras barreras de defensa contra la invasión de *E. histolytica*. Sin embargo, se ha reportado que la ameba modula la respuesta del hospedero a través de las CPs, ya que degrada al polímero MUC2, el cual es el principal componente glucoproteico de la mucina intestinal (Lidell y cols 2006). Por otro lado, se ha reportado también que la ameba secreta un factor estable al calor que provoca hipersecreción mucosa de las

células caliciformes, dando como resultado el agotamiento de mucina y una pérdida de la función de protección (Tse y cols 1992).

Respecto a las interacciones entre la flora bacteriana residente en el intestino y *E. histolytica*, se ha documentado que pueden ser factores decisivos para la defensa del hospedero o de la virulencia del parásito. Mientras algunos estudios han demostrado que los trofozoítos aumentan su virulencia en respuesta a su asociación con bacterias (Anaya-Velázquez y cols 1992, Bracha y cols 1984, Bhattacharya y cols 1992, Bhattacharya y cols 1998), en otros se reporta que algunas bacterias reducen la virulencia del trofozoíto, y sugieren que esta reducción puede ser asociada a una disminución de la expresión de lectina Gal/GalNAc (Padilla-Vaca y cols 1999, Variyam 1996).

Por su parte, las células del intestino se caracterizan por liberar varios potentes quimioatrayentes y citocinas pro-inflamatorias como IL-1, 6, 8 y 10 iniciando una inflamación aguda (Seydel y cols 1998, Eckmann y cols 1995). La IL-18 se expresa en las células intestinales producto de la inducción de la respuesta Th1 y la producción de interferón gama (IFN- γ), el cual activa a los macrófagos capaces de matar al parásito. Sin embargo en 2003, Que y colaboradores demostraron que la amiba puede inactivar al precursor inactivo de IL-18, así como a su forma madura limitando la respuesta del hospedero (Que y cols 2003).

Modelos experimentales de amibiasis han mostrado que la etapa temprana de la infección se caracteriza por una infiltración predominante de los neutrófilos (Tsutsumi y cols 1984, Martínez Palomo y cols 1989). Como consecuencia de la interacción de los trofozoítos y los neutrófilos, estos últimos se activan después de

la estimulación por IFN- γ , TNF- α , LPS o antígenos amibianos (Denis y cols 1989, Guerran y cols 1981). Varios estudios han documentado la actividad amebicida de los neutrófilos (Guerran y cols 1981, Jarillo-Luna y cols 2002). Esta activación conlleva a la liberación de especies reactivas de oxígeno y péptidos antimicrobianos. Sin embargo, se ha demostrado que la amiba interfiere con la actividad de éstos interrumpiendo las actividades de la NADPH oxidasa, y resistiendo a través de la peroxirredoxina de 29 kDa el estrés oxidativo (Arbo y cols 1990, Bruchhaus y cols 1997). Así mismo, ya se ha demostrado *in vitro* que *E. histolytica* también puede inducir la apoptosis de los neutrófilos (Sim y cols 2005). Al igual que los neutrófilos, los macrófagos adquieren actividad amebicida después de la estimulación con IFN- γ , TNF- α o el factor estimulante de las colonias (Salata y cols 1986, Lin y cols 1993, Ghadirian y cols 1992). El óxido nítrico (NO) es un importante mediador de la citotoxicidad de los macrófagos, capaz de inhibir las CPs y la alcohol deshidrogenasa 2 del parásito (Siman-Tov 2003). La modulación de esta respuesta por parte de la amiba ha sido suprimir el estallido respiratorio, y disminuir los niveles de NO (Lin y cols 1993, Wang y cols 1994), TNF- α e IFN- γ (Se'guin y cols 1995, Wang y cols 1995).

Los mecanismos y moléculas amibianas que participan en esta modulación se conocen solo parcialmente. Entre ellas se encuentran una supuesta arginasa expresada por *E. histolytica*, (Elnekave y cols 2003), proteínas similares a la prostaglandina E2, (Dey y cols 2003, Gutierrez-Alarcon y cols 2006) y un factor inhibidor de la migración de macrófagos (Rico y cols 2003, Utrera-Barillas y cols 2003), los cuales se sugiere que actúan como inmunoreguladores amibianos.

Durante el curso de la invasión en el colon y la dispersión hacia el hígado, los trofozoítos de *E. histolytica* están en continua exposición con el sistema del complemento, el cual representa una barrera del sistema inmune no específico contra las infecciones y en este contexto también participa en la patogénesis de la amibiasis. Los trofozoítos activan la vía clásica y alterna del complemento en la ausencia de anticuerpos antiamibianos a través de la CP de 56 kDa (Reed y cols 1989, 1990). Esta CP degrada los componentes del complemento C3, C4, C5, y C9, evitando así efectos fisiológicos de anafilatoxinas C3a y C5a como el incremento de la permeabilidad vascular y contracción del musculo liso, la supresión de la proliferación de las células T, la liberación de histaminas e IL-1, así como limitar la quimiotaxis de neutrófilos (Reed y cols 1989).

Por otra parte, se ha descrito que la lectina Gal/GalNac inhibe también el ensamble de C8 y C9 en el complejo de ataque a la membrana C5b-9, lo que impide la lisis del parásito mediada por el complemento (Braga y cols 1992).

Con respecto a la respuesta humoral del hospedero, estudios seroepidemiológicos han indicado que aproximadamente del 81-100% de los pacientes con amibiasis invasiva responden desarrollando anticuerpos específicos contra la lectina Gal/GalNac, pero se ha demostrado que solo la respuesta de la IgA mucosa está vinculada a la protección contra la infección (Kaur y cols 2004, Haque y cols 2001, Haque y cols 2006). Por su parte, los parásitos también modulan la respuesta del hospedero, limitando la respuesta humoral al degradar las IgA e IgG predominantemente a través de CPs (Quezada-Calvillo y cols 1986, Kelsall y cols 1993, Tran y cols 1998).

1.4.1.5. La MCP en la infección por *E. histolytica*

La MCP constituye un factor importante para la relación hospedero-parásito, debido a que existen diversas evidencias que señalan, tanto *in vitro* como en modelos *in vivo* de amibiasis intestinal y hepática, que *E. histolytica* es capaz de inducir la MCP a neutrófilos, células epiteliales y células hepáticas entre otras, permitiendo limitar el infiltrado inflamatorio y el establecimiento de la infección al evadir la respuesta inmunológica (Hustom y cols 2003). Los mecanismos de apoptosis que se han descrito en las células del huésped incluyen la participación de caspasas, (Becker y cols 2010, Kim y cols 2007) y de especies reactivas de oxígeno (Sim y cols 2007, Sim y cols 2005).

Se ha documentado que la lectina Gal/GalNAc de *E. histolytica* y su adhesión a la célula blanco es el mecanismo que el parásito emplea para activar la apoptosis en las células del hospedero (Blazquez y cols 2007, Boettner y cols 2005). Sin embargo, se ha descrito también la participación de los ameboporos y CP's sugiriendo que éstos pueden matar a hepatocitos a distancia (Salata y cols 1986, Zhang y cols 2004, Singh y cols 2004).

Por otro lado, también se ha documentado que *E. histolytica* es capaz de sufrir apoptosis *in vitro* inducida por especies reactivas de nitrógeno, por el aminoglicósido G418 y por peróxido de hidrógeno (Ramos y cols 2007, Villalba y cols 2007, Ghosh y cols 2010). Se especula que el fenómeno es un mecanismo muy eficaz para evadir la respuesta inmune y para regular el tamaño de la población, favoreciendo la supervivencia y proliferación de los parásitos más aptos

y garantizando así el establecimiento dentro del hospedero (Bruchhaus y cols 2007).

Ramos y colaboradores demostraron el evento de MCP en *E. histolytica* inducido con especies reactivas de nitrógeno (Ramos y cols 2007), observando cambios después de 6 h como la fragmentación de DNA y disminución en los niveles de ATP; sin embargo, observaron que el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK y de CPs E-64, no tuvieron efecto sobre la apoptosis, sugiriendo que el proceso pudiera ser independiente de caspasas. La actividad hemolítica y la resistencia a complemento de los trofozoítos fueron casi totalmente inhibidas por las especies reactivas de nitrógeno, sugiriendo que las moléculas, como fosfolipasas y ameboporos podrían verse afectadas durante del evento de MCP.

Por otro lado, nuestro grupo demostró el evento de MCP inducido por el aminoglucósido G418 (Villalba y cols 2007). Cuyo tratamiento disminuye en 70% la viabilidad de trofozoítos después de 48 h. Morfológicamente el fenómeno se caracterizó (microscopia y citometría de flujo) por una reducción del tamaño celular, incremento en el número de vacuolas en el citoplasma, condensación y fragmentación de la cromatina después de 9 h de incubación, mientras que la membrana celular se mantuvo integra hasta después de las 12 h de incubación con el inductor. La fragmentación del DNA fue abolida por el inhibidor de CPs E-64, lo que sugirió que el evento era dependiente de CPs. Desde el punto de vista bioquímico, se observaron cambios tempranos después de 1 h de incubación con el inductor, incluyendo la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, la

disminución intracelular de potasio, el incremento citosólico de calcio y la disminución del pH intracelular.

Recientemente, Ghosh y colaboradores también demostraron la inducción de MCP inducida por el peróxido de hidrogeno. Ellos observaron una reducción del tamaño celular, fragmentación del DNA, externalización de fosfatidil serina y el aumento de especies reactivas de oxígeno. Estos resultados concuerdan con el estudio publicado por Ramos y colaboradores, con respecto a que los cambios fueron observados independientes de las CPs, debido a que el inhibidor de éstas, el E-64, no tuvo efecto sobre los cambios observados (Ghosh y cols 2010).

Recientemente, nuestro grupo ha encontrado evidencias que sugieren que *E. histolytica* es capaz de protegerse de la MCP inducida por antibióticos a través de la sobreexpresión de P-glicoproteínas, proteínas asociadas a mecanismos de resistencia a fármacos (datos no publicados). Esto es importante debido a que el tratamiento de la amibiasis es principalmente de tipo farmacológico, si bien en algunas circunstancias en las que el padecimiento es más severo, se necesita recurrir a procedimientos quirúrgicos para salvar la vida del paciente. Desafortunadamente, la presencia de casos de resistencia a fármacos en *E. histolytica* ya ha sido documentada en pacientes con abscesos hepáticos (Hanna y cols 2000), por lo que el estudio de MCP es importante debido a que recientemente se han descrito en otros parásitos resistencia a fármacos asociadas con proteínas potencialmente implicadas en MCP (Vergnes y cols 2007, Tsuda y cols 2006). Así, el estudio de MCP además de ser útil para definir *in vivo* el papel de algunos genes y la participación de estos en la interacción hospedero-parásito,

nos podrá permitir elucidar los mecanismos moleculares que podrían ser utilizados para identificar nuevos blancos moleculares para el desarrollo de drogas terapéuticas en la amibiasis.

2. JUSTIFICACIÓN

E. histolytica infecta alrededor del 10% de la población mundial, presentando diferentes manifestaciones clínico-patológicas, en parte por los mecanismos moleculares que participan en la expresión de los diferentes fenotipos de virulencia en la amiba, así como por factores externos del hospedero y el ambiente que los activa. En este sentido, comprender la relación hospedero-parásito es de suma importancia para poder desarrollar estrategias de control del parásito.

La MCP en patógenos constituye un factor importante para la relación hospedero-parásito, pues se especula que es un mecanismo muy eficaz que le permite evadir la respuesta inmune y regular el tamaño de su población favoreciendo la supervivencia y proliferación de los más aptos, garantizando el establecimiento de la infección.

Por esto, el estudio de expresión genética durante la MCP en *E. histolytica* permitirá conocer con más detalle la fisiología del parásito, contribuyendo a definir el papel de algunos genes y su participación en la interacción hospedero-parásito. Así mismo permitirá elucidar mecanismos moleculares que activa el parásito para que le proteja de la MCP inducidas por fármacos, lo que a su vez permitirá identificar nuevos blancos moleculares que contribuyan al desarrollo de drogas terapéuticas en la amibiasis.

Esto es importante debido a que el tratamiento de la amibiasis es principalmente de tipo farmacológico y desafortunadamente la presencia de casos de resistencia a fármacos en *E. histolytica* ya ha sido documentada en pacientes con abscesos

hepáticos, resistencia que en otros parásitos se ha asociado con proteínas potencialmente implicadas en MCP.

3. HIPÓTESIS

El Proceso de MCP en *Entamoeba histolytica* inducido por G418 genera cambios de expresión génica similares a los de eucariontes superiores, y estos cambios están basados en un programa genético.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General.

Determinar los cambios tempranos de expresión genética observados en la MCP inducida por G418 en *E. histolytica*.

4.2 Objetivos específicos.

Evaluar la síntesis *de novo* de las proteínas durante la MCP.

Identificar los cambios tempranos de expresión durante el proceso de MCP en *E. histolytica* mediante la técnica de AFLPs.

Identificar genes expresados de manera diferencial con el análisis de AFLPs mediante clonación y secuenciación.

Identificar en *E. histolytica*, mediante análisis *in silico*, proteínas análogas a las ya reportados en otros parásitos que participen en MCP.

Medir mediante PCR en tiempo real los cambios de expresión de los genes identificados mediante la técnica de AFLPs durante la MCP

Medir mediante PCR en tiempo real los cambios de expresión de los genes que codifican para las proteínas identificadas mediante el análisis *in silico* durante la MCP.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Cultivo de *E. histolytica* y condiciones de crecimiento

Trofozoítos de *E. histolytica* (clona A cepa HM1: IMSS) se cultivaron axénicamente en medio TYI-S-33 (Diamont 1978) a 37°C. La MCP fue inducida por adición de 10 µg/ml de G418 durante diferentes periodos de tiempo, como se indica.

5.2. Incorporación de ³⁵S durante el proceso de MCP

Estudios cinéticos de síntesis de proteínas durante la MCP inducida por G418, fueron evaluados por incorporación de metionina marcada radioactivamente con ³⁵S. Un millón de trofozoítos se incubaron por diferentes periodos de tiempo (0.5, 1, 2, 2.5, 3 y 6 h) en medio TYI-S-33 con 50 µl de 500 µCi L-[³⁵S] Metionina (Amersham) y 10 µg/ml de G418. Como control positivo de la inhibición de la síntesis de proteínas, los trofozoítos se incubaron con 25 µg/ml de emetina (un fuerte amebicida inhibidor de la síntesis proteica) y 50 µl de 500 µCi L-[³⁵S] Metionina y como control negativo se incubaron solamente con 50 µl de 500 µCi L-[³⁵S] Metionina. Después de la incubación, se tomaron 2 ml de cultivo y fueron mezclados en 2 ml Buffer de fosfatos salino (PBS) frío, pH de 7.4, los trofozoítos se colectaron por centrifugación a 2500 rpm durante 5 min y se lavaron y mezclaron con 3 ml de solución de centelleo. La radioactividad fue determinada en un contador Geiger WALLAC 1409 DSA Perkin Elmer usando el programa Easy count.

5.3. Extracción de RNA

Los trofozoítos de la clona A sin inducir, e inducidos a MCP con G418 por intervalos de tiempo de 0.5, 1, 3 y 6 h, fueron procesados para extraer RNA total.

La extracción se realizó según el método de Chomczynski y Sacchi, 1987, de acuerdo al siguiente protocolo:

Los trofozoítos se concentraron por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min y se lisaron con 1ml de trizol (Invitrogen), por aproximadamente $5-10 \times 10^6$ trofozoítos. Posteriormente, el lisado se centrifugó a 12, 000 rpm durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, al que se le adicionaron 0.2 ml de cloroformo (J.T. Baker). La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 s y posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 3 min. Para separar la fase acuosa de la mezcla, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C. Una vez separada la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se le adicionaron 0.5 ml de isopropanol (J.T. Baker) para precipitar el RNA, el cual una vez precipitado se lavó con 1 ml de etanol (J.T. Baker) al 75%, por cada ml de trizol adicionado. Posteriormente el RNA se secó al aire y se disolvió con agua/DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.05%.

5.4. Cuantificación del RNA por espectrofotometría

Para cuantificar el RNA extraído, se realizaron diluciones 1:50 y se tomaron lecturas a longitudes de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (GeneQuan *pro* Amersham Pharmacia). Posteriormente, se realizó el cálculo de la concentración según la siguiente fórmula:

Concentración de RNA en $\mu\text{g/ml}$ = 40 X absorbancia a 260 nm X factor de dilución.

La integridad del RNA se evaluó en geles desnaturalizantes de agarosa (Invitrogen) al 1%, teñidos con Bromuro de Etidio.

Todas las muestras fueron tratadas con DNasa (RQ1 RNase-Free DNase Promega) para evitar la contaminación por DNA genómico. De acuerdo con el siguiente protocolo:

Se preparó una mezcla de reacción con 1 U de enzima RQ1 por cada μg de RNA y la cantidad necesaria de buffer de enzima 1X, posteriormente se incubó la mezcla a 37°C durante 30 min, y pasado el tiempo de incubación se adicionó $1\mu\text{l}$ de solución de paro (EGTA 20mM pH= 8.0) para la enzima RQ1. Finalmente, se incubó la mezcla a 65°C durante 10 min, para inactivar la enzima.

5.5. Determinación de los Transcritos derivados de Fragmentos (TDFs) con la Técnica de cDNA-AFLPs (Polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados)

5.5.1. Síntesis de cDNA de doble cadena

La síntesis de cDNA de doble cadena se llevó a cabo utilizando el RNA total extraído de los trofozoítos de la clona A sin inducir, e inducidos a MCP con G418 por intervalos de tiempo de 1, 3 y 6 h con el Kit Super Script Double-Stranded cDNA Síntesis kit (Invitrogen). De acuerdo al siguiente protocolo:

Se preparó una mezcla con $1\mu\text{l}$ de de Oligo-dT (100 pmol/ μl) y $10\mu\text{l}$ de RNA total ($\leq 25\mu\text{g}$), se calentó la mezcla a 70°C durante 10 min, y se transfirió rápidamente a hielo. Posteriormente, se adicionó una mezcla de reacción de $4\mu\text{l}$ de Buffer First Strand 5X, $2\mu\text{l}$ de 0.1M DTT y $1\mu\text{l}$ de 10 mM de mezcla de dNTPs, se agitó suavemente y se incubó a 45°C durante 2 min para equilibrar la temperatura,

luego se le adicionó 1 μl de SuperScript II RT y se incubó a 45°C durante 1 h, al terminar la reacción el tubo se colocó en hielo.

La segunda cadena de DNA se sintetizó adicionando al tubo de la reacción anterior las cantidades de los reactivos que se indican en la tabla I en el orden señalado.

Tabla I. Mezcla de reacción para síntesis de la segunda cadena de cDNA

Componente	Volumen (μl)
Agua tratada con DEPC	91
Buffer de Segunda cadena 5X	30
Mezcla de dNTP's 10 mM	3
DNA ligasa de <i>E.coli</i> (10 U/ μl)	1
DNA polimerasa I de <i>E.coli</i> (10 U/ μl)	4
RNasa H de <i>E.coli</i> (2 U/ μl)	1
Volumen final	150

La mezcla de reacción se agitó suavemente y se incubó durante 2 h a 16°C, luego se le adicionaron 2 μl (10 U) de T4 DNA polimerasa, y se continuó la incubación a 16°C durante 5 min, posteriormente el tubo se colocó en hielo y se le adicionaron 10 μl de EDTA 0.5 M, y 160 μl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) (Invitrogen), se agitó vigorosamente, y se centrifugó a temperatura ambiente a 14,000 rpm durante 5 min para separar las fases, posteriormente se removieron cuidadosamente 140 μl de la fase acuosa y se transfirieron a un tubo limpio. El cDNA de doble cadena se precipitó con 70 μl de acetato de amonio 7.5 M, y 0.5 ml de etanol absoluto frío (J.T. Baker), mezclando vigorosamente y se recuperó

centrifugando a temperatura ambiente a 14,000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se removió y el pellet se lavó con 0.5 ml de etanol al 70%, luego se secó a 37°C por 10 min para remover el etanol residual, finalmente el cDNA se disolvió en agua destilada.

5.5.2. Cuantificación del cDNA de doble cadena por espectrofotometría

Para cuantificar el cDNA, se realizaron diluciones 1:50 y se tomaron lecturas a longitudes de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (GeneQuant pro Amersham Pharmacia). Posteriormente, se realizó el cálculo de la concentración según la siguiente fórmula:

Concentración de cDNA en $\mu\text{g/ml}$ = 50 X absorbancia a 260 nm X factor de dilución.

5.5.3. Digestión del cDNA de doble cadena con las enzimas de restricción *EcoRI* y *TaqI*

Una vez obtenido el cDNA de doble cadena, se procedió a digerirlo con las enzimas de restricción *EcoRI* y *TaqI* (Invitrogen). La doble digestión del cDNA se llevó a cabo en dos pasos, primero se utilizó *TaqI* y posteriormente *EcoRI*. Para lo cual, 400 ng de cDNA se incubaron durante 1 h a 65°C con 25 μl de una mezcla de reacción que contenía 5 U de *TaqI*, 50 mM Tris- HCl pH 8.0, 10 mM MgCl_2 y 50 mM NaCl. En el siguiente paso, a los 25 μl de la reacción anterior, se adicionaron 15 μl de una mezcla de reacción que contenía: 5 U de *EcoRI*, 50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl_2 y 100 mM de NaCl; resultando, un volumen final de 40 μl , el cual se incubó a 37°C durante 1 h.

5.5.4. Preparación de adaptadores de doble cadena

Los adaptadores se prepararon adicionando cantidades equimolares (10 μM para *EcoRI* y 100 μM para *TaqI*) de cada uno de los oligonucleótidos (Invitrogen) en sentido y en antisentido (Tabla II), diseñados para ligarse a los extremos cohesivos de los sitios de restricción *EcoRI* y *TaqI* generados por la digestión del DNA total. Los adaptadores quedaron a concentraciones finales de 5 μM y 50 μM para *EcoRI* y *TaqI*, respectivamente.

Una vez mezclados los oligonucleótidos, para llevar a cabo la hibridación se incubaron secuencialmente durante 10 min en un termociclador (Perkin-Elmer Gene Amp. PCR System 9600) a las temperaturas de 65°C, 37°C y 25°C. Posteriormente, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y finalmente se almacenaron a -20°C hasta ser utilizados. Para verificar la formación de oligonucleótidos de doble cadena, las hibridaciones se corrieron en un gel de agarosa al 4% teñido con Bromuro de Etidio.

5.5.5. Reacción de ligación de los adaptadores a los fragmentos de restricción

Para llevar a cabo la reacción de ligación de los adaptadores a los fragmentos de restricción, se adicionaron a los 40 μl de la doble digestión previamente realizada, 10 μl de una mezcla de reacción que contenía: 1 U de la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen), 5 pmol del adaptador para el sitio *EcoRI* y 50 pmol del adaptador para el sitio *TaqI*, 250 mM de Tris-HCl pH 7.6, 50 mM MgCl_2 , 5 mM ATP, 5 mM DTT y 25% polietilenglicol-8000; en un volumen final de 50 μl . La mezcla de reacción se incubó a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, este producto se diluyó (1:10)

con agua bidestilada estéril y se utilizó como DNA blanco para realizar las reacciones de amplificación por PCR.

5.5.6 Amplificación de los fragmentos de cDNA por medio de la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa

La amplificación de los fragmentos una vez ligados a los adaptadores, se llevó a cabo en dos pasos denominados, PCR preselectiva y PCR selectiva. Primero se realizó la PCR preselectiva en donde se utilizó como DNA blanco el cDNA producto de la ligación y como iniciadores, oligonucleótidos preselectivos cuya secuencia es complementaria al adaptador, más un nucleótido adicional en el extremo 3' (ver tabla II). Posteriormente, se realizó la PCR selectiva en donde se utilizó como DNA blanco el producto de la PCR preselectiva y como iniciadores oligonucleótidos iguales en secuencia al oligonucleótido preselectivo, pero con dos nucleótidos adicionales en el extremo 3', denominados oligonucleótidos selectivos (tabla II).

5.5.6.1. Amplificación de los fragmentos de cDNA por PCR preselectiva

A 5 μ l de cDNA, previamente diluido (1:10) proveniente de la ligación, se le adicionaron 20 μ l de una mezcla de reacción que contenía: 0.5 U *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen), 1 μ M de cada uno de los oligonucleótidos preselectivos, (E01 para *EcoRI* y T01 ó T02 para *TaqI*), 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de cada uno de los cuatro dNTPs y buffer I X para la enzima *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen). La mezcla de reacción fue sometida a las siguientes condiciones en un Termociclador Perkin-Elmer Gene Amp. PCR System 9600. Una desnaturalización a 94°C por 10 min, seguido de 30 ciclos de amplificación:

94°C, 1 min, 56°C 1 min y 72°C 1 min, al término de los ciclos de PCR se aplicó una extensión final de 72°C por 10 min. El producto de esta reacción fue diluido (1:10) y utilizado como DNA blanco para la siguiente reacción. Como control negativo de la PCR, se empleó la misma mezcla de reacción sometida a las mismas condiciones, pero sin DNA blanco.

5.6.6.2. Amplificación de los fragmentos de cDNA por PCR selectiva

A 5 µl de cDNA previamente diluido (1:10) proveniente de la PCR preselección, se le adicionaron 20 µl de una mezcla de reacción que contenía: 0.5 U *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen), 1 µM de una combinación de los oligonucleótidos denominados selectivos, uno para *EcoRI* (E-32 a E-45) y uno para *TaqI* (T-32 a T-51), 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada uno de los cuatro dNTPs y buffer 1X para *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen). Las mezclas de reacción fueron sometidas a las siguientes condiciones en un Termociclador Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 9600. Una desnaturalización a 94°C por 10 min; Posteriormente 5 ciclos a 94°C 1 min, 65°C 1 min y 72°C 1 min; 5 ciclos a 94°C 1 min, 60°C 1 min y 72°C 1 min; y 30 ciclos a 94°C 1 min, 56°C 1 min y 72°C 1 min; finalmente al término de los ciclos se dio una extensión final de 72°C por 10 min. El producto de esta reacción fue almacenado a -20°C hasta su análisis.

Tabla II. Secuencias de adaptadores y oligonucleótidos utilizados en el análisis de AFLPs (Vos y cols 1995)

Nombres	Secuencia
Adaptador de <i>EcoRI</i>	
Cadena líder	5' CTC GTA GAC TGC GTA CC 3'
Cadena complementaria	5' AAT TGG TAC GCA GTC TAC 3'
Adaptador de <i>TaqI</i>	
Cadena líder	5' GAC GAT GAG TCC TGA C 3'
Cadena complementaria	5' CGG TCA GGA CTC AT 3'
Oligonucleótidos preseleccionados *	
E01	5' GAC TGC GTA CCA ATT CA 3'
T01	5' GAT GAG TCC TGA CCG AA 3'
T02	5' GAT GAG TCC TGA CCG AC 3'
Oligonucleótidos selectivos para el sitio <i>EcoRI</i> **	
E33	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAAG 3'
E35	5' GAC TGC GTA CCA ATT CACA 3'
E38	5' GAC TGC GTA CCA ATT CACT 3'
E39	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAGA 3'
E42	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAGT 3'
E44	5' GAC TGC GTA CCA ATT CATC 3'
E45	5' GAC TGC GTA CCA ATT CATG 3'
Oligonucleótidos selectivos para el sitio <i>TaqI</i> **	
T32	5' GAT GAG TCC TGA CCG AAAC 3'
T33	5' GAT GAG TCC TGA CCG AAAG 3'
T35	5' GAT GAG TCC TGA CCG AACA 3'
T38	5' GAT GAG TCC TGA CCG AACT 3'
T48	5' GAT GAG TCC TGA CCG ACAC 3'
T49	5' GAT GAG TCC TGA CCG ACAG 3'
T50	5' GAT GAG TCC TGA CCG ACAT 3'
T51	5' GAT GAG TCC TGA CCG ACCA 3'

* La letra en negrilla en la secuencia de los oligonucleótidos preseleccionados, señala el nucleótido adicional en el extremo 3', con respecto a la secuencia complementaria de los adaptadores de los sitios de restricción *EcoRI* y *TaqI*.

** Las letras en negrilla en la secuencia de los oligonucleótidos selectivos, señala los dos nucleótidos adicionales en el extremo 3', con respecto a la secuencia de los oligonucleótidos preseleccionados.

5.5.7. Análisis de fragmentos por electroforesis

Del producto de las PCR selectivas, se tomaron 5 μ l y fueron separados en un gel (15 X 17 cm) de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 29:1) y TBE IX (Tris-HCl 88 mM, ácido bórico 88 mM, EDTA 2 mM) al 12%, en una cámara de electroforesis vertical modelo V-15-V17 (Gibco BRL Life Technologies) a un voltaje constante de 150 volts durante 3 h. Posteriormente, el gel fue teñido con una solución de Bromuro de Etidio en TBE I X (0.5 μ g/ml), visualizado y fotodocumentado con un equipo Kodak EDAS 290.

5.6. Reproducibilidad y especificidad de la técnica cDNA-AFLPs

Para comprobar la reproducibilidad de la técnica, se realizaron por duplicado las reacciones de amplificación preselectiva y selectiva con cDNA obtenido de amiba. La especificidad de la técnica se comprobó analizando por duplicado diferentes e independientes muestras de RNA obtenidas de trofozoítos y sangre humana.

5.7. Búsqueda de transcritos derivados de fragmentos (TDFs) que se expresan diferente en los trofozoítos no estimulados y estimulados con G418

Una vez que la metodología se estandarizó, se realizaron todas las combinaciones posibles entre un oligonucleótido iniciador selectivo para sitio *TaqI* y uno para el sitio *EcoRI* (tabla II) para realizar las PCRs selectivas. El número total de oligonucleótidos selectivos utilizados fue de 15 (8 para el adaptador de *TaqI* y 7 para el adaptador de *EcoRI*) y las combinaciones realizadas fueron 56.

La búsqueda de los transcritos que se expresaron diferente en los trofozoítos sin inducir la MCP y aquellos inducidos a MCP, se realizó en geles de poliacrilamida al 12%, utilizando la metodología ya descrita.

5.8. Purificación, clonación y secuenciación de TDFs

Los fragmentos de interés fueron cortados del gel de poliacrilamida y purificados con el kit QIAEX II (Qiagen) siguiendo el protocolo que se describe a continuación. Se cortó el gel que contenía la banda de DNA, se pesó y se adicionaron de 1 a 2 volúmenes de buffer de elución (acetato de amonio 0.5 M; acetato de magnesio 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8.0; y SDS al 1%) por 1 volumen de gel (100 a 200 μ l por 100 mg de gel), posteriormente se incubó a 50°C durante 30 min, se microcentrifugó 1 min, se removió el sobrenadante usando pipeta Pasteur y se paso a través de una columna o papel filtro para eliminar el exceso de gel. Se calculó el volumen del sobrenadante recuperado, para fragmentos menores a 100 pb, se adicionaron 6 volúmenes de buffer QXI (QIAEX II Qiagen) por volumen de muestra y para fragmentos mayores de 100 pb 3 volúmenes del mismo, posteriormente se adicionaron 10 μ l de la suspensión QIAEXII (QIAEX II Qiagen), se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 10 min, se centrifugó durante 30 s y se removió el sobrenadante, posteriormente se lavó el pellet 2 veces con 500 μ l de Buffer PE(QIAEX II Qiagen), se secó al aire y se eluyó con 20 μ l de agua. Finalmente se centrifugó durante 30 s y el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un tubo limpio.

Una vez purificados los fragmentos se reamplificaron con el juego de oligonucleótidos usado para generarlos y las condiciones de la PCR selectiva

antes citada, después de checar los reamplificados en geles de agarosa por electroforesis, se clonaron con el Kit TA Cloning Kit Dual promoter (pCR II) (Invitrogen) y posteriormente se secuenciaron utilizando un secuenciador ABI Prism 377 DNA Sequencing Systems, (Applied Biosystems). Alternativamente, los fragmentos se secuenciaron directamente. La homología fue determinada por comparación con la base de datos usando el algoritmo BLAST del Centro Nacional para la investigación en Biotecnología (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y del Centro de Fuente Bioinformática para *E. histolytica* Pathema del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID) (<http://pathema.tigr.org/tigr-scrpts/Entamoeba/PathemaHomePage.cgi>) de Estados Unidos.

5.9. Identificación en el genoma de *E. histolytica* de proteínas reportadas en otros parásitos relacionados con MCP mediante análisis *in silico*

En paralelo a la búsqueda de TDFs realizamos un análisis *in silico* para investigar en *E. histolytica* la presencia de proteínas homólogas a las que participan en MCP reportados en otros parásitos. Para esto se realizaron búsquedas de estas proteínas en las base de datos del NCBI y Centro de Información Bioinformática Pathema- *Entamoeba* del NIAID usando el algoritmo BLAST, y posteriormente se hicieron alineamientos de la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por los genes encontrados, utilizando el programa Bio Edit versión 7.0 (Hall TA 1999). Posteriormente se diseñaron oligonucleótidos para evaluar los niveles de expresión de los genes que codifican para estas proteínas en trofozoítos sin inducir e inducidos a MCP.

5.10. Cuantificación de RNAm por PCR en tiempo real

Para confirmar el patrón de expresión observado con la metodología de cDNA-AFLPs en los TDFs aislados, y para evaluar el nivel de expresión de los genes que codifican para las proteínas identificadas mediante el análisis *in silico* durante la MCP, se diseñaron oligonucleótidos para realizar pruebas de PCR cuantitativa. Para este análisis se aisló el RNA y se sintetizó el cDNA por triplicado con trofozoítos sin inducir a MCP e inducidos a MCP con G418 por intervalos de tiempo de 0.5, 1, 3 y 6 h.

Los oligonucleótidos para estos ensayos se diseñaron utilizando el programa Primer Express 2.0 desarrollado por Applied Biosystems. La secuencia de todos los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la PCR, así como la del gen que codifica para Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (*g3pdh*) utilizado como control endógeno se muestran en la tabla III.

Tabla III. Oligonucleótidos usados para la RT-PCR Cuantitativa

Gen	Secuencias de Oligonucleótidos
<i>grainina-1</i>	G1S: 5' GCT GCT CAA GAT GCA TGG ATC 3' G1A: 5' CTT AAA GAC ATG CAT AAT GGA TAC CAC 3'
<i>grainina-2</i>	G2S: 5' GAA AGC TAA ATT CCC AGG AGG AAT 3' G2A: 5' CAA AGA ATC CAA TTG ATC CTG ACA TAT 3'
<i>saponina-like</i>	SS: 5' TGC TGC AAC AAG AGA AGG AGC 3' SA: 5' GTC TAA CAG CTT GAG CAC CAT CA 3'
<i>40S</i>	40S: 5' CAG AAA AGG ATT TGC TAA ATC CAT TC 3' 40A: 5'CAA GGA AGG ATG GAA CAT CAA CA 3'
<i>sir-2</i>	S2S: 5' CAA GGC ACA TAC TTT CCA ACA AAA 3' S2A: 5' TCA AGA CCA TCA ATG TTC TGA GTG TA 3'
<i>glutaminil-tRNA sintetasa</i>	GS: 5' CCT GAT CAA ATT GCT GCT TCA C 3' GA: 5' CCT TGA CAC ATC CAT TTA AAG TGT TT 3'
<i>g3pdh</i>	GAPS: 5' CCG TCC ACA GAC AAT TCG AA 3' GAPA: 5' TTG AGC TGG ATC TCT TTC AGC TT 3'

5.10.1. Síntesis del cDNA para la amplificación en tiempo real

El RNA se aisló, se cuantificó y se trató con DNAsa utilizando la metodología ya descrita. El cDNA se sintetizó utilizando el Kit Cloned AMV First Strand cDNA (Invitrogen) siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

En un tubo de 0.5 ml se preparó la mezcla de 50µM de Oligo (dT)₂₀, 500 ng de RNA y mezcla de dNTP (10 mM), ajustando el volumen a 12 µl con agua-DEPC. Posteriormente, la mezcla se incubó a 65°C por 5 min y se colocó en hielo. Después se preparó en un tubo de 0.2 ml la mezcla de reacción que se presenta en la tabla IV, se agitó suavemente y se transfirió el contenido de la mezcla de reacción preparada en el tubo de 0.5ml. La mezcla final se incubó 50 min a 50°C, seguido de 85°C por 5 min en un Termociclador Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 9600.

Una vez sintetizado el cDNA, se diluyó 1:3 con agua y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Tabla IV. Mezcla de reacción para síntesis cDNA de una cadena

Componente	Reacción
Buffer 5X para cDNA	4µl
DTT 0.1M	1µl
RNase OUT (40U/µl)	1µl
Agua tratada con DEPC	1µl
Enzima Cloned AMV-RT(15U/µl)	1µl
Volumen total	8µl

5.10.2. Amplificación de genes por PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se realizó en un equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System-SDS versión del programa 1.1 PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, utilizando SYBR Green como sistema de detección y el Kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 12.5 µl los cuales contenían 6.25 µl del Master Mix SYBR Green, 1.75µl de agua, 2.5µl del templado y 1.25µl de cada uno de los iniciadores a concentraciones diferentes previamente estandarizadas para obtener la mejor amplificación (para amplificar los genes *g3pdh*, *grainina-2* y *saponina-like* se utilizaron concentraciones equimolares de 3 µM para cada iniciador; para amplificar el gen *grainina-1* se utilizaron concentraciones equimolares de 9 µM para cada iniciador; para amplificar el gen *sir-2* se utilizaron concentraciones de 9 y 0.5 µM para los iniciadores sentido y antisentido respectivamente y para

amplificar el gen *40S* se utilizaron concentraciones de 0.5 y 3 μM para los iniciadores sentido y antisentido respectivamente).

Las reacciones se realizaron por triplicado en placas ópticas de 96 pozos y se sometieron a las condiciones de 95°C por 10 min y 40 ciclos de 95°C por 15 s y 60°C por 1 min.

5.10.3. Curvas de disociación de los genes amplificados

Finalizada la PCR, las reacciones se sometieron a incrementos de temperatura desde 60°C a 95°C para construir una curva de disociación de cada gen amplificado. Esta curva se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente después de la PCR, para monitorear la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Mediante esta aplicación se puede determinar la T_m de los amplicones para comprobar su especificidad.

5.10.4. Método de cuantificación

En la PCR de tiempo real, los valores de fluorescencia son medidos cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado en la reacción. Entre más templado presente una reacción al comienzo de la PCR, menor es el número de ciclos que se necesitan para alcanzar un punto en el que la fluorescencia es medida por encima de la fluorescencia normal de la reacción (C_T). Nosotros utilizamos el método de cuantificación relativa. En este método, se compara el C_T de la muestra desconocida contra una muestra calibradora que sirve como referencia fisiológica (muestras provenientes de trofozoítos sin inducción a MCP). Todas las cuantificaciones, también son normalizadas con un control endógeno (gen que no modifica su expresión por el tratamiento), como el gen que codifica

para Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*g3pdh*) para tener en cuenta la variación en la concentración inicial, calidad de RNA y en la eficiencia de reacción en la transcripción reversa.

El método del $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y cols 2001) es un método conveniente para analizar los cambios de expresión relativa, este método es similar al de la cuantificación absoluta por curva estándar, excepto que en este método se utilizan fórmulas aritméticas para alcanzar el mismo resultado. Este último método fue seleccionado debido a que es sencillo, fácil de manejar y de análisis rápido.

Primero, se determinó el C_T del producto de gen problema (C_T Pb) y del control interno *g3pdh* (C_T *g3pdh*), en cada muestra. Con estos datos se calculó el ΔC_T , el cual resultó de la diferencia de ambos; y se calculó para normalizar las diferencias en la extracción del RNA y en la eficiencia de la reacción de síntesis de cDNA. Posteriormente, se calculó el $\Delta\Delta C_T$ en cada muestra, este se obtuvo de la diferencia del ΔC_T de cada muestra y del ΔC_T del calibrador (trofozoítos no inducidos a MCP, utilizados como base para comparar los resultados). Por último, la expresión de gen Pb, normalizada con el control endógeno (*g3pdh*) y relativa al calibrador, se calculó por $2^{-\Delta\Delta CT}$. Así, la diferencia en la expresión de gen Pb se expresó como *n*-veces relativa al calibrador. Las ecuaciones que se consideraron para calcular $\Delta\Delta C_T$ para el método de cuantificación relativa fueron:

$$C_T \text{ gen Pb} - C_T \text{ g3pdh} = \Delta C_T.$$

$$\Delta C_T \text{ de la muestra} - \Delta C_T \text{ del calibrador} = \Delta\Delta C_T.$$

$$\text{Cantidad relativa} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

5.10.5. Selección del control endógeno

El análisis de un control endógeno se determina para normalizar las diferencias en la extracción del RNA y la eficiencia de la reacción de síntesis de cDNA. Los genes utilizados más frecuentemente como controles endógenos en PCR en tiempo real son la *actina*, *β2-microglobulina*, *gapdh*, y *rRNA*. El control endógeno seleccionado debe ser validado para determinar que su expresión no es afectada por el tratamiento experimental.

Para seleccionar el control endógeno, determinamos la cantidad relativa de los genes *actina* y *gapdh* en cDNA correspondiente a cada RNA extraído de los trofozoítos en incubación, con 0.5, 1, 3 y 6 h de incubación con el inductor, así como de trofozoítos sin tratamiento.

La determinación se realizó por amplificación con PCR en tiempo real como se describió anteriormente y la cantidad relativa de cada uno de estos genes, se determinó con la fórmula:

$$\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ tiempo } x} - \Delta C_{T \text{ tiempo } 0}$$

Finalmente elegimos como gen endógeno aquel que no mostraba una relación estadísticamente significativa entre el tratamiento a lo largo del tiempo y la cantidad relativa.

5.10.6. Eficiencia de la amplificación

Para que el método de cuantificación relativa sea válido, la eficiencia en la amplificación de gen problema y el control interno previamente seleccionado, debían ser aproximadamente iguales. Para determinar esta eficiencia, se realizaron cinco diluciones decuples seriadas del producto de PCR, previamente

cuantificado a 260 nm, el cual contenía el fragmento esperado para cada gen, posteriormente estas diluciones se amplificaron por triplicado bajo las condiciones antes descritas para obtener los valores de C_T . Estos, fueron graficados contra el logaritmo de la concentración total de fragmento de PCR y se calculó la regresión lineal. El valor de la pendiente fue utilizada para calcular la eficiencia (Rasmussen 2001) con la ecuación siguiente:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$$

5.10.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos y los gráficos se realizaron utilizando los programas Sigma STAT 2.03 y Sigma Plot versión 10.0. Se usó ANOVA y Tukey para comparar los cambios de expresión entre los trofozoitos de la clona A sin inducir a MCP e inducidos a MCP con G418 en los diferentes tiempos.

6. RESULTADOS

En este trabajo se analizó la expresión diferencial de los trofozoítos de *E. histolytica* durante el proceso de MCP para investigar si los cambios morfológicos y bioquímicos que previamente reportamos (Villalba y cols 2007), estaban asociados a cambios moleculares que reflejaran un programa genético.

Dado que la MCP implica la participación de las proteínas en rutas específicas que requieren energía y programación genética (Edinger y cols 2004), el primer ensayo que realizamos fue determinar si el antibiótico G418, a pesar de que es un fármaco que bloquea la traslocación ribosomal, y por lo tanto la síntesis de proteínas, es capaz de inducir la síntesis específica de proteínas *de novo* durante la MCP, con la incorporación de metionina marcada con ^{35}S .

Como podemos observar en la figura 4 los trofozoítos no tratados con G418 mostraron una incorporación exponencial de metionina marcada con ^{35}S durante las primeras 3 h de incubación, hasta un máximo de 2500 cpm/ml que se mantuvo de manera estacionaria en las siguientes 3 h. En contraste, los trofozoítos inducidos a MCP, mostraron un pico importante en la incorporación, la cual llegó a un máximo de 5286 cpm/ml a las 1.5 h de incubación y posteriormente la incorporación disminuyó en la siguiente hora hasta llegar a niveles de incorporación similares a los trofozoítos que no fueron inducidos a MCP, este nivel se mantuvo durante todo el ensayo. Estos resultados sugieren que los cambios morfológicos y bioquímicos que previamente reportamos, podrían estar relacionados con la activación de mecanismos moleculares específicos. Como controles negativos de la síntesis de proteínas, los trofozoítos no tratados con

G418 fueron incubados sin metionina marcada con ^{35}S y trofozoítos tratados con G418 fueron co-incubados con metionina marcada con ^{35}S y emetina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, observándose que no se presentó un efecto de inducción.

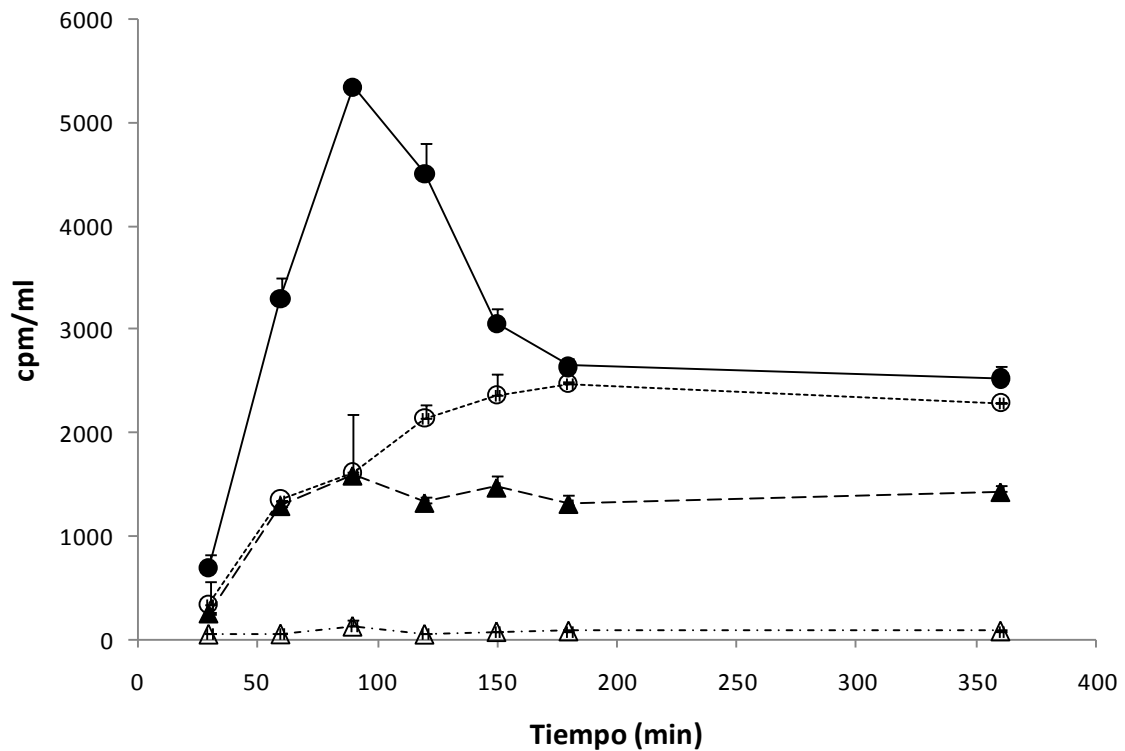


Figura 4. Cinética de Incorporación de metionina marcada con ^{35}S durante la inducción de MCP. La síntesis de proteínas se siguió por triplicado midiendo la incorporación de metionina marcada con ^{35}S durante el curso de 6 h (●) Trofozoítos inducidos a MCP con G418; (⊕) Trofozoítos no inducidos a MCP; (▲) Trofozoítos en MCP co-incubados con 25µg/ml de emetina (Δ) representa el control interno de trofozoítos no inducidos a MCP crecidos sin metionina marcada con ^{35}S .

Con la certeza de que los trofozoítos en MCP eran activos bioquímicamente, iniciamos el análisis de los cambios de expresión genética. Para explorar estos cambios, comparamos los patrones de expresión del cDNA generados por la técnica de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLPs) entre

trofozoítos en cultivo axénico sin inducir e inducidos a MCP. Para este análisis partimos de cultivos axénicos de trofozoítos incubados con el inductor de MCP a los tiempos de 1, 3 y 6 h, así como de trofozoítos sin inducir a MCP utilizados como controles. Posterior a la realización de la cinética de inducción, purificamos el RNA, y verificamos su pureza e integridad en geles desnaturalizantes de agarosa con formamida. Los resultados mostraron que el RNA estaba integro, en la figura 5 se aprecia en todos los carriles una señal difusa a lo largo de todo el gel, que corresponde al RNAm, dos bandas superiores bien definidas correspondientes al RNA ribosomal 28S y 18S y unas bandas inferiores difusas que podrían corresponder a RNA ribosomal 5S y/o a RNA de transferencia.

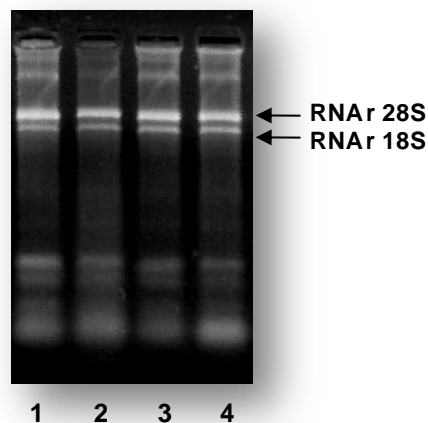


Figura 5. Pureza e integridad del RNA de los trofozoítos en estudio. El RNA fue obtenido utilizando el método descrito por Chomezynski y cols (1987) con Trizol y su integridad fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Carril 1, RNA de trofozoítos sin inducción a MCP, carriles 2, 3 y 4 RNAs de trofozoítos inducidos a MCP con G418 incubados durante 1, 3 y 6 h, respectivamente.

Una vez extraído y cuantificado, el RNA se trató con DNasa para limpiar al RNA de posibles trazas de contaminantes de DNA genómico.

Como se puede observar en la figura 6, el tratamiento con DNasa se verificó al observar la ausencia de amplificación después de hacer una PCR para un fragmento del gen de *actina*.

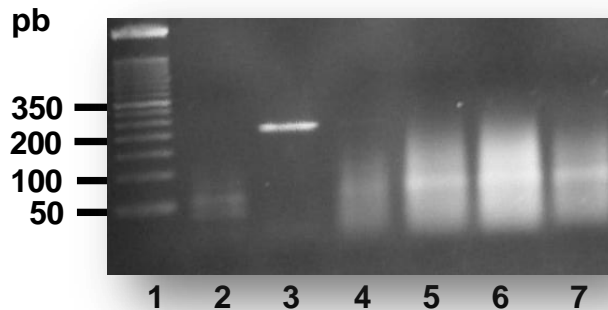


Figura 6. Amplificación de un fragmento del gen de *actina* a partir de RNA tratado con DNasa. El RNA fue tratado con DNasa y posteriormente utilizado como templado para amplificar un fragmento de aproximadamente 250 pb del gen de *actina*; los productos de PCR se presentan en gel de agarosa al 3%. Carril 1, marcador de tamaño molecular 50 pb (Invitrogen); carril 2, control negativo de la PCR sin DNA templado; carril 3 control positivo de la PCR en el que se adicionó 100 ng DNA de ameba como templado; carril 4, RNA de trofozoítos sin inducir a MCP; carriles 5, 6 y 7, RNAs de trofozoítos inducidos a MCP con G418 a 1, 3 y 6 h de incubación respectivamente.

Una vez tratado el RNA con DNAsas se procedió a sintetizar el cDNA de doble cadena, utilizando el Kit Super Script Double–Stranded cDNA. La eficiencia de la síntesis se verificó al observar los productos de amplificación de un fragmento del gen de *actina* en todas las muestras (figura 7).

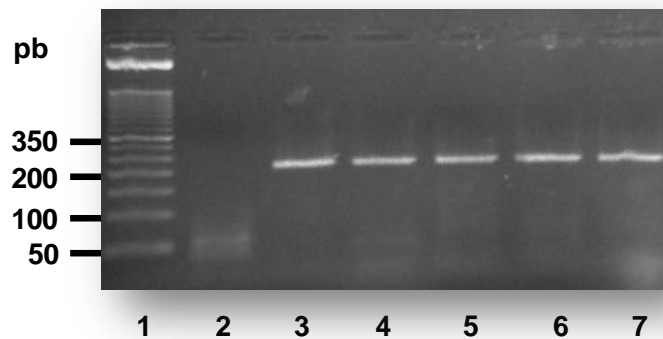


Figura 7. Amplificación de un fragmento del gen de *actina* a partir de cDNA de doble cadena. El cDNA de doble cadena fue sintetizado y posteriormente se utilizó como templado para amplificar un fragmento del gen de *actina*; los productos de PCR se presentan en gel de agarosa al 3%. Carril 1, marcador de tamaño molecular 50 pb (Invitrogen); carril 2, control negativo de la PCR sin DNA templado; carril 3 control positivo de la PCR en el que se adicionó 100 ng de DNA de amiba como templado; carril 4, amplificado para el gen de *actina* en el que se utilizó como templado cDNA de trofozoítos sin inducir a MCP; carriles 5, 6 y 7 amplificados para el gen de *actina* en el que se utilizó como templado cDNA de trofozoítos inducidos a MCP con G418 a 1, 3 y 6 h de incubación respectivamente.

Una vez comprobada la síntesis del cDNA de doble cadena, se procedió a llevar a cabo la doble digestión del cDNA, utilizando las enzimas *TaqI* y *EcoRI* de manera secuencial. Los fragmentos de restricción obtenidos fueron ligados a los adaptadores.

La hibridación de los adaptadores se verificó en un gel de agarosa al 4% en donde se observó la diferencia de migración de los oligonucleótidos de cadena sencilla comparado con los oligonucleótidos de doble cadena debido al aumento en el tamaño molecular en estos últimos (figura 8).

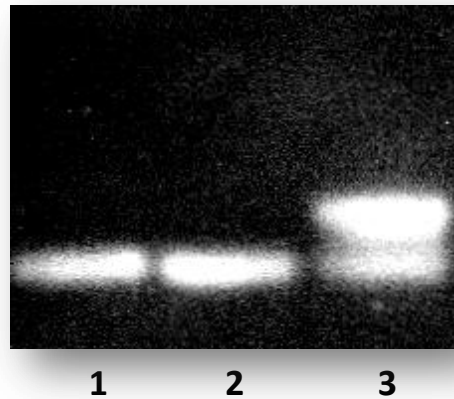


Figura 8. Análisis electroforético de la hibridación de los adaptadores de doble cadena para el sitio *EcoR* I. Los oligonucleótidos complementarios *EcoR* I de cadena sencilla fueron hibridados en concentraciones equimolares y analizados por electroforesis en geles de agarosa al 4%. Carriles 1 y 2 oligonucleótidos de cadena sencilla en sentido y antisentido respectivamente; carril 3, retardo en la migración de los oligonucleótido de doble cadena hibridado.

Una vez verificada la hibridación de los adaptadores, se ligaron a los fragmentos de restricción previamente obtenidos. La reacción de ligación se pudo comprobar por la amplificación de los fragmentos ligados mediante la PCR realizada con los oligonucleótidos preselectivos y selectivos.

Es importante señalar que en la PCR realizada con los oligonucleótidos preselectivos no se observaron fragmentos bien definidos, debido a la gran cantidad de fragmentos amplificados como consecuencia de la baja selectividad de este tipo de oligonucleótidos (figura 9 carriles 3 y 4), mientras que al realizar la PCR con los oligonucleótidos selectivos, se observaron fragmentos bien definidos y en mucha menor cantidad debido a que en esta reacción se utiliza como templado el producto de la PCR preselectiva y por lo tanto solo se amplifican

algunos de los fragmentos previamente amplificados capaces de alinean con los oligonucleótidos selectivos utilizados en esta reacción (figura 9 carriles 6 y 7).

Como un control positivo de la PCR preselección y selectiva se analizó el cDNA de humano (figura 9 carriles 4 y 7). En la PCR preselección para el cDNA humano (figura 9 carril 4) se aprecia una señal difusa a lo largo de todo el carril, abarcando todos los tamaños indicados por el marcador de tamaño molecular; mientras que con el cDNA de *E. histolytica*, solo se aprecian pocos fragmentos, sin mostrar señal difusa a lo largo de todo el carril (figura 9 carril 3); esto se observa mas claro en la PCR selectiva (figura 9 carriles 6 y 7), donde se aprecian para el cDNA de humano un mayor número de fragmentos de tamaños inclusive superiores a 250 pb en comparación con el DNA de amiba que muestra un menor número de fragmentos de tamaños inferiores a 250 pb.

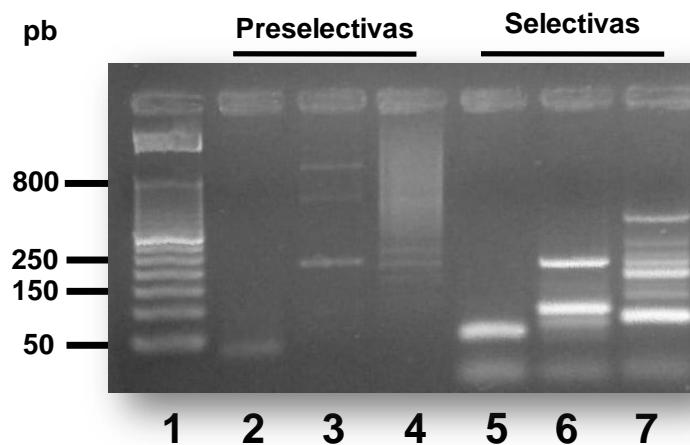


Figura 9. Patrones polimórficos generados durante la amplificación preselección y selectiva. Amplificaciones preselección y selectiva para el DNA de amiba y el DNA de humano en las que se emplearon los oligonucleótidos preselección E01 y T01 y oligonucleótidos selectivos E33, T32. Carril 1, marcador de tamaño molecular de 50 pb (Invitrogen); carriles 2 y 5, control negativo de la PCR preselección y selectiva respectivamente sin DNA templado; carriles 3 y 4 productos de PCR preselección de amiba y humano respectivamente; carriles 6 y 7 productos de PCR selectiva de amiba y humano respectivamente.

La reproducibilidad de la técnica se comprobó al realizar independientemente las reacciones de amplificación con cDNA por duplicado, observándose fragmentos idénticos en tamaño molecular.

Una vez estandarizada la técnica de cDNA-AFLPs, se empleó el cDNA de trofozoítos con y sin inducción a MCP para buscar transcritos derivados de fragmentos (TDFs) que se expresaran diferencialmente. Para esto, se realizaron 56 combinaciones diferentes entre un oligonucleótido iniciador selectivo para sitio *TaqI* y uno para el sitio *EcoRI* para realizar las PCRs selectivas. El número de oligonucleótidos selectivos utilizados fue de 8 para el adaptador de *TaqI* y 7 para el adaptador de *EcoRI*. De las 56 combinaciones diferentes realizadas solo 9 (E33-T32, E33-T33, E33-T38, E33-T51, E35-T32, E35-T35, E35-T51, E38-T32, E38-T49) generaron polimorfismo (tabla V).

Tabla V. Combinaciones de oligonucleótidos selectivos que generaron polimorfismo

**nucleótidos adicionales al extremo 3' del oligo selectivo
5'GATAGTCCTGACCGA NNN3'**

	T32 AAC	T33 AAG	T35 ACA	T38 ACT	T48 CAC	T49 CAG	T50 CAT	T51 CCA
E33 AAG	*	*		*				*
E35 ACA	*		*					*
E38 ACT	*					*		
E39 AGA								
E42 AGT								
E44 ATC								
E45 ATG								

**nucleótidos adicionales al extremo 3' del oligo selectivo
5'GACTGCCGTACCAATTCNNN 3'**

Se obtuvieron 272 fragmentos de transcritos en el rango de 50 y 300 pb, pero solo se purificaron los fragmentos mayores a 100 pb para evitar inespecificidad, los que resultaron ser 108, de los cuales 53 fueron expresados de manera diferente entre los trofozoítos control y los trofozoítos inducidos a MCP, 32 incrementaron su expresión durante el evento de MCP y 21 la disminuyeron (tabla VI).

Tabla VI. Resultados del análisis de cDNA-AFLPs

Características de los fragmentos obtenidos después de inducción a MCP	Número de Fragmentos
Fragmentos obtenidos (50-300 pb)	272
Fragmentos obtenidos mayores a 100 pb	108
Fragmentos diferencialmente expresados	53
Fragmentos que aumentaron su expresión en MCP	32
Fragmentos que disminuyeron su expresión en MCP	21

La figura 10, muestra algunos patrones representativos de los fragmentos obtenidos con la metodología de cDNA-AFLPs utilizando diferentes combinaciones de oligonucleótidos como cebadores para la PCR selectiva. Los asteriscos muestran algunos de los diferentes tipos de TDFs. Por ejemplo, los carriles 3, 4 y 5 presentan un transcrito expresado durante la inducción de la MCP, que está ausente en los trofozoítos no inducidos a MCP (carril 2). Los carriles 6 y 7 representan un transcrito que está presente en los trofozoítos no inducidos a MCP, así como en los trofozoítos incubados durante 1 h con el inductor de MCP, pero este transcrito no se expresó a las 3 y 6 h de incubación con el inductor (carriles 8 y 9). También se encontraron transcritos que no cambiaron durante el curso de la MCP como los indicados en los carriles 10, 11, 12 y 13.

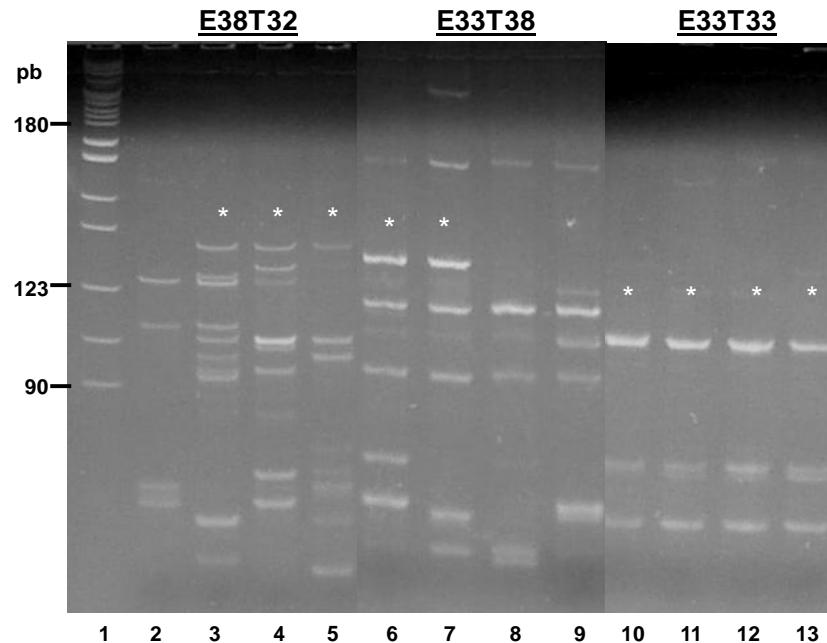


Figura 10. Patrones representativos de los TDFs obtenidos con la metodología de cDNA-AFLP's en trofozoítos sin y con inducción a MCP durante 3 y 6 h. Empleando 56 diferentes combinaciones de oligonucleótidos como iniciadores para la PCR selectiva y utilizando como templado cDNA de trofozoítos (sin inducir a MCP e inducidos a MCP con G418 a 1, 3 y 6 h), se realizaron los AFLPs. En la figura se muestran geles de poliacrilamida al 12% que representan algunos de los patrones representativos del análisis de cDNA-AFLPs con 3 combinaciones diferentes de iniciadores (E38-T32, E33-T38 y E33-T33). El carril 1 representa el marcador de tamaño molecular pBR322/*MspI*, los carriles 2, 6 y 10 representan los patrones obtenidos del análisis del cDNA-AFLPs para los trofozoítos no tratados con G418; los carriles 3, 7 y 11 representan los cDNA-AFLP para los trofozoítos tratados con G418 por 1 h; los carriles 4, 8 y 12 representan los cDNA-AFLPs para los trofozoítos tratados con G418 por 3 h, los carriles 5, 9 y 13 representan los cDNA-AFLPs para los trofozoítos tratados con G418 por 6 h. Los asteriscos señalan algunos ejemplos de los diferentes patrones de expresión de los TDFs obtenidos.

De los 108 fragmentos mayores a 100 pb que se expresaron de manera diferencial, solo se pudieron extraer de poliacrilamida 15, debido a que no todas las bandas mostraron la misma intensidad, por lo que las más tenues se perdieron en el proceso de purificación. Los 15 fragmentos purificados se reamplificaron, se clonaron y se secuenciaron; alternatively, se secuenciaron directamente los productos de PCR, en un secuenciador ABI Prism 377 DNA Sequencing Systems,

(Applied Biosystems). La homología fue determinada por comparación con la base de datos usando inicialmente el algoritmo BLAST del Centro de Fuente Bioinformática para *E. histolytica* Pathema del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID) de Estados Unidos (<http://pathema.tigr.org/tigr-scripts/Entamoeba/PathemaHomePage.cgi>) así como el algoritmo BLAST del Centro Nacional para la investigación en Biotecnología (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) cuando no se encontró alguna identidad en la base de Pathema.

De los 15 fragmentos clonados, solo se obtuvieron 6 clonas con el fragmento insertado, el resto no presentó el inserto, tal vez por fallas en las concentraciones del producto de PCR que se coloca en la reacción para clonar.

La secuencia de las clonas con el fragmento insertado se representan en la figura 11. La tabla VII resume los resultados del análisis a nivel de nucleótidos de estas secuencias en las bases de datos antes citadas. La secuencia de nucleótidos de la clona 1 mostró identidad del 100 y 95% para los genes que codifican para la *glutaminil-tRNA sintasa* de *Equus caballus* y *Canis familiaris* respectivamente, la clona 2 dio identidad del 90% para el gen que codifica a la *glutaminil-tRNA sintasa* de *Homo sapiens*, las secuencias de nucleótidos de las clonas 3 y 4 mostraron identidades del 91% y 99% con los genes que codifican para la *subunidad ribosomal 40S* y la *saposina like* de *E. histolytica*, la secuencia de nucleótidos de la clona 5 mostró identidad del 92% con un *regulador transcripcional de la familia XRE* de *Burkholderia vietnamiensis* y la clona 6 mostró identidad del 97% con la *subunidad ribosomal 18S* de *E. histolytica* (figura 11 y tabla VII).

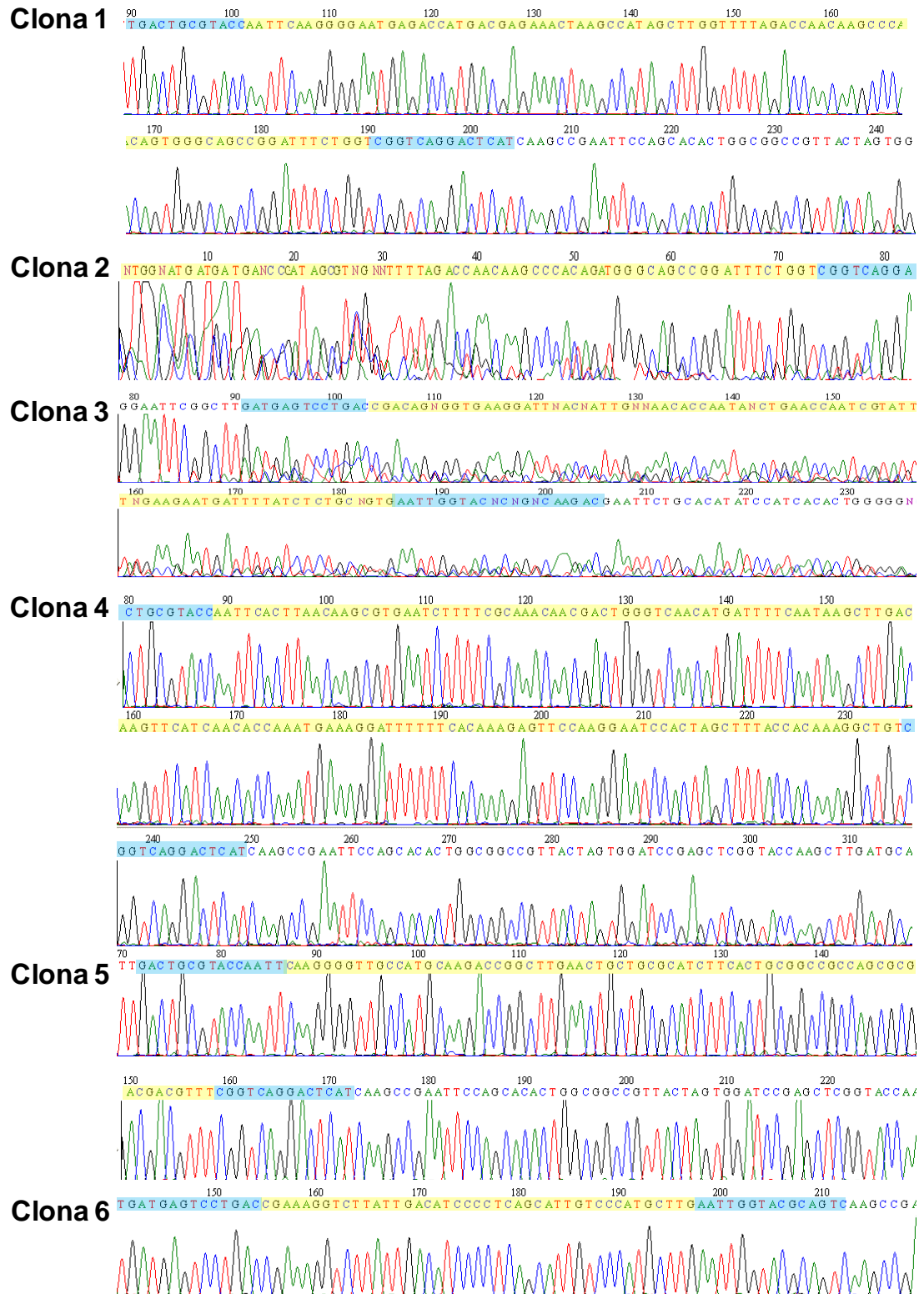


Figura 11. Secuencias de las clonas analizadas para los diferentes TDFs obtenidos. Los fragmentos se clonaron en el vector pCR II y posteriormente se secuenciaron. En la figura se señala la secuencia de los adaptadores ligados a los fragmentos en color azul y la secuencia de los transcritos se señala en amarillo.

Tabla VII. Fragmentos diferencialmente expresados en *E. histolytica* después de la inducción de MCP con G418

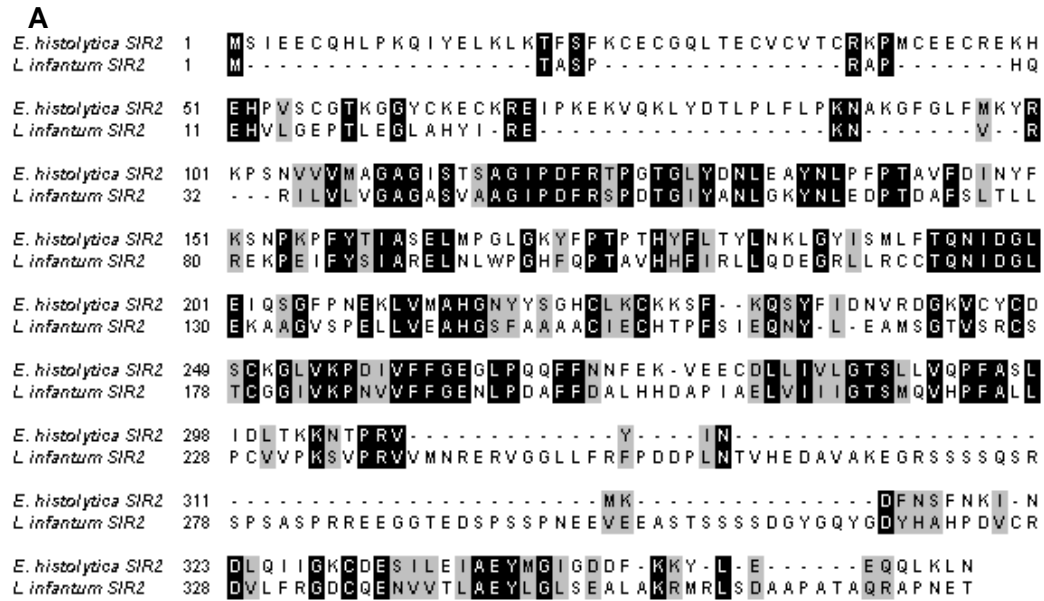
TDFs	Identidad	Patrón de Expresión	Número de Acceso	% similaridad (BLAST)
F1	<i>Equus caballus</i> similar to Glutaminyl-tRNA synthase (glutamine-hydrolyzing)-like 1 (LOC100066400), mRNA	Incremento	<u>X_M001503943.1</u>	100% 7e-34
F1	<i>Canis familiaris</i> similar to glutaminyl-tRNA synthase (glutamine-hidrolyzing -like 1 (LOC475014), mRNA	Incremento	<u>XM_532250.2</u>	95% 3e-27
F2	<i>Homo sapiens</i> glutaminyl-tRNA synthase (glutamine-hydrolyzing)-like 1 (QRSL1), mRNA	Incremento	<u>N_M018292.3</u>	90% 5e-06
F3	<i>Entamoeba histolytica</i> 40s ribosomal protein S15 putative	Disminución	<u>65.m00159</u>	91% 3.8e-11
F4	<i>Entamoeba histolytica</i> Saposin-like protein	Incremento	<u>46.m00263</u>	99% 2.4e-25
F5	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> transcriptional regulator XRE family	Incremento	<u>CP000619.1</u>	92% 0.25
F6	<i>Entamoeba histolytica</i> gene for 18S ribosomal RNA	Disminución	<u>AB426549.1</u>	100% 1e-09

En paralelo a la búsqueda de TDFs hicimos un análisis *in silico* para investigar en *E. histolytica* la presencia de proteínas homologas a las reportadas en otros parásitos que participan en MCP. Buscamos al Sir-2 descrito en *L. infantum* como regulador negativo de la apoptosis y también realizamos la búsqueda de proteínas de unión a calcio (CABP), tomando en cuenta los reportes en donde se describe la participación de calcio intracelular en el desarrollo de la MCP para *T. gondii* (Peng y cols 2003), *T. brucei* (Ridgley y cols 1999) y *E. histolytica* (Villalba y cols 2007). La búsqueda de estas proteínas se realizó en las bases de datos antes citadas, y

posteriormente se hicieron alineamientos de la secuencia de aminoácidos utilizando el programa Bio Edit versión 7.0 (Hall TA 1999).

Los resultados entre el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de *E. histolytica* y *L. infantum* mostraron 40% de identidad y 58% de homología (figura 12A).

Por otra parte, de las proteína de unión a calcio reportadas en *E. histolytica*, (Bhattacharya y cols 2006) elegimos a las Graininas 1 y 2, que son las que ya se han purificado y caracterizado (Nickel y cols 2000), para alinear contra la Calmodulina (CaM) de los parásitos *T. gondii* y *T. brucei* en los que se describe la participación de calcio intracelular en el desarrollo de la MCP (Moreno y cols 2003). Los resultados se resumen en la figura 11B. Obtuvimos una identidad del 26% y 25%, (con valores esperados de $4e-07$ y $3e-08$) y homologías de 43% y 41% para las Graininas 1 y 2, respecto a la Calmodulina de *T. brucei* y valores de identidad de 25% y 24% (valores esperados de $2e-06$ y $4e-08$) y homología de 42% a 41% para las Graininas 1 y 2 respecto a la Calmodulina de *T. gondii* (figura 12B).



B

Proteína	Nombre del locus	Proteína	Numero de acceso	Valor esperado	H(%)	I(%)
Grainina-1	<i>E.histolytica</i>	CaM	GenBank:	3e-08	43	26
<i>E.histolytica</i>	Phatema: EHI_167300	<i>T. brucei</i>	X56511			
Grainina-2	<i>E.histolytica</i>	CaM	GenBank:	3e-08	41	25
<i>E.histolytica</i>	Phatema: EHI_167310	<i>T. brucei</i>	X56511			
Grainina-1	<i>E.histolytica</i>	CaM	GenBank:	2e-06	42	25
<i>E.histolytica</i>	Phatema: EHI_167300	<i>T. gondii</i>	Y08373			
Grainina-2	<i>E.histolytica</i>	CaM	GenBank:	4e-08	41	24
<i>E.histolytica</i>	Phatema: EHI_167310	<i>T. gondii</i>	Y08373			

Figura 12. Alineamientos de la secuencia de aminoácidos para Sir-2 y porcentajes de identidad y homología de Graininas entre *E. histolytica* y otros parásitos. A. Alineamiento de Sir-2 de *L. infantum* y *E. histolytica*. Los alineamientos se realizaron usando el programa BioEdit versión7.0 (Hall TA 1999); los aminoácidos idénticos están sombreados en negro y los aminoácidos con propiedades similares están sombreados en gris. **B.** Porcentajes de las identidades y homologías de Graininas 1 y 2 de *E. histolytica* contra las calmodulinas de *T. brucei* y *T. gondii*.

Para confirmar el patrón de expresión observado con la metodología de cDNA-AFLP, y para evaluar el nivel de expresión de los TDF previamente secuenciados, así como de los genes que codifican para las proteínas analizadas *in silico*, se realizó por triplicado la cinética de inducción a MCP, se aisló el RNA y se cuantificó por PCR en tiempo real el cDNA correspondiente a cada RNA.

Para la cuantificación se diseñaron oligonucleótidos para amplificar los genes de la *saponina-like* y la *subunidad ribosomal 40S* como representante de las dos subunidades encontradas en el proyecto del genoma de *E. histolytica*. Diseñamos oligonucleótidos para amplificar la *glutaminil-tRNA sintetasa*, debido a que tres diferentes TDFs coincidieron con genes que codifican para la proteína Glutaminil-tRNA sintasa y en el proyecto del genoma de *E. histolytica* solo se ha reportado un gen que codifica para Glutaminil t-RNA sintetasa. Consideramos conveniente su análisis ya que la Glutaminil-tRNA sintasa y la Glutaminil-tRNA sintetasa están implicadas en las reacciones químicas similares de la glutamina y las vías anabólicas de las proteínas. No incluimos el análisis del TDF para el *regulador transcripcional de la familia XRE* debido a que en el genoma de *E. histolytica* se reportan 100 reguladores de transcripción pero ninguno de la familia XRE. Diseñamos oligonucleótidos también el *sir-2*, las *graininas 1* y *2* así como el *gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (gapdh)* y la *actina* empleados como genes endógenos.

Para normalizar las diferencias en la extracción del RNA y la eficiencia de la reacción de síntesis de cDNA, se amplificó en tiempo real a los genes analizados en paralelo con un gen endógeno que se validó para determinar que su expresión no fuera afectada por el tratamiento experimental.

Para seleccionar el control endógeno analizamos dos de los genes más utilizados: *actina* y *gapdh*, para los cuales determinamos la cantidad relativa correspondiente a cada RNA extraído de trofozoítos en incubación con el inductor de MCP por 0.5, 1, 3 y 6 h, así como de trofozoítos sin tratamiento. La cantidad relativa de cada uno de estos genes se determinó aplicando el método del $2^{-\Delta C_T}$ en el cual se aplicó la fórmula siguiente: $2^{-\Delta C_T}$ donde $\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ tiempo } x} - \Delta C_{T \text{ tiempo } 0}$

Posteriormente, seleccionamos como gen endógeno aquel que no mostraba una relación estadísticamente significativa entre el tratamiento a lo largo del tiempo y la cantidad relativa. La tabla VIII resume los resultados de los C_T obtenidos de la amplificación de los genes probados para ser utilizados como endógenos y los cálculos realizados para la determinación de la cantidad relativa aplicando el método del $2^{-\Delta C_T}$.

Tabla VIII. Resumen del Análisis de CTs para la selección del control endógeno

	C_T	Promedio del control	ΔC_T	$2^{-(\Delta C_T)}$
<i>actina</i>				
control	23.8749	23.6898667	0.18503333	0.87962875
control	23.3814	23.6898667	-0.30846667	1.23839081
control	23.8133	23.6898667	0.12343333	0.91800039
0.5 h	21.7383	23.6898667	-1.95156667	3.86794335
0.5 h	21.2911	23.6898667	-2.39876667	5.27352148
0.5 h	21.0656	23.6898667	-2.62426667	6.16570843
1 h	26.465	23.6898667	2.77513333	0.14608365
1 h	27.2108	23.6898667	3.52093333	0.08711151
1 h	26.7269	23.6898667	3.03703333	0.12183214
3 h	29.7227	23.6898667	6.03283333	0.01527342
3 h	29.3149	23.6898667	5.62503333	0.02026265
3 h	29.8822	23.6898667	6.19233333	0.01367483
6 h	36.0148	23.6898667	12.3249333	0.00019491
6 h	36.6155	23.6898667	12.9256333	0.00012853
6 h	36.3129	23.6898667	12.6230333	0.00015852
<i>gapdh</i>				
control	19.0711	19.1446667	-0.07356667	1.05231503
control	19.1297	19.1446667	-0.01496667	1.0104281
control	19.2332	19.1446667	0.08853333	0.94047837
0.5 h	19.91	19.1446667	0.76533333	0.58831742
0.5 h	19.4475	19.1446667	0.30283333	0.81065877
0.5 h	19.1182	19.1446667	-0.02646667	1.0185146
1 h	19.5529	19.1446667	0.40823333	0.75354557
1 h	19.1901	19.1446667	0.04543333	0.96899872
1 h	19.0496	19.1446667	-0.09506667	1.06811476
3 h	19.5735	19.1446667	0.42883333	0.74286227
3 h	19.5793	19.1446667	0.43463333	0.73988177
3 h	19.709	19.1446667	0.56433333	0.67626785
6 h	19.985	19.1446667	0.84033333	0.55851451
6 h	19.1674	19.1446667	0.02273333	0.98436595
6 h	19.296	19.1446667	0.15133333	0.90041792

La figura 13 muestra gráficamente los resultados obtenidos, en ella se observa que el *gapdh* no mostró diferencias significativas en la cantidad relativa de amplificado en las distintas condiciones experimentales, a diferencia de la *actina* que incremento su cantidad relativa después de 0.5 h de incubación con el inductor hasta valores de 3.86794335, 5.27352148 y 6.16570843 respectivamente

para cada una de las replicas (5 veces más en promedio), para disminuir hasta valores menores a 1 después de 6 h de incubación; por lo que este gen se descartó para ser utilizado como gen endógeno.

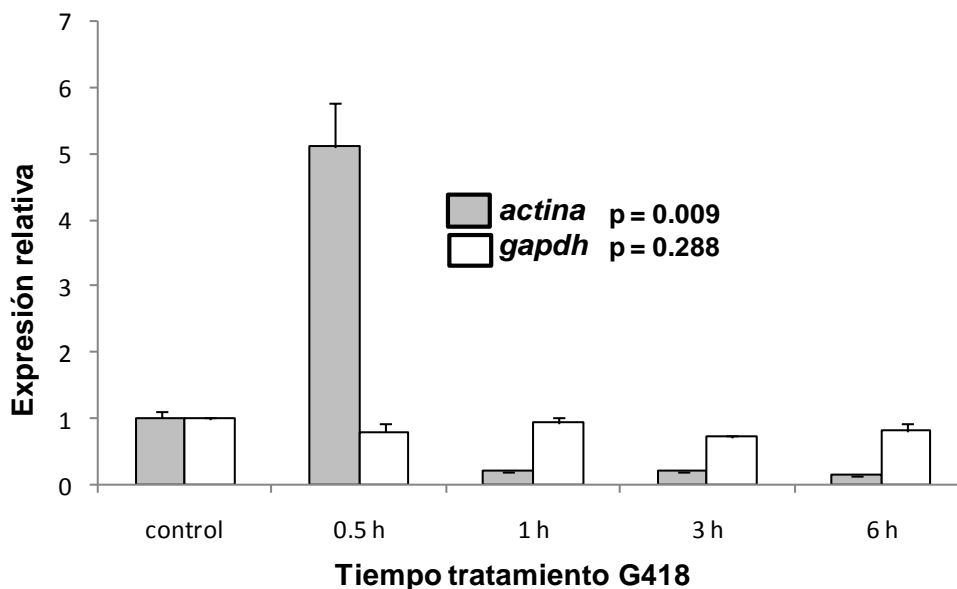


Figura 13. Aplicación del método $2^{-\Delta C_T}$ para la selección del control endógeno.

Para validar el efecto del tratamiento en la expresión de los genes candidatos a ser utilizados como endógeno, se determinó la cantidad relativa de los genes *gapdh* y *actina* correspondientes a cada RNA extraído de trofozoítos en incubación con el inductor de MCP por 0.5, 1, 3 y 6 h, así como de trofozoítos sin tratamiento. La cantidad relativa se determinó usando la ecuación $2^{-\Delta C_T}$ donde $\Delta C_T = (C_{T \text{ tiempo } x} - C_{T \text{ tiempo } 0})$. El cambio en la cantidad relativa se observa en la gráfica. En las imágenes de abajo se muestran los corrimientos electroforéticos en geles al 2% con los productos de la RT-PCR

Para que el método de cuantificación sea válido, las eficiencias de amplificación correspondientes a un ciclo de la fase exponencial del gen problema y el gen endógeno interno (previamente seleccionado), deben ser aproximadamente iguales. Para determinar esta eficiencia, se realizaron cinco diluciones decuples seriadas del producto de PCR, previamente cuantificado a 260 nm, el cual contenía el fragmento esperado para cada gen. Posteriormente, estas diluciones se amplificaron por triplicado bajo las condiciones antes descritas para obtener los

valores de C_T , los cuales se graficaron contra el logaritmo de la concentración expresado en ng del cDNA utilizado para la amplificación. El valor de la pendiente de las gráficas obtenidas se utilizó para calcular la eficiencia con la ecuación:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1 \text{ (Rasmussen 2001).}$$

La tabla IX resume los datos obtenidos para el cálculo de la eficiencia y la figura 14 muestra las gráficas para cada uno de los genes analizados. Como se observa en ellas, los transcritos analizados mostraron alta eficiencia en el rango de 0.01 a 100 ng de cDNA con alta linealidad. En cada uno de los gráficos se observan las ecuaciones de la recta y los valores de la pendiente con que se calcularon las eficiencias, las cuales fueron para todos los genes analizados, muy similares al del control endógeno, de 1.09, lo que permitió validar los resultados de expresión relativa.

Tabla IX. Resumen de CTs obtenidos para el cálculo de la eficiencia de reacción

[cDNA ng]	Log [cDNA ng]	CT <i>gapdh</i>	CT <i>Grainina-1</i>	CT <i>Grainina-2</i>	CT <i>Glutaminil t-RNA sintetasa</i>	CT <i>sir-2</i>	CT 40S	CT <i>saponina-like</i>
100	4	19.1401	16.6625	16.8425	15.3708	14.9406	17.4205	15.8872
100	4	19.1642	16.8451	16.5189	15.4088	14.8583	17.2362	15.8446
100	4	19.5907	16.59	16.5155	15.51	15.008	17.3505	15.8167
10	3	21.8183	20.305	20.0376	18.4101	17.4051	20.1807	18.7127
10	3	21.6429	20.1366	20.2548	18.0181	17.7525	20.338	18.9639
10	3	21.8342	20.1494	20.2625	18.1537	17.3144	20.2776	19.142
1	2	24.7586	23.4292	24.7591	21.7853	20.3328	23.0769	22.1723
1	2	25.6195	22.349	31.5991	21.6115	20.4177	23.5161	22.067
1	2	25.5457	24.2077	25.1428	21.8602	20.8201	23.6791	22.1736
0.1	1	28.8108	26.2211	29.4822	24.8144	24.2936	25.0592	25.1534
0.1	1	28.2399	26.325	30.2013	25.1568	24.7047	25.3444	25.31
0.1	1	28.847	26.0103	27.4751	24.9355	25.1632	26.6097	24.9408
0.01	0	30.7495	29.0805	29.3443	27.3979	29.0189	28.1233	27.7756
0.01	0	31.6752	29.1708	32.6455	28.5051	28.5931	29.3643	27.6023
0.01	0	32.1155	29.8538	33.0489	28.9065	28.227	29.2006	28.2408

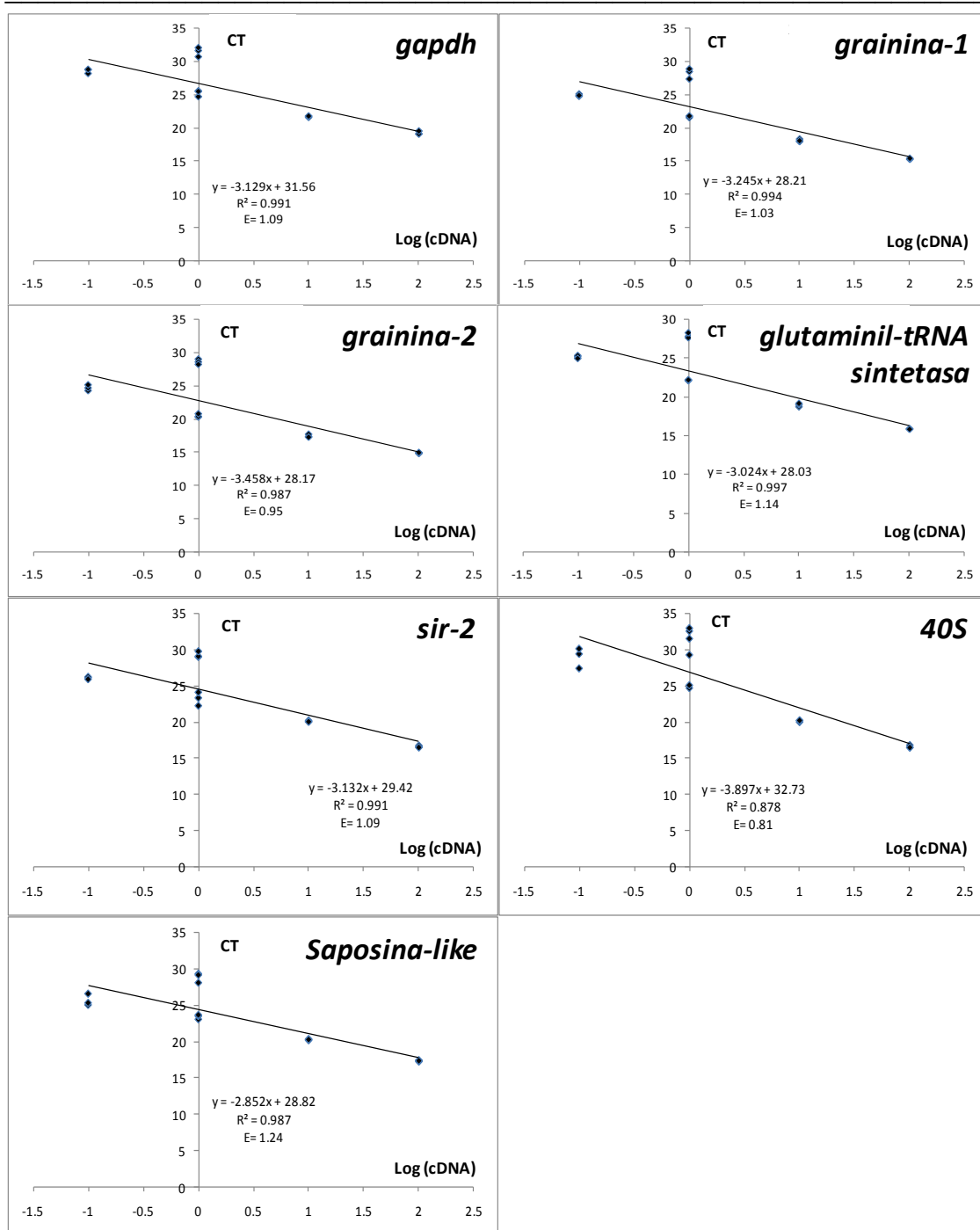


Figura 14. Determinación de la eficiencia de amplificación para los genes analizados y el control endógeno. Los valores de C_T obtenidos de la amplificación por PCR en tiempo real de cada uno de los genes analizados se graficaron contra el logaritmo de la concentración del cDNA utilizado para la amplificación. La ecuación así como la pendiente de la recta se obtuvieron para calcular la eficiencia de acuerdo a la ecuación $E = 10 \cdot (-1/\text{pendiente}) - 1$. La figura muestra las graficas obtenidas para el control endógeno *gapdh* y los genes *grainina-1*, *grainina-2*, *glutaminil t-RNA sintetasa*, *sir-2*, subunidad ribosomal *40S*, y *saposina-like*. Cada gráfica muestra su ecuación, valor de R2 y la Eficiencia.

Dado que el SYBR Green se une a cualquier doble cadena de ácido nucleico aún sin la secuencia específica de interés (como por ejemplo dímeros de iniciadores), se realizó un análisis de la curva de disociación para identificar los productos generados en la PCR en presencia de SYBR Green. Este análisis permite la caracterización de los productos de PCR y de los dímeros de iniciadores según sus conductas de disociación.

Durante la PCR, la fluorescencia inicial es baja e incrementa en cada ciclo. En contraste, al principio de una curva de disociación, la reacción está a una temperatura baja y la fluorescencia es alta; como la temperatura incrementa de una manera constante, la fluorescencia caerá súbitamente hasta que se alcance el punto de disociación característico (T_m) para cada fragmento de DNA. La proporción en el cambio de fluorescencia como una función de la temperatura se grafica, y en ésta se observará un producto homogéneo y puro de PCR con una curva de disociación sencilla, bien definida, con un solo pico estrecho. En cambio, dímeros de iniciadores que se disocian a bajas temperaturas, muestran picos anchos en sus curvas.

La figura 15 muestra las curvas de disociación para los genes analizados con su respectivo control que contiene todos los reactivos que se utilizan en la PCR, sin el cDNA. Como se observa estas curvas mostraron un solo producto (un solo pico); las temperaturas de disociación fueron: 76.4°C para *gapdh*, 71.9°C para *grainina-1*, 70.9°C para *grainina-2*, 74.5°C para *glutaminil t-RNA sintetasa*, 71.2°C para *sir-2*, 71.8°C para *40S* y 75.1°C para *saposina-like*. Por su parte, los respectivos

controles no mostraron amplificación inespecífica. Estos resultados nos confirmaron que las reacciones presentaron productos únicos puros.

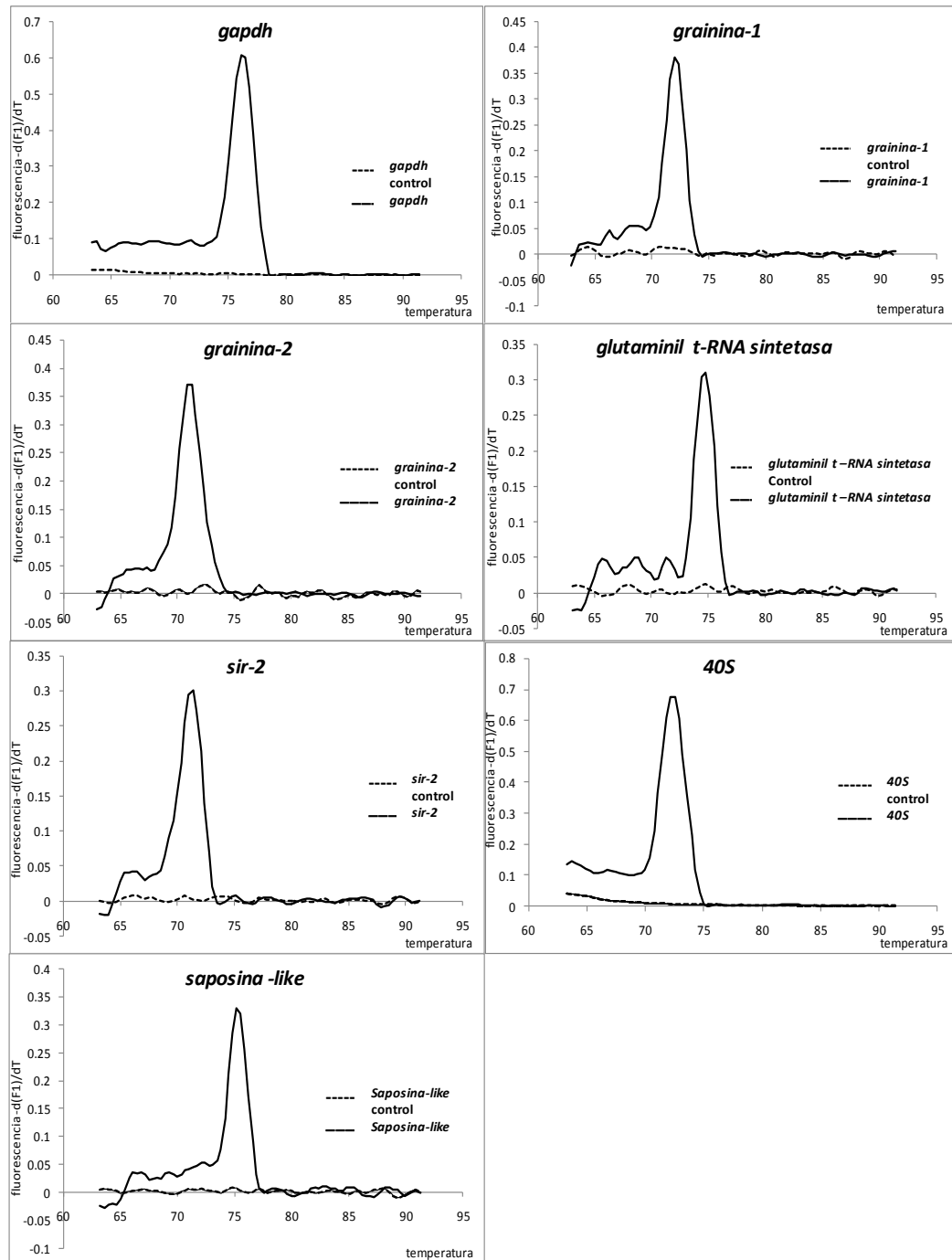


Figura 15. Curvas de disociación para los genes analizados. La valoración de la especificidad de los iniciadores en la PCR para el *gapdh* y los genes estudiados *grainina-1*, *grainina-2*, *glutaminil t-RNA sintetasa*, *sir-2*, subunidad ribosomal 40S, y *saposina-like* se muestra en las curvas de disociación que se obtienen de graficar la derivada negativa de la fluorescencia contra la temperatura para los genes en la PCR tiempo real con el SYBR Green.

Una vez estandarizado y validado el procedimiento de la PCR en tiempo real, se evaluaron los cambios de expresión para los genes que codifican para las proteínas Glutaminil t-RNA sintetasa, Graininas, Subunidad ribosomal 40S, Sir-2 y Saponina-like durante el desarrollo de la MCP. La tabla X resume valores de la expresión relativa y el error estándar calculado con las replicas realizadas para los trofozoítos sin tratamiento y tratados con el inductor de MCP a las 0.5, 1, 3 y 6 h, así como el valor de “p” para cada uno de los genes analizados.

La figura 16, muestra el nivel de expresión relativa sin MCP (control) y durante el curso de la inducción a MCP con G418 (0.5, 1, 3 y 6 h). La expresión relativa de *graininas 1* y *2* incremento 80.26 y 132.11 veces respectivamente, en relación al control, después de 30 min de la inducción a MCP. Sin embargo después de 1 h de inducción la expresión de ambos genes disminuyó hasta valores de solo 6.6 veces la expresión del control, regresando a niveles casi iguales al control después de 3 h de inducción. Posterior a las 6 h, el nivel de expresión de la *grainina-1* se mantuvo igual que en los trofozoítos control, mientras que la expresión de la *grainina-2* disminuyó 5 veces en relación al valor basal (valor expresión relativa de 0.23).

La *glutaminil t-RNA sintetasa* incrementó su expresión 55.63 veces más que el control después de 30 min de la inducción a MCP y disminuyó después de 1 y 3 h de inducción a valores de 12.66, y 3.86 veces la expresión basal del control. A las 6 h post-inducción los valores de expresión relativa bajaron hasta 0.2 (5 veces menos que el control).

El *sir-2*, después de 30 min de la inducción, incremento su expresión más de 122.52 veces que los valores de expresión del control, disminuyendo a valores de 5.63 y 4.12 respecto al control después de 1 y 3 h de inducción, respectivamente. Posteriormente después de 6 h su expresión disminuyó a valores de 0.42, dos veces menos que los trofozoítos no inducidos.

En contraste la *subunidad ribosomal 40S* incrementó su expresión solo 7 veces más que el control disminuyendo a valores de 1.42 después de 1 h de inducción y se mantuvo con valores de 0.41, dos veces menos que los trofozoítos no inducidos, desde las 3 hasta las 6 h posteriores a la inducción.

Finalmente, la saponina-like mostró 30 min después de la inducción los más altos valores de incremento de expresión de los genes que estudiamos, alcanzando valores de 194.09 veces más que la expresión en los trofozoítos control. Una hora más tarde la expresión disminuyó hasta valores de 2.69 y se mantuvo con valores iguales a los de los trofozoítos sin inducción a las 3 y 6 h después de la inducción (1.10 y 1.01 respectivamente).

Tabla X. Resumen de los valores de expresión relativa en los genes estudiados				
<i>grainina – 1</i>				
control	30 min	1h	3h	6h
ER=1.03042769 e.std= 0.0610	ER= 80.255998 e.std=16.240 p<0.001	ER= 6.60029511 e.std=0.580	ER= 1.84402953 e.std=0.667	ER= 0.8153346 e.std=0.656
<i>grainina – 2</i>				
ER=1.01422024 e.std=0.0411 p<0.001	ER=132.107942 e.std=25.424	ER=6.67983132 e.std=1.066	ER=2.03613218 e.std=0.627	ER=0.22695457 e.std=0.0444
<i>glutaminil-tRNA sintetasa</i>				
ER=1.07778205 e.std=	ER=55.628363 e.std= p<0.001	ER=12.6649763 e.std=	ER=3.86315127 e.std=	ER=0.19636247 e.std=
<i>sir-2</i>				
ER=1.00958389 e.std=0.0476	ER=122.523711 e.std=27.109	ER=5.63279395 e.std=1.119 p <0.001	ER=4.12471873 e.std=1.138	ER=0.4229479 e.std=0.0895
<i>40S</i>				
ER=1.04120774 e.std=0.1000	ER=7.39685314 e.std=0.643	ER=1.41808071 e.std=0.302 p <0.001	ER=0.41371318 e.std=0.126	ER=0.41254832 e.std=0.0852
<i>saponina-like</i>				
ER=1.05862891 e.std=0.128	ER= 194.085695 e.std=46.198	ER= 2.69095297 e.std=0.865 p <0.001	ER=1.10469861 e.std=0.0893	ER=1.01491354 e.std=0.301

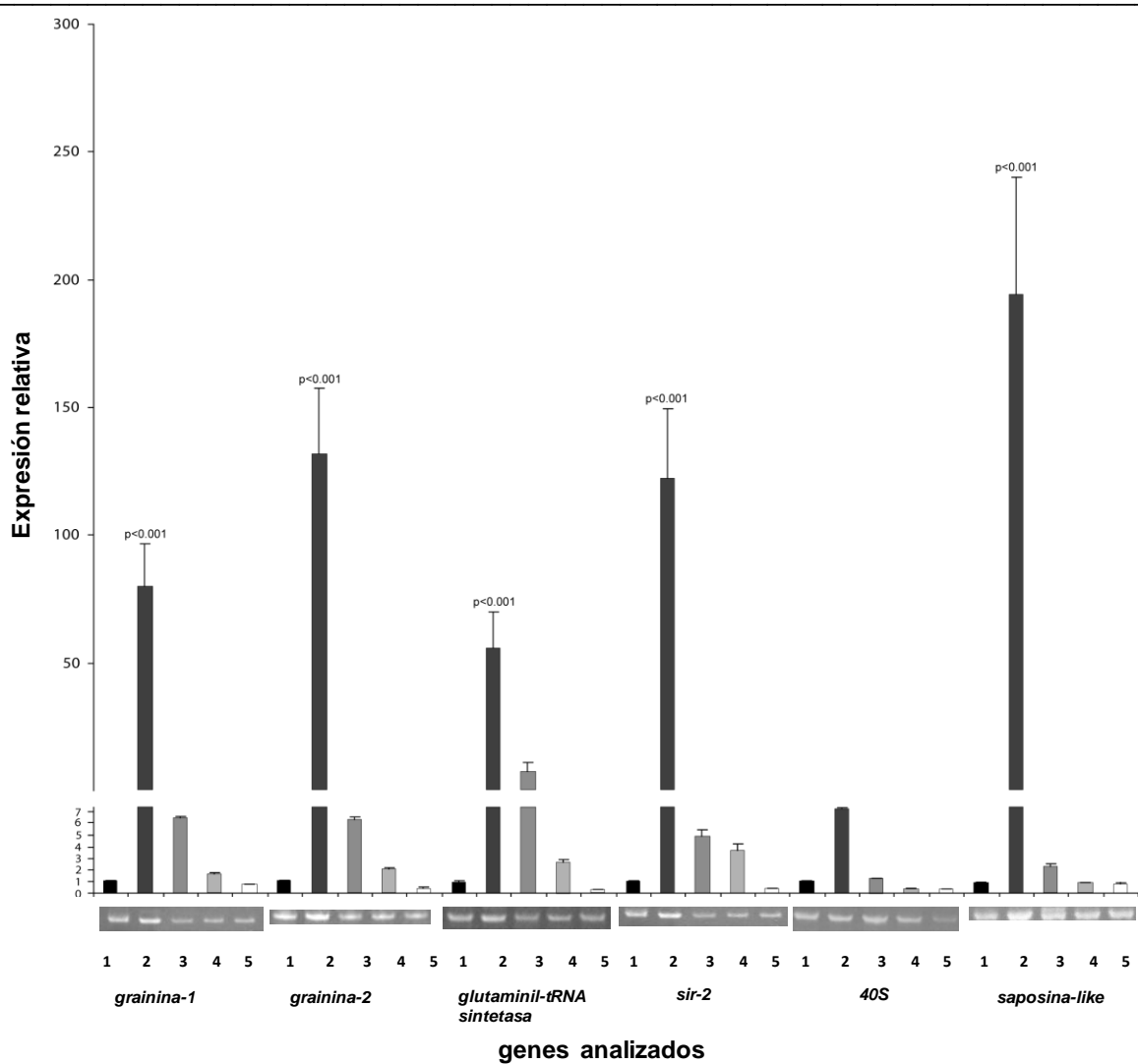


Figura 16. Expresión relativa de los genes analizados durante la inducción de MCP. Las graficas muestran la expresión relativa de los genes seleccionados durante la inducción de MCP. En el eje X, 1 representa la expresión relativa de los genes en los trofozoítos sin tratamiento. 2, 3, 4 y 5 representan la expresión de los trofozoítos después de 0.5, 1, 3 y 6 h de incubación con G418. En las imágenes de abajo se muestran los corrimientos electroforéticos en geles al 2% con los productos de la RT-PCR.

7. DISCUSIÓN

En los parásitos protozoarios se especula que el proceso de MCP es un factor importante para regular la densidad poblacional, hecho beneficioso que permitiría establecer la infección y garantizar la supervivencia de la población, atenuando la respuesta inmune del huésped (Bruchhaus y cols 2007). Hasta ahora el proceso de MCP se ha identificado en tripanosomátidos (Ameisen y cols 1995, Welburn y cols 1996, Moiera y cols 1996), *Blastocystis hominis* (Tan y cols 2001), *P. falciparum* (Picot y cols 1997, Al-Olayan y cols 2002) y *E. histolytica* (Ramos y cols 2007, Villalba y cols 2007, Ghosh y cols 2010).

En el 2007 se reportó por primera vez la MCP en *E. histolytica*. Ramos y colaboradores demostraron la inducción *in vitro* con especies reactivas de nitrógeno (Ramos y cols 2007), y en paralelo nuestro grupo demostró el evento inducido por el aminoglucósido G418 (Villalba y cols 2007). Recientemente Ghosh y colaboradores han confirmado nuestros hallazgos al demostrar que la MCP en *E. histolytica* es también inducida por peróxido de hidrógeno (Ghosh y cols 2010).

De estos estudios el mejor caracterizado desde el punto de vista morfológico y bioquímico lo constituye el reportado por nuestro grupo. Morfológicamente, se caracterizó por una reducción en el tamaño celular, con incremento en el número de vacuolas en el citoplasma. Ultraestructuralmente el núcleo presentó condensación y fragmentación de la cromatina y marcaje positivo a la prueba de TUNEL después de 9 h de incubación con el inductor, además la membrana celular se mantuvo íntegra. Dicha fragmentación del DNA fue abolida por el

inhibidor de cistein proteasas E-64, lo que nos permitió sugerir que el evento era dependiente de cistein proteasas.

Bioquímicamente, en tiempos de incubación de 1 h con el inductor, se observó la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, una disminución intracelular de potasio, el incremento citosólico de calcio y la disminución de pH intracelular (Villalba y cols 2007).

En este trabajo, investigamos si la MCP previamente reportada por nuestro grupo, es consecuencia de un programa molecular regulado genéticamente, cuyo estudio permitiría conocer los efectores pro-apoptóticos y anti-apoptóticos que el parásito es capaz de activar bajo condiciones específicas tales como la resistencia a las drogas durante el proceso de invasión, o bien el establecimiento en el huésped. Para realizar este estudio primero evaluamos la síntesis *de novo* de las proteínas durante la MCP, para conocer si esta podía ser asociada a la inducción de efectores moleculares específicos. Los resultados de estos ensayos sugirieron que el proceso de muerte en los trofozoítos inducido por G418 es un mecanismo activo, asociado con un incremento en la síntesis de proteínas durante los primeros 90 min de incubación con el inductor. Las proteínas sintetizadas *de novo* podrían estar participando en rutas bioquímicas relacionadas con MCP o bien en la resistencia a la muerte celular, entre otros eventos. Edinger y colaboradores en su reciente revisión menciona que la MCP implica un incremento en la síntesis de proteínas que participan en rutas específicas que requieren energía y programación genética (Edinger y cols 2004).

La fuerte inducción de la síntesis de ciertas proteínas se presentó a pesar de que la principal actividad del análogo de neomicina G418, la constituye la inhibición de la síntesis de proteínas por interactuar con la subunidad ribosomal 80S (Bar-Nun y cols 1983).

Una vez que se observó que la inducción del fenómeno de MCP en amiba correlacionaba con un proceso de síntesis activa decidimos buscar efectores moleculares que pudieran participar en el proceso. Para su búsqueda seleccionamos la metodología de los cDNA-AFLPs, debido a que representa una metodología altamente reproducible y específica para detectar genes que se expresen diferencialmente. Esta metodología ha sido ampliamente utilizada tanto en genomas complejos, como sencillos. Fue aplicada por primera vez por Bachem y colaboradores en 1996 para explorar la expresión diferencial en el proceso de tuberización de la papa, aislando tres transcritos que codificaron para proteínas que participaban en dicho evento (Bachem y cols 1996). En el humano, se ha utilizado para investigar las alteraciones en el transcriptoma de células hepáticas en respuesta a la infección por el virus del dengue, donde se identificaron 27 TDF como genes involucrados en el proceso de infección viral (Ekkapongpisit y cols 2007). Se ha aplicado también a los caballos de resistencia bajo condiciones estresantes para visualizar las variaciones de los perfiles de transcripción, donde se identificaron 49 TDFs diferencialmente expresados, de los cuales, cuatro mostraron alta similitud de secuencia con genes involucrados en respuesta al estrés inducido por el ejercicio (Cappelli y cols 2005). En levaduras, se analizaron los cambios de expresión en presencia y ausencia de glucosa, comparando tres

metodologías cDNA-AFLPs, microarreglos y GeneChip, demostrando que las tres metodologías presentaron una correlación en la expresión diferencial de genes (Reijans y cols 2003).

Nuestro trabajo es el primero en emplear esta técnica en *E. histolytica* para identificar genes diferencialmente expresados. Obtuvimos un tamaño en los TDFs que correlacionó bien con reportes en otros genomas donde obtienen tamaños de alrededor de 1000 pb para genomas complejos como humanos, animales y plantas (Bachem y cols 1996; Ekkapongpisit y cols 2007, Cappelli y cols 2005) y TDFs de tamaños menores a 200 pb para genomas menos complejos como levaduras (Reijans y cols 2003).

Enfocamos nuestros esfuerzos en purificar TDFs que se sobreexpresaban o que disminuían su expresión en etapas tempranas de inducción debido a que, los resultados de los ensayos donde evaluamos la síntesis *de novo* de las proteínas durante la MCP, mostraron un incremento en la síntesis de proteínas durante los primeros 90 min de incubación con el inductor, además de que los resultados del trabajo previo mostraron cambios bioquímicos tempranos menores a 1 h (Villalba y cols 2007). Incluimos también tiempos de 3h y 6 h de inducción ya que en el citado trabajo también se detectaron cambios fenotípicos intermedios y tardíos del proceso de MCP. De lo anterior se dedujo que algunas de las modificaciones en la expresión de los distintos efectores moleculares relacionados con dicho fenotipo podrían presentarse en etapas tempranas del tratamiento. Derivado de este análisis aislamos seis fragmentos que codificaron para Saposina-like, Glutaminil-tRNA sintasa y Subunidades ribosomales 40S y 18S (tabla VI). Nosotros

consideramos como desventaja de esta metodología, el hecho de haber obtenido solo pocos fragmentos polimórficos en tamaños mayores a 100 pb y un gran número de fragmentos similares en tamaño de aproximadamente 100 pb. Este hecho impidió que pudiéramos purificarlos con éxito en los geles de poliacrilamida. El diseño de nuevos iniciadores para ser utilizados en esta técnica, así como el utilizar otras enzimas de restricción, podría permitir generar un mayor número de fragmentos en tamaños mayores a 100 pb, que nos pudieran permitir su purificación de manera más eficiente. Sin embargo a pesar de que obtuvimos solo pocos fragmentos, esta metodología nos fue útil para encontrar genes que participan en el proceso de MCP.

Otra metodología que podría ser utilizada para la búsqueda de genes con más eficiencia podría ser la de microarreglos, sin embargo, para esta se requiere de equipo y software especializados.

Por otro lado con el análisis *in silico* usando la base de datos del banco de genes del Centro Nacional para la investigación en Biotecnología (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), y del Centro de Fuente Bioinformática para *E. histolytica* Pathema del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID) (<http://pathema.tigr.org/tigr-scrpts/Entamoeba/PathemaHomePage.cgi>) de Estados Unidos, buscamos proteínas homologas a Sir-2, debido a que se ha descrito en *L. infantum* como un regulador negativo de la apoptosis (Vergenes y col 2002), y también realizamos la búsqueda de genes que codifican para proteínas de unión a calcio (CABP). Esto último tomando en cuenta los reportes en *T. gondii*, *T. brucei* y sobre todo nuestro reporte previo en *E. histolytica*, en los

cuales se ha descrito que la MCP inducida por óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno y G418 respectivamente, muestra la participación del calcio, aunque no se ha identificado de manera específica alguna proteína de unión a calcio directamente asociada (Peng y cols 2003, Ridgley y cols 1999, Villalba y cols 2007). Elegimos como CABP en *E. histolytica* a las Graininas 1 y 2, para alinear contra la calmodulina (CaM) de los parásitos *T. gondii* y *T. brucei* debido a que de las proteínas de unión a calcio reportadas en *E. histolytica* (Bhattacharya y cols 2006) ya se han purificado y caracterizado con detalle (Nickel y cols 2000).

Esta búsqueda resulto fácil debido a que ya se tenían estudios previos, en otros parásitos que nos orientaron en la búsqueda de proteínas que podrían estar participando en el proceso de MCP de *E. histolytica*. Así consideramos que es sencilla y arroja resultados; sin embargo tiene la desventaja de requerir estudios previos o conocimiento de algunas proteínas que participen en el proceso.

Usando PCR en tiempo real evaluamos los patrones de expresión de los genes seleccionados y encontramos que las *graininas* mostraron un incremento en la expresión al inicio de la MCP. Tomando en consideración nuestros resultados previos (Villalba y cols 2007), en el cual el fenómeno fue caracterizado por un incremento de calcio citosólico en etapas tempranas, el incremento en la expresión de las *graininas* después de 30 min de la inducción de 80 y 132 veces más que en las células no estimuladas, sugiere que los trofozoítos activan un mecanismo molecular que pudiera compensar la pérdida de calcio, tratando de recapturar el calcio citosólico. La liberación de calcio como ha reportado Jin y colaboradores, activa varias enzimas entre las que destacan cistein-proteasas (Jin

y cols 2004). Estos autores demostraron en células de riñón de rata, la inducción de apoptosis dependiente de caspasas inducida por G418, por dos rutas. La primera debida al incremento en la concentración de calcio citoplásmico que provoca la ruptura de la m-calpaina y la subsecuente activación de pro-caspasa 12; y la segunda, la liberación de citocromo c de mitocondria (Jin y cols 2004). En humanos se ha descrito una proteína de unión a calcio, la “fortilina”, con una potente función anti-apoptótica, presente tanto en el núcleo y el citoplasma, inducible por estimulación con suero y metales pesados (Graidist y cols 2007). Esta proteína se expresa en niveles mucho más altos en las líneas de células cancerosas, en las cuales se ha demostrado que funciona capturando Ca^{+2} , protegiendo así a la célula contra la apoptosis dependiente de calcio (Graidist y cols 2007). Los resultados presentados aquí sugieren que las Graininas de *E. histolytica* pudieran tener una respuesta compensatoria, tratando de disminuir el calcio libre intracelular probablemente teniendo una actividad anti-apoptótica.

Por otro lado, encontramos que tres diferentes TDFs coincidieron con genes que codifican para la proteína Glutaminil-tRNA sintasa. En el proyecto del genoma de *E. histolytica* solo se ha reportado un gen que codifica para Glutaminil t-RNA sintetasa. Debido a que la Glutaminil-tRNA sintasa y la Glutaminil-tRNA sintetasa están implicadas en las reacciones químicas de la glutamina y las vías anabólicas de las proteínas, analizamos la expresión del gen *glutaminil-tRNA sintetasa*. Este gen ha sido reportado en humanos como un regulador negativo de muerte celular, a través de antagonizar la interacción con las cinasa 1 (ASK1) y c-jun terminal (JNK) (Ko y cols 2001). Por otro lado, investigaciones del gen que codifica para

glutaminil-tRNA sintetasa de *T. brucei* han demostrado que la disminución de su respectivo producto por interferencia de RNA, es esencial para su crecimiento (Rinehart y cols 2004). Así, nuestra hipótesis de que la sobreexpresión de *glutaminil-tRNA sintetasa* pudiera tener una actividad antiapoptótica en *E. histolytica*, es fortalecida por el incremento de los niveles de RNA al inicio del proceso de MCP.

Por su parte, la sobreexpresión de *sir-2* correlaciona con estudios en *Leishmania* donde se ha demostrado que su sobreexpresión incrementa la media de supervivencia del parásito, proporcionando una significativa protección contra muerte celular por apoptosis debida a condiciones de estrés (Vergenes y cols 2005). En mamíferos se ha sugerido que el homólogo de Sir-2 interacciona físicamente con p53 y atenúa las funciones de apoptosis en respuesta al daño del DNA y el estrés oxidativo (Luo y cols 2001); también se ha demostrado que interactúa con la subunidad RelA/p65 de NF-kappaB e inhibe su transcripción, responsable a su vez de regular genes que controlan la sobrevivencia celular (Yeung y cols 2004). Sir-2 también participa en el control de la respuesta celular a estrés mediante el control de la familia de factores de transcripción FOXO y Forkhead, una familia de proteínas que funcionan como reguladores de la longevidad del organismo. (Motta y cols 2004, Brunet y cols 2004).

En contraste a la amplia sobreexpresión de *graininas*, *sir-2* y *glutaminil t-RNA sintetasa*, la expresión de la *subunidad ribosomal 40S* solo incrementó 7 veces más que las células normales al inicio del proceso de MCP, disminuyendo esta expresión más tarde, similar a los datos reportados por Mroczek y colaboradores

que han demostrado una degradación de rRNA dependiente de ROS (Mroczek y cols 2008).

Estos y otros autores han sugerido que la disminución en expresión de las subunidades ribosomales puede modular la expresión de genes que participan en el proceso de MCP (Mroczek y cols 2008, Schumacher y cols 2006, Colón Ramos y cols 2006); no obstante, esto pudiera representar también un efecto inhibitor en la síntesis de proteínas producida por G418 (Bar-Nun y cols 1983).

Finalmente, la más importante sobreexpresión de los genes encontrados durante las fases tempranas de MCP fué obtenida con el gen de la *saposina-like*. Investigaciones de Winkelmann y colaboradores en 2006, reportaron que la proteína Saposina-like en *E. histolytica* tiene características similares a la Saposina C de humanos (Winkelmann y cols 2006). Esta proteína participa en el incremento del contenido de ceramida celular (Berent y cols 1981, Tayama y cols 1993, Wiegmann y cols 1994) produciendo la activación de proteínas cinasas, proteínas fosfatasas (Kong y cols 2005) JNK, (Brenner y cols 1997, Lozano y cols 1994, Shirakabe y cols 1997), Catepsina D, y caspasa-3 (De Stefanis y cols 2002) así como la traslocación de Bax a mitocondria y la liberación de citocromo c (Birbes y cols 2005, Kashkar y cols 2005). En *P. falciparum*, Pankova y colaboradores han demostrado que la ceramida puede mediar la inhibición del crecimiento por disminución en los niveles de glutatión (Pankova- Kholmyvansky y cols 2003). Se ha reportado también que los miembros de la familia SAPLIPS (del inglés saposin-like proteínas) son capaces de interactuar con lípidos específicos (Munford y cols 1995, Bruhn 2005). Interesantemente, ha sido demostrado que los

análogos de lisofosfolípidos, (LPAs) tienen una potente y selectiva actividad antiparasitaria, particularmente contra tripanosomátidos como *Leishmania* y *T.cruzi*, aunque las rutas bioquímicas involucradas son aún desconocidas (Urbina 2006, Denny y cols 2004). Por su parte en *E. histolytica*, Ramos y colaboradores sugieren que las moléculas como fosfolipasas y ameboporos podrían ser afectadas en la apoptosis inducida por especies de óxido nítrico (Ramos y cols 2007).

Similar a Jin y colaboradores (Jin y cols 2004) y a una MCP típica, nosotros hipotetizamos como una posible ruta de señalización disparada por G418 la liberación de calcio intracelular y la subsecuente activación de enzimas como calpaina-like y CPs. En la base de datos para el genoma de *E.histolytica* se reporta una calpaina-like y 51 CPs, algunas de las cuales pudieran estar actuando como caspasas, puesto que no se ha descrito como tal alguna caspasa. Nuestra hipótesis se refuerza con los resultados del trabajo previo donde demostramos que la degradación del DNA inducida por G418 fue disminuida en presencia del inhibidor de CPs E64, sugiriendo la participación de estas últimas en el proceso, probablemente en las fases finales de la MCP (después de las 9 h). Así mismo es reforzada por el incremento en la expresión relativa de graininas que encontramos al inicio del proceso.

Sin embargo otras rutas posiblemente podrían estar siendo activadas, como aquellas en donde participa la saposina-like (que fue el transcrito que presento mas altos niveles de expresión relativa en este trabajo) induciendo como en la típica MCP, la hidrólisis lisosomal y liberación de esfingolípidos como ceramida,

los cuales inducen las cascadas de señalización de cinasas así como de fosfatasa que activan a CPs. (Kong y cols 2005; De Stefanis y cols 2002).

Nuestra hipótesis es que el proceso es controlado por un equilibrio preciso entre los eventos pro-apoptóticos y anti-apoptóticos. En los estadios tempranos de la MCP, los trofozoítos sobreexpresan genes que codifican para proteínas específicas como Graininas, Sir-2 y Glutaminil t-RNA sintetasa, tratando de abatir los eventos bioquímicos que marcan la muerte celular y promueven MCP. Después, si el estímulo apoptótico permanece, las alteraciones morfológicas como reducción condensación y fragmentación de cromatina, proceden probablemente debido a la activación de rutas pro-apoptóticas y/o al desbalance de señales que limitan la muerte contra señales que promueven la muerte.

Estudios moleculares actualmente en progreso podrían determinar el papel específico de las moléculas que encontramos y otras moléculas no identificadas aún, que regulen el suicidio celular en este parásito que puedan ofrecer nuevas posibilidades para controlar la enfermedad parasitaria, ya que recientemente se ha descrito la resistencia a fármacos asociada con proteínas potencialmente implicadas en MCP. Como ejemplos podemos citar los siguientes: i) la Oxidasa Trypanosomatida Alternativa (TAO) de *T. brucei* que contribuye a la reducción en la producción de ROS y por lo tanto a la inhibición de la MCP (Tsuda y cols 2006); ii) las proteínas de choque térmico HSP83 y una calpaína-like, en *L. donovani* que modulan la susceptibilidad a antimoniales y otras drogas por interferir con el potencial de membrana mitocondrial y la interacción de otras proteínas implicadas en MCP (Vergnes y cols 2007); iii) la presencia en varios parásitos, incluyendo *E.*

histolytica del fenotipo de Resistencia a Múltiples fármacos (MDR), en el cual se presenta sensibilidad reducida a la MCP (Robinson y cols 1997) y que se caracteriza por la sobreexpresión de los genes que codifican para las fosfoglicoproteínas (PGPs). (Barbarics y cols 1998).

Nosotros podríamos proponer tentativamente como blanco anti-amibiano a las Graininas, ya que son específicas de *E.histolytica* y contribuyen a la inhibición de la MCP, pero se requieren hacer estudios mas detallados que determinen que no existe homologías entre estas y alguna proteína humana, así como determinar el papel específico de estas moléculas frente a otros inductores de MCP en *E. histolytica*.

En resumen, los resultados presentados aquí demuestran que la MCP inducida por G418 en *E. histolytica* es un proceso programado y activo. Los genes aislados en este trabajo representan los primeros genes identificados durante los estados tempranos del proceso de MCP que pudieran estar implicados en la muerte celular de *E. histolytica*.

8. CONCLUSIÓN

1. Se comprobó que el proceso de muerte en los trofozoítos inducido por G418 está asociado con un mecanismo activo que involucra la síntesis de proteínas específicas, incluyendo Saposina-like, Glutaminil-tRNA sintetasa, Subunidades ribosomales 40S y 18S, Sir-2 y Graininas.
2. Utilizando retrotranscripción y PCR cuantitativa en tiempo real encontramos que *glutaminil t-RNA sintetasa*, *sir-2*, *graininas* y *saposina-like* se sobreexpresaron 30 min después de la inducción de MCP hasta valores de, 55.63, 122.52, 80.26, 132.11 y 194.09 veces respectivamente, en relación al control, mientras que esta expresión disminuyó dramáticamente a los 60 min. Por otro lado la sobreexpresión de genes ribosomales incrementó solo 7 veces más que el nivel basal de expresión mostrando una progresiva disminución después de 90 min.
3. Nuestros resultados dan evidencia de los primeros genes identificados durante estados tempranos de MCP en *E. histolytica* que pudieran estar implicados en la regulación de rutas apoptóticas: *glutaminil t-RNA sintetasa*, *sir-2*, *graininas* y las *subunidades ribosomales* pudieran estar actuando como reguladores negativos de MCP, intentando controlar los cambios bioquímicos relacionados con la activación de la MCP y saposina-like, pudiera estar actuando como un regulador positivo de apoptosis activando algunas de las rutas de muerte celular.

9. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

El trabajo anterior permite recomendar la aplicación de la técnica de cDNA-AFLPs para el estudio de la detección de expresión diferencial en *E. histolytica*.

A partir de los resultados obtenidos se sugieren los siguientes trabajos:

1. Medir niveles de expresión de calpaina-like, y catepsina después de inducir el proceso de MCP por G418 en *E. histolytica* para tratar de conectar los genes previamente encontrados a una vía apoptótica.
2. Continuar con la búsqueda de genes activadores e inhibidores del proceso de MCP inducido con especies reactivas de oxígeno y peróxido de hidrógeno utilizando la metodología de cDNA-AFLPs, para tratar de elucidar algunas rutas apoptóticas independientes de cistein-proteasas.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña-Soto R, Samuelson J, De Girolami P, Zárate L, Millán-Velasco F, Schoolnick, Wirth D: **Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica***. *Am J Trop Med Hyg* 1993, **48**:58-70.
2. Adams JM, Cory S: **The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival**. *Science* 1998, **81**:1322-1326.
3. Al-Olayan EM, Williams GT, Hurd H: **Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito**. *Int J Parasitol* 2002, **32**:1133–1143.
4. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J: **Human ICE/CED-3 protease nomenclature**. *Cell* 1996, **87**:171.
5. Amitai S, Yassin Y, Engelberg-Kulka H: **MazF-mediated cell death in *Escherichia coli*: a point of no return**. *J Bacteriol* 2004, **186**:8295-8300.
6. Ameisen JC, Idziorek T, Billaut-Mulot O, Loyens M, Tissier JP, Potentier A, Ouaisi A: **Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival**. *Cell Death Diff* 1995, **2**:285-300.
7. Anaya-Velázquez F, Padilla-Vaca F: **Effect of intestinal bacteria on the virulence of *Entamoeba histolytica***. *Arch Med Res* 1992, **23**:183–185.
8. Andra J, Leippe M: **Pore forming peptide of *Entamoeba histolytica* significance of positively charged amino acid residues for its mode of action**. *FEBS* 1994, **354**:97-102.
9. Ankri S, Stolarsky T, Mirelman D: **Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis**. *Mol Microbiol* 1998, **28**: 777-785.
10. Antonsson B, Martinou JC: **The Bcl-2 protein family**. *Exp Cell Res* 2000, **256**:50-57.
11. Arbo A, Hoefsloot M, Ramirez A, Ignacio-Santos J: ***Entamoeba histolytica* inhibits the respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes**. *Arch Invest Med (Méx)* 1990, 21(Suppl 1):57–61.
12. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH: **Apoptosis: the role of endonuclease**. *Am J Pathol* 1990, **136**:593-608.
13. Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit PX, Estaquier J, Ameisen JC: **On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization** *Cell Death Differ* 2002, **9**:65-81.
14. Arroyo R, Orozco E: **Location and Identification of *Entamoeba histolytica* adhesion**. *Mol Biochem Parasitol* 1987, **110**:177-182.
15. Ashkenazi A, Dixit VM: **Death receptors: signaling and modulation**. *Science* 1998, **281**:1305-1308.

16. Bachem CW, van der Hoven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RG: **Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development.** *Plant J* 1996, **9**:745-753.
17. Bar-Nun S, Shneyour Y, Beckmann JS: **G-418 an elongation inhibitor of 80S ribosomes.** *Biochim Biophys Acta* 1983, **741**:123-127.
18. Barbarics E, Kronauge JF, Cohen D, Davison A, Jones AG, Croop JM: **Characterization of P-glycoprotein transport and inhibition in vivo.** *Cancer Res* 1998, **58**:276-282.
19. Becker SM, Cho KN, Guo X, Fendig K, Oosmn MN, Whitehead R, Cohn SM, Houpt RE: **Epithelial Cell Apoptosis Facilitates *Entamoeba histolytica* Infection in the Gut.** *Am J Pathol* 2010, **176**:1316-1322.
20. Berent SL, Radin NS: **Mechanism of activation of glucocerebrosidase by co-beta-glucosidase (glucosidase activator protein).** *Biochem Biophys Acta* 1981, **664**:572-582.
21. Bernal G: **Disentería Amibiana.** *Cir Ciruj* 1997, **65**:151-156.
22. Berninghausen O, Leippe M: **Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*.** *Infect Immun* 1997, **65**:3615-3621.
23. Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, Wang GH, Senkevich TG, Alnemri ES, Moss B, Lenardo MJ, Tomaselli KJ, Cohen JI: **Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas and TNFR1-induced apoptosis.** *Proc Natl Acad Sci* 1997, **94**:1172-1176.
24. Bhattacharya A, Padhan N, Jain R, Bhattacharya S: **Calcium-Binding Proteins of *Entamoeba histolytica*.** *Arch Med Res* 2006, **37**:221-225.
25. Bhattacharya A, Anand MT, Jayshree P, Yadav N, Bhattacharya S: **Molecular changes in *Entamoeba histolytica* in response to bacteria.** *J Eukaryot Microbiol* 1998, **45**:28S-33S.
26. Bhattacharya A, Ghildyal R, Prasad J, Bhattacharya S, Diamond LS: **Modulation of a surface antigen of *Entamoeba histolytica* in response to bacteria.** *Infect Immun* 1992, **60**:1711-1713.
27. Billaut M, Fernández-Gómez R, Lovens M, Ouaiissi A: ***Trypanosoma cruzi* elongation factor 1-alpha: nuclear localization in parasites undergoing apoptosis.** *Gene* 1996, **174**:19-26.
28. Birbes H, Luberto C, Hsu YT, El Bawab S, Hannun YA, Obeid LM: **A mitochondrial pool of sphingomyelin is involved in TNF-alpha-induced Bax translocation to mitochondria.** *Biochem J* 2005, **386**:445-451.
29. Blazquez S, Rigotherier MC, Huerre M, Guillén N: **Initiation of inflammation and cell death during liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* depends on activity of the galactose/N-acetyl-D-galactosamine lectin.** *Int J Parasitol* 2007, **37**:425-433.

30. Boettner DR, Petri WA: ***Entamoeba histolytica* activates host cell caspases during contact-dependent cell killing.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2005, **289**:175-184.
31. Brenner B, Koppenhoefer U, Weinstock C, Linderkamp O, Lang F, Gulbins E: **Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac-1 regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD 153.** *J Biol Chem* 1997, **272**:22173–22181.
32. Bracha R, Mirelman D: **Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole.** *J Exp Med* 1984, **160**:353–368.
33. Bracha R, Nuchamowitz Y, Mirelman D: **Amoebapore is an important virulence factor of *Entamoeba histolytica*.** *J Biosci* 2002, **27**:579-587.
34. Braga LL, Ninomiya H, McCoy JJ, Eacker S, Wiedmer T, Pham C, Word S, Sim PJ, Petri WA: **Inhibition of complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*.** *J Clin Invest* 1992, **90**:1131-1137.
35. Bruchhaus I, Richter S, Tannich E: **Removal of hydrogen peroxide by the 29kDa protein of *Entamoeba histolytica*.** *Biochem J* 1997, **326**:785–789.
36. Bruchhaus I, Roeder T, Rennenberg A, Heussler V: **Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism.** *Trends Parasitol* 2007, **23**:376-383.
37. Bruhn H: **A short Guided tour through functional and structural features of saponin-like proteins.** *Biochem J* 2005 **389**:(Pt 2), 249-257.
38. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME: **Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase.** *Science* 2004, **303**:2011-2015.
39. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X: **Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999, **15**:269–290.
40. Cappelli K, Porceddu A, Verini-Supplizi A, Capomaccio S, Marchis FD, Falcinelli M, Gaiti A, Silvestelli M: **cDNA AFLP-based techniques for studying transcript profiles in horses.** *Res Vet Sci* 2005, **79**:105-112.
41. Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Zamzani N, Marchetti P, Macho A, Kroemer G: **Sequential acquisition of mitochondria and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis.** *J Immunol* 1996, **157**:512-521.
42. Chadee K, Petri WA, Innes DJ, Ravdin JI: **Rat and human colonic mucins bind to and inhibit the adherence lectin of *Entamoeba histolytica*.** *J Clin Invest* 1987, **80**: 1245-1254.
43. Chávez-Munguía B, Talamás-Rohana P, Ríos A, González-Lázaro M, Martínez-Palomo: ***Entamoeba histolytica*: fibrillar aggregates in dividing trophozoites.** *Exp Parasitol* 2008, **118**:280-284.
44. Chen YC, Shen SC, Tsai SH: **Prostaglandin D2 and J2 induce apoptosis in human leukemia cells via activation of caspase 3 cascade and**

- production of reactive oxygen species.** *Biochem. Biophys Acta* 2005, **1743**:291-304.
45. Chomczynski P, Sacchi N: **Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 1987, **162**:156-159.
46. Colón-Ramos DA, Shenvi CL, Weitzel DH, Gan EC, Matts R, Cate J, Kornbluth S: **Direct ribosomal binding by a cellular inhibitor of translation.** *Nat Struct Mol Biol* 2006, **13**:103-111.
47. Compton MM: **A biochemical hallmark of apoptosis: Internucleosomal degradation of the genome.** *Cancer Metast Rev* 1992, **11**: 105-119.
48. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Staiano-Coico L, Kapuscinski J, Melamed MR: **Interactions of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry.** *Cancer Res* 1982, **42**:799-806.
49. Das M, Mukherjee SB, Shaha C: **Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes.** *J Cell Sci* 2001, **114**:2461-2469.
50. De Stefanis D, Reffo P, Bonelli G, Baccino FM, Sala G, Ghidoni R, Codogno P, Isidoro C: **Increase in ceramide level alters the lysosomal targeting of Cathepsin D prior to onset of apoptosis in HT-29 colon cancer cells.** *Biol Chem* 2002, **383**:989–999.
51. Denis M, Chadee K: **Human neutrophils activated by interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha kill *Entamoeba histolytica* trophozoites in vitro.** *J Leukoc Biol* 1989, **46**:270–274.
52. Denny PW, Goulding D, Ferguson MA, Smith DF: **Sphingolipid-free *Leishmania* are defective in membrane trafficking, differentiation and infectivity.** *Mol Microbiol* 2004, **52**:313-327.
53. Dey I, Keller K, Belley A, Chadee K: **Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*.** *PNAS* 2003, **100**:13561–13566.
54. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC: **A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978, **72**:431–432.
55. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X: **Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.** *Cell* 2000, **102**:33-42.
56. Eckmann L, Reed SL, Smith JR, Kagnoff MF: ***Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha.** *J Clin Invest* 1995, **96**:1269–1279.
57. Edinger AL, Thompson CB: **Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy.** *Curr Opin Cell Biol.* 2004, **16**:663-669.
58. Ekkapongpisit M, Wannatung T, Susantad T, Triwitayakorn K, Smith DR: **cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in human hepatoma cells (HepG2) upon dengue virus infection.** *J Med Virol* 2007, **79**:552-561.

59. Elnekave K, Siman-Tov R, Ankris S: **Consumption of L-arginine mediated by *Entamoeba histolytica* L-arginase (EhArg) inhibits amoebicidal activity and nitric oxide production by activated macrophages.** *Parasite Immunol* 2003, **25**:597–608.
60. Endersen PC, Prytz PS, Aarbakke J: **A new flow cytometric method for discrimination of apoptotic cells and detection of their cell cycle specificity through staining of F-actin and DNA.** *Cytometry* 1995, **20**:162-171.
61. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: **Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.** *J Immunol* 1992, **148**:2207-2216.
62. Gannavaram S, Vedvyas C, Debrabant A: **Conservation of the pro-apoptotic nuclease activity of endonuclease G in unicellular trypanosomatid parasites.** *J Cell Sci* 2008, **121**:99-109.
63. Ghadirian E, Denis M: ***Entamoeba histolytica* extract and interferon-gamma activation of macrophage-mediated amoebicidal function.** *Immunobiology* 1992, **185**:1–10.
64. Ghosh AS, Dutta S, Raha S: **Hydrogen peroxide-induced apoptosis-like cell death in *Entamoeba histolytica*.** *Parasitol Int* 2010, **59**:166-172.
65. Godbold GD, Mann BJ: **Involvement of the actin cytoskeleton and p21 rhotfamily GTPase in the pathogenesis of the human protozoan parasite *Entamoeba histolytica*.** *Braz J Med Biol Res* 1998, **31**:1049-1058.
66. Graidist P, Yazawa M, Tonganunt M, Nakatomi A, Lin C, Chang J, Phongdaras A, Fujise K: **Fortilin bind Ca²⁺ and blocks Ca²⁺ dependent apoptosis in vivo.** *Biochem J* 2007, **408**:181-191.
67. Guerrant RL, Brush J, Ravdin JI, Sullivan JA, Mandell GL: **Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils.** *J Infect Dis* 1981, **143**:83–93.
68. Gutiérrez-Alarcón A, Moguel-Torres M, Mata-Leyva O, Cuellar-Nevarez G, Siqueiros-Cendón T, Erosa G, Ramos-Martínez E, Talamás-Rohana P, Sánchez-Ramírez B: ***Entamoeba histolytica*: inflammatory process during amoebic liver abscess formation involves cyclooxygenase-2 expression in macrophages and trophozoites.** *Exp Parasitol* 2006, **114**:154–159.
69. Hall TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucl Acids Symp* 1999, Ser **41**:95-98.
70. Hanna RM, Dahniya MH, Bard SS, El-Betagy A: **Percutaneous catheter drainage in drug-resistant amoebic liver abscess.** *Trop Med and Int Health* 2000, **5**:578-581.
71. Haque R, Ali IKM, Sack RB, Ramakrishnan G, Farr BM, Petri WA Jr: **Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children.** *J Infect Dis* 2001, **183**:1787–1793.

72. Haque R, Mondal D, Duggal P, Kabir M, Roy S, Farr BM, Sack RB, Petri WA Jr.: ***Entamoeba histolytica* Infection in Children and Protection from Subsequent Amebiasis.** *Infect Immun* 2006, **74**:904–909.
73. Harder S, Bente M, Isermann K, Bruchhaus I: **Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in *Leishmania donovani*.** *Eukaryot. Cell* 2006, **5**:861-870.
74. Hegde R, Srinivasula MS, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos SA, Alnemri FT: **Identification of Omi/HtrA2 as a Mitochondrial Apoptotic Serine Protease That Disrupts Inhibitor of Apoptosis Protein-Caspase Interaction.** *J Biol Chem* 2002, **277**:432-438.
75. Horvitz HR, Shaham S, Hengartner MO: **The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994, **59**:377-385.
76. Hu S, Vincenz C, Buller M, Dixit VM: **A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95 and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis.** *J Biol Chem* 1997, **272**:9621–9624.
77. Huston CD, Boettner DR, Miller-Sims V, Petri WA Jr: **Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*.** *Infect Immun* 2003, **71**:964-972.
78. Isibasi A, Santa Cruz M, Ramírez A, Kumate J: **Inmunoquímica de una lipofosfoglicana extraída de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* cepa HK cultivados en medio axénico, utilizando el método de fenol agua.** *Arch Invest Med* 1982, **13**:51-55.
79. Jaattela M: **Escaping cell death: survival proteins in cancer.** *Exp Cell Res* 1999, **248**:30–43.
80. Jacobson MD, Burne JF, Raff MC: **Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus.** *EMBO J* 1994, **13**:1899-1910.
81. Jarillo-Luna RA, Campos-Rodríguez R, Tsutsumi V: ***Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance.** *Exp Parasitol* 2002, **101**:40–56.
82. Jiang X, Wang X: **Cytochrome c-Mediated apoptosis.** *Annu Rev Biochem* 2004, **73**:87-106.
83. Jin QH, Zhao B, Zhang XJ: **Cytochrome c release and endoplasmic reticulum stress are involved in caspase-dependent apoptosis induced by G418.** *Cell Mol Life Sci* 2004, **61**:1816–1825.
84. Kashkar H, Wiegmann K, Yazdanpanah B, Haubert D, Kronke M: **Acid sphingomyelinase is indispensable for UV light-induced Bax conformational change at the mitochondrial membrane.** *J Biol Chem*, 2005, **280**:20804–20813.
85. Kaur U, Sharma AK, Sharma M, Vohra H: **Distribution of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin specific antibody response in an endemic area.** *Scand Journal Immunol* 2004, **60**:524–528.

86. Keene WE, Hidalgo ME, Orozco E, McKerrow JH: **Entamoeba histolytica: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine protease.** *Exp Parasitol* 1990, **71**:199-206.
87. Kelsall BL, Ravdin JI: **Degradation of human immunoglobulin A by Entamoeba histolytica.** *J Infect Dis* 1993, **168**:1319-1322.
88. Kerr JFR, Wyllie, AH, Currie, AR: **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics.** *Br J Cancer* 1972, **26**:239-257.
89. Kim KA, Lee YA, Shin MH: **Calpain- dependent calpastatin cleavage regulates caspase-3 activation during apoptosis of Jurkat T cells induced by Entamoeba histolytica.** *Int J Parasitol* 2007, **37**:1209-1219.
90. Ko YG, Kim EY, Kim T, Park H, Park HS, Choi EJ, Kim S: **Glutamine-dependent antiapoptotic interaction of human glutamyl-tRNA synthetase with apoptosis signal-regulating kinase 1.** *J Biol Chem*, 2001, **276**:6030-6036.
91. Kong JY, Klassen SS, Rabkin SW: **Ceramide activates a mitochondrial p38-mitogen activated protein kinase: a potential mechanism for loss of mitochondrial transmembrane potential and apoptosis.** *Mol Cell Biochem* 2005, **278**:39–51.
92. Kosec G, Alvarez VE, Aguero F, Sánchez D, Dolinar M, Turk V, Cazzulo JJ: **Metacaspases of Trypanosoma cruzi: possible candidates for programmed cell death mediators.** *Mol. Biochem Parasitol* 2006, **145**:18-28.
93. Le Chat T, Sinden RE, Dessens JT: **The role of metacaspase 1 in Plasmodium berghei development and apoptosis.** *Mol Biochem Parasitol* 2007, **153**:41-47.
94. Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi HL: **Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite Leishmania.** *Cell Death Differ* 2002, **9**:53-64.
95. Lee S, Christakos S, Small MB: **Apoptosis and signal transduction: clues to a molecular mechanism.** *Curr Opin Cell Biol* 1993, **5**:286-291.
96. Leippe M, Tanich E, Nickel R, Van der Goot G, Pattus F, Horstmann RD, Muller-Eberhard HJ: **Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic Entamoeba histolytica.** *EMBO J* 1992, **11**:3501-3506.
97. Leippe M, Andra J, Nickel R, Tanich E, Muller-Eberhard HJ: **Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of Entamoeba histolytica: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes.** *Mol Microbiol* 1994, **14**:895-904.
98. Li E, Becker A, Stanley SL: **Chinese hamster ovary cells deficient in N-acetyl-glucosaminyltransferase I activity are resistant to Entamoeba histolytica-mediated cytotoxicity.** *Infect Immun* 1989, **57**:8-12.
99. Li LY, Luo X, Wang X: **Endocleasin G is an apoptotic DNase when released from mitochondria.** *Nature* 2001, **412**:95-99.

100. Lidell ME, Moncada DM, Chadee K, Hansson GC: **Entamoeba histolytica cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel.** *Proc Natl Acad Sci* 2006, **103**:9298-9303
101. Lin JY, Keller K, Chadee K: **E. histolytica proteins modulate the respiratory burst potential by murine macrophages.** *Immunology* 1993, **78**:291–297.
102. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) Method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.
103. Lozano J, Berra E, Municio MM: **Protein kinase C zeta isoform is critical for NF-kappaB dependent promoter activation by sphingomyelinase.** *J Biol Chem* 1994, **269**:19200–19202.
104. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chan D, Su F, Shiloh A, Guarante L, Gu W: **Negative control of p53 by Sir2 alpha promotes cell survival under stress.** *Cell* 2001, **107**:137-148.
105. Lynch EC, Rosenberg IM, Gitler C: **An ion-channel forming protein produced by Entamoeba histolytica.** *EMBO J* 1982, **1**:801-804.
106. Madeo F, Herker E, Maldener C, Wissing S, Lachelt S, Herlan M, Fehr M, Lauber K, Sigrist SJ, Wesselborg S, Frohlich KU: **A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast.** *Mol Cell* 2002, **9**:911-917.
107. Magno G, Joris I: **Apoptosis, oncosis y necrosis. An overview of cell death.** *Am J Pathol* 1995, **146**:3-16.
108. Martínez-Palomo
109. A: **Biology of Entamoeba histolytica.** *Amebiasis. Amsterdam-Elsevier* 1986, 12-43.
110. Martínez-Palomo A.C. **Amibiasis.** Editorial Médica. Panamericana México 1989, pp 206.
111. Martínez-Palomo A, Tsutsumi V, Anaya-Velázquez F, González-Robles A. **Ultrastructure of experimental intestinal invasive amebiasis.** *Am J Trop Med Hyg* 1989;**41**:273–279
112. Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dinwall C, Downward J: **The Serine Protease Omi/HtrA2 Regulates Apoptosis by Binding XIAP through a Reaper-like Motif.** *J Biol Chem* 2002, **277**:439-444.
113. McConkey DJ, Nicotera P, Hatzell P, Bellomo G, Wyllie AH, Orrenius S: **Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration.** *Arch Biochem Biophys* 1989, **269**:365-370.
114. Meza I, Cazares F, Rosales-Encina JL, Talamás-Rohana P, Rojkind M: **Use of antibodies to characterize a 220-kilodalton surface protein from Entamoeba histolytica.** *J Inf Dis* 1987, **156**:798-805.
115. Mroczek S, Kufel J: **Apoptotic signals induce specific degradation of ribosomal RNA in yeast.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**:2874–2888.
116. Moiera MEC, Del Portillo HA, Milder R, Balanco JMF, Barcinski MA: **Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular**

- organism *Leishmania (Leishmania amazonensis)*. *J Cell Physiol* 1996, 167:305-313.**
117. Moreno SNJ, Docampo R: **Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol* 2003, 6:359-364.**
118. Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarante L: **Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 2004, 116:551-563.**
119. Munford RS, Sheppard PO, O'Hara PJ: **Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *J Lipid Res* 1995, 36:1653-1663.**
120. Muñoz ML, Calderón J, Rojkind M: **The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 1982, 155:42-51.**
121. Nasirudeen MA, Tan KS: **Caspase -3 like protease influences but is not essential for DNA fragmentation in *Blastocystis* undergoing apoptosis. *Eur J Cell Biol* 2004, 83:477-482.**
122. Nasirudeen, MA, Yap Eu Hian, Mulkit Singh, Tan SWK: **Metronidazole induces programmed cell death in the protozoan parasite *Blastocystis hominis*. *Microbiology* 2004, 150:33-43.**
123. Nickel R, Jacobs T, Urban B, Scholze H, Bruhn H, Leippe M: **Two novel calcium-binding proteins from cytoplasmic granules of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *FEBS Lett.* 2000, 486:112-116.**
124. Organización Mundial de la Salud. **Amoebiasis. *Epidemiol Rec* 1997, 72:97-100.**
125. Orozco E, Martínez-Palomo A, González-Robles A: **Las interacciones lectina- receptor median la adhesión de *Entamoeba histolytica* a sus células epiteliales. *Arch. Inv. Med (Mex)* 1982,13:153-157.**
126. Orozco E, Gharabeh R, Riverón AM, Delgadillo DM, Mercado M, Sánchez T, Gómez CE, Vargas MA, Lopez-Revilla R: **A novel cytoplasmic structure containing DNA networks in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Mol Gen Genet* 1997, 254:250-257.**
127. Ouassi A: **Apoptosis-like death in trypanosomatids: search for putative pathways and genes involved. *Kinetoplastic Biol Dis* 2003, 2: 5.**
128. Padilla-Vaca F, Ankri S, Bracha R, Koole LA, Mirelman D: **Down regulation of *Entamoeba histolytica* virulence by monoxenic cultivation with *Escherichia coli* O55 is related to a decrease in expression of the light (35-kilodalton) subunit of the Gal/GalNAc lectin. *Infect Immun* 1999, 67:2096-2102.**
129. Pankova-Kholmyvansky I, Dagan A, Gold D, Zaslavsky Z, Skutelsky E, Gatt S, Flescher E: **Ceramide mediates growth inhibition of the *Plasmodium falciparum* parasite. *Cell Mol Life Sci* 2003, 60:577-587.**
130. Peng BW, Lin J, Lin JY, Jiang MS, Zhang T: **Exogenous nitric oxide induces apoptosis in *Toxoplasma gondii* tachyzoites via a calcium signal transduction pathway. *Parasitology* 2003, 126 (Pt 6):541-550.**
131. Petri WA, Smith RD, Schlesinger PH, Murphy CF, Ravdin JI: **Isolation of the galactose-binding lectin that mediated the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* 1987, 80:1238-1244.**

132. Piacentini M, Fesus I, Farrace MC, Ghilbelli L, Piredda I, Meline G: **The expression of “tissue” transglutaminase in two human cancer cell lines is related to the programmed cell death (apoptosis).** *Eur J Cell Biol* 1995, **54**:246-254.
133. Piacenza L, Irigoien F, Alvarez MN, Peluffo G, Taylor MC, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R: **Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in trypanosoma cruzi: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression.** *Biochem* 2007, **403**:323-334.
134. Picot S, Burnod J, Bracchi V, Chumpitazi BF, Ambroise-Thomas P: **Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997, **91**:590–591.
135. Que X, Kim SH, Sajid M, Eckmann L, Dinarello Ca, Mckerrow JH, Reed SL: **A surface amebic cysteine proteinase inactivates interleukin-18.** *Infect Immun* 2003, **71**:1274-1280.
136. Quezada-Calvillo R, López RR: **IgA protease in *Entamoeba histolytica* trophozoites.** *Adv Exp Med Biol* 1986, **216B**:1283-1288.
137. Ramos E, Olivos-García A, Nequiz M, Saavedra E, Tello E, Saralegui A, Montfort I, Pérez TR: ***Entamoeba histolytica*: Apoptosis induced in vitro by nitric oxide species.** *Exp Parasitol* 2007, **116**:257-265.
138. Ramos F, Moran P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, García de León MC, Melendro EI, Valadez A, Ximenez C: **High prevalence rate of *E. histolytica* asymptomatic infection in a rural mexican community.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **73**:87-91.
139. Rasmussen RP: **Quantification on the LightCycler.** In S. Meuer, C.T. Wittwer, and K Nakagawara (Eds.), *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications.* Springer Press, Heidelberg 2001, 21-34.
140. Ravdin JI, Guerrant RL: **Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*: Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes.** *J Clin Invest* 1981, **68**:1305-1313.
141. Ravdin JI, Sperelakis N, Guerrant RL: **Effect of ion channel inhibitors on the cytopathogenesis of *Entamoeba histolytica*.** *J Infect Dis* 1982, **146**:335-340.
142. Ravdin JI, Murphy CF, Salata RA, Guerrant RL, Hewlett EL: **N-Acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. Partial purification and relation to amoebic virulence in vitro.** *J Infect Dis* 1985, **151**:804-815.
143. Ravdin JI: **Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: Studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis.** *Rev Infect Dis* 1986, **8**:247-260.
144. Reed SL, Curd JG, Gigli I, Guillin FD, Braude AI: **Activation of complement by pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*.** *J Immunol* 1986, **136**:2265-2270.

145. Reed SL, Keene WE, Mckerrow JH: **Thiol proteinase expression correlates with pathogenicity of *Entamoeba histolytica***. *J Clin Microbiol* 1989, **27**:2772-2777.
146. Reed SL, Gigli I: **Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components**. *J Clin Invest* 1990, **86**:1815-1822.
147. Reijans M, Lascaris R, Groeneger AO, Wittenberg A, Werrelink E, Van Oeveren J, de Wit E, Boorsma A, Voetdijk B, van der Spek H, Grivell LA, Simons G: **Quantitative comparison of cDNA-AFLP, microarrays, and GeneChip expression data in *Saccharomyces cerevisiae***. *Genomics* 2003, **82**:606-618.
148. Rico G, Leandro E, Rojas S, Giménez JA, Kretschmer RR: **The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes**. *Parasitol Res* 2003, **90**:264-267.
149. Ridgley EL, Xiong Z, Ruben L: **Reactive oxygen species activate Ca²⁺ dependent cell death pathways in the unicellular organism *Trypanosoma brucei brucei***. *Biochem J* 1999, **340**:33-40.
150. Rinehart J, Horn EK, Wei D, Soll D, Schneider A: **Non-canonical eukaryotic glutaminyl- and glutamyl-tRNA synthetases form mitochondrial aminoacyl-tRNA in *Trypanosoma brucei***. *J Biol Chem* 2004, **279**:1161-1166.
151. Robinson LJ, Roberts WK, Ling TT, Lamming D, Sternberg SS, Roepe PD: **Human MDR protein overexpression delays the apoptotic cascade in Chinese hamster ovary fibroblasts**. *Biochemistry* 1997, **36**:11169-11178.
152. Rodríguez MA, Hernández F, Santos L, Valdés J, Orozco E: ***Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship**. *Mol Biochem Parasitol*, 1989, **37**:87-100.
153. Rosenberg IM, Gitler C: **Subcellular fractionation of amoebapore and plasma membrane components of *Entamoeba histolytica* using self generated Percoll gradients**. *Mol Biochem Parasitol*, 1985, **14**:231-248.
154. Salata RA, Martínez-Palomo A, Murray HW, Conales L, Trevino N, Segovia E, Murphy CF, Ravdin JI: **Patients treated for amebic liver abscess develop cell mediated immune responses effective in vitro against *Entamoeba histolytica***. *J Immunol* 1986, **136**:2633-2639.
155. Salata RA, Ravdin JI: **The interaction of human neutrophils and *Entamoeba histolytica* trophozoites increases cytopathogenicity for liver cell monolayers**. *J Inf Dis* 1986, **154**:19-26.
156. Schulze-Osthoff K, Walczak H, Droge W, Kramer PH: **Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis**. *J Cell Biol* 1994, **127**:15-20.
157. Schumacher AM, Valentza AV, Wateison DM, Dresios J: **Death-associated protein kinase phosphorylates mammalian ribosomal protein S6 and reduces protein synthesis**. *Biochem* 2006, **45**:13614-13621.

158. Se'guin R, Keller K, Chadee K: ***Entamoeba histolytica* stimulates the unstable transcription of c-fos and tumor necrosis factor- α messenger RNA by protein kinase C signal transduction in macrophages.** *Immunology* 1995, **86**:49–57.
159. Selvapandiyan A, Debrabant A, Duncan R, Muller J, Salotra P, Sreenivas G, Salisbury J, Nakha H: **Centrin Gene Disruption Impairs Stage-specific Basal Body Duplication and Cell Cycle Progression in *Leishmania*.** *J Biol Chem* 2004, **279**:25703-25710.
160. Serrano JJ, de la Garza M, Moreno MA, Tovar R, León G, Tsutsumi V, Muñoz ML: ***Entamoeba histolytica*: electron-dense granule secretion, collagenase activity and virulence are altered in the cytoskeleton mutant BG-3.** *Mol Microbiol* 1994, **11**:787-792.
161. Seydel KB, Li E, Zhang Z, Stanley SL Jr: **Epithelial cell-initiated inflammation plays a crucial role in early tissue damage in amebic infection of human intestine.** *Gastroenterology* 1998, **115**:1446–1453.
162. Shirakabe K, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Matsuda S, Moriguchi T, Gotoh Y, Matsumoto K, Nishida E: **TAK 1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase.** *J Biol Chem* 1997, **272**:8141–8144.
163. Sim S, Yong TS, Park SJ, Im KI, Kong Y, Ryu JS, Min DY, Shin MH: **NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of ERK1/2 is required for apoptosis of human neutrophils induced by *Entamoeba histolytica*.** *J Immunol* 2005, **174**:4279-4288.
164. Sim S, Park SJ, Yong TS, IM KI, Shin MH: **Involvement of beta 2-integrin in ROS-mediated neutrophil apoptosis induced by *Entamoeba histolytica*.** *Microbes Infect* 2007, **9**:1368-1375.
165. Siman-Tov R, Ankri S: **Nitric oxide inhibits cysteine proteinases and alcohol dehydrogenase 2 of *Entamoeba histolytica*.** *Parasitol Res* 2003, **89**:146–149.
166. Singh D, Naik SR, Naik S: **Role of cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* in target cell death.** *Parasitology* 2004, **129**:127-135.
167. Stennicke HR, Salvensen GS: **Properties of caspases.** *Biochem Biophys Acta* 1998, **1387**:17-31.
168. Stanley SL, Becker A, Kunz-Jenkis C, Foster L, Ellen L: **Cloning and expression of membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats.** *Prot Natl Acad Sci* 1990, **87**:4976-4980.
169. Stuart LM, Ezekowitz RA: **Phagocytosis: elegant complexity.** *Immunity* 2005, **22**:539-550.
170. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G: **Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.** *Nature* 1999, **397**:441-446.
171. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R: **A Serine Protease, HtrA2, Is Released from the Mitochondria and Interacts with XIAP, Inducing Cell Death.** *Mol Cell* 2001, **8**:613-621.

172. Tan KS, Howe J, Yap EH, Singh M: **Do Blastocystis hominis colony forms undergo programmed cell death?** *Parasitol Res* 2001, **87**:362–367.
173. Tayama M, Soeda S, Kishimoto Y, Martin BM, Callahan JW, Hiraiwa M, O'Brien JS: **Effect of saposin on acid sphingomyelinase.** *Biochem J* 1993, **290**:401-404.
174. Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schröter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J: **Viral Flice-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors.** *Nature* 1997, **386**:517–521.
175. Tran VQ, Herdman DS, Torian BE, Reed SL: **The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding.** *J Inf Dis* 1998, **177**:508-511.
176. Tse SK, Chadee K: **Biochemical characterization of rat colonic mucins secreted response to *Entamoeba histolytica*.** *Infect Immun* 1992, **60**:1603-1612.
177. Tsuda A, Witola HW, Konnai S, Ohashi K, Onuma M: **The effect of TAO expression on PCD-like phenomenon development and drug resistance in *Trypanosoma brucei*.** *Parasitol Int* 2006, **55**:135-142.
178. Tsutsumi V, Mena-Lopez R, Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A: **Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation.** *Am J Pathol* 1984, **117**:81–91.
179. Urbina JA: **Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006, **100**: Suppl 1, S9-S16.
180. Utrera-Barillas D, Velázquez JR, Enciso A, Cruz SM, Rico G, Curiel-Quesada E, Terán LM, Kretschmer RR: **An anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica* downregulates the expression of pro-inflammatory chemokines.** *Parasite Immunol* 2003, **25**:475–482.
181. Van Loo G, Van GM, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodríguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Declercq W, Vandenabeele P: **The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity.** *Cell Death Differ* 2002, **9**:20-26.
182. Variyam EP: **Luminal bacteria and proteases together decrease adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites to Chinese hamster ovary epithelial cells: a novel host defence against an enteric pathogen.** *Gut* 1996, **39**:521–527.
183. Vergnes B, Sereno D, Madjidian-Sereno N, Lemesre J, Ouaiissi, A: **Cytoplasmic Sir2 homologue overexpression promotes survival of *Leishmania* parasites by preventing programmed cell death.** *Gene* 2002, **296**:139-150.
184. Vergnes B, Sereno D, Tavares J, Cordeiro-da-Silva A, Vanhille L, Madjidian-Sereno N, Depoix D, Monte-Alegre A, Ouaiissi A: **Targeted**

- disruption of cytosolic SIR2 deacetylase discloses its essential role in Leishmania survival and proliferation.** *Gene* 2005, **363**:85-96.
185. Vergnes B, Gourbal B, Girard I, Sundar S, Drummelsmith J, Ouellette M: **A Proteomics Screen Implicates HSP83 and a Small Kinetoplastid Calpain-related Protein in Drug Resistance in *Leishmania donovani* Clinical Field Isolates by Modulating Drug-induced Programmed Cell Death.** *Mol Cell Proteomics* 2007, **6**:88-101.
186. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silker J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL: **Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.** *Cell* 2000, **102**:43-53.
187. Villalba JD, Gómez C, Medel O, Sánchez V, Carrero JC, Shibayama M, Pérez IDG: **Programmed cell death in *Entamoeba histolytica* induced by the aminoglycoside G418.** *Microbiology* 2007, **153**:3852-3863.
188. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M: **AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.** *Nucleic Acids Res* 1995, **23**:4407-4414.
189. Wang W, Chadee K: ***Entamoeba histolytica* suppresses gamma interferon-induced macrophage class II major histocompatibility complex Ia molecule and I-A beta mRNA expression by a prostaglandin E2-dependent mechanism.** *Infect Immun* 1995, **63**:1089-1094.
190. Wang W, Keller K, Chadee K: ***Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells.** *Immunology* 1994, **83**:601-610.
191. Welburn SC, Dale C, Ellis D, Beecroft R, Pearson, TW: **Apoptosis in procyclic *T. b. rhodesiense* in vitro.** *Cell Death Diff* 1996, **3**:229-236.
192. Welburn SC, Murphy NB: **Prohibitin and RACK homologues are up-regulated in trypanosomes induced to undergo apoptosis and in naturally occurring terminally differentiated forms.** *Cell Death Differ* 1998, **5**:615-622.
193. Wiegmann K, Schoetze S, Machleidt T, Witte D, Kronke M: **Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling.** *Cell* 1994, **78**:1005-1015.
194. Winkelmann J, Leippe M, Bruhn H: **A novel saposin-like protein of *Entamoeba histolytica* with membrane-fusogenic activity.** *Mol Biochem Parasitol* 2006, **147**:85-94.
195. Wyllie AH: **Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: An overview.** *Cancer Metast Rev* 1992, **11**:95-113.
196. Wyllie AH, Arends MJ, Morris RG, Walker SW, Evan G: **The apoptosis endonuclease and its regulation.** *Seminars immunol* 1992, **4**:389-398.
197. Xanthoudakis S, Nicholson DW: **Heat shock proteins as death determinants.** *Nature Cell Biol* 2000, **2**:E163-E165.
198. Yeh WC, Itie A, Elia Aj, Ng M, Shu HB, Wakeham A, Mirtsos C, Suzuki N, Bonnard M, Goeddel DV, Mak TW: **Requirement for Casper (c-FLIP) in**

- regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development.** *Immunity* 2000, **12**:633–642.
199. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW: **Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase.** *EMBO J* 2004, **23**:2369-2380.
200. Young JD, Cohn TM, Lu LP, Unkeless JC, Cohn ZA: **Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*.** *J Exp Med* 1992, **156**:1677-1690.
201. Zangger H, Mottram JC, Fasel N: **Cell death in Leishmania induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis?** *Cell Death Differ* 2002, **9**:1126-1139.
202. Zhang X, Zhang Z, Alexander D, Bracha R, Mirelman D, Stanley SL Jr: **Expression of amoebopores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis.** *Infect Immun* 2004, **72**:678-683.

11. PRODUCTOS DERIVADOS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO

EP-09-363R2: Final Decision

De: EP (ELS) (ep@elsevier.com)
Enviado: jueves, 27 de mayo de 2010 07:30:27 a.m.
Para: vickysm17@hotmail.com

Ms. No.: EP-09-363R2
Title: Entamoeba histolytica: Differential Gene Expression during Programmed Cell Death and identification of early pro- and anti-apoptotic signals
Corresponding Author: Mr Virginia Sánchez
Authors: Maria Olivia Medel Flores; José D'Artagnan Villalba-Magdaleno; Consuelo Gómez García; David Guillermo Pérez Ishiwara, Dr.

Dear Dr. Sánchez,

I am pleased to inform you that your manuscript referenced above has been accepted for publication. Your article has been forwarded to Elsevier's Production Department, and you should be receiving confirmation from them shortly.

Many thanks for submitting your fine paper to Experimental Parasitology.

Sincerely,

John Horton
Editor-in-Chief
Experimental Parasitology

Programmed cell death in *Entamoeba histolytica* induced by the aminoglycoside G418

J. D'Artagnan Villalba,¹ Consuelo Gómez,¹ Olivia Medel,¹ Virginia Sánchez,^{1,2} Julio C. Carrero,³ Mineko Shibayama⁴ and D. Guillermo Pérez Ishiwara¹

Correspondence

D. Guillermo Pérez Ishiwara
ishiwaramx@yahoo.com.mx

¹Programa de Biomedicina Molecular ENMyH, Instituto Politécnico Nacional, CP 07320, Mexico

²Escuela Militar de Graduados de Sanidad, UDEFA CP 11620, Mexico

³Departamento de Inmunología, IIB, UNAM, Mexico

⁴Departamento de Patología Experimental CINVESTAV-IPN, CP 07300, Mexico

Received 11 April 2007
Revised 21 June 2007
Accepted 7 August 2007

This study presents morphological and biochemical evidence of programmed cell death (PCD) in *Entamoeba histolytica* induced by exposure of trophozoites to the aminoglycoside antibiotic G418. Morphological characteristics of PCD, including cell shrinkage, reduced cellular volume, nuclear condensation, DNA fragmentation and vacuolization were observed, with preservation of trophozoite membrane integrity. PCD is orchestrated biochemically by alterations in intracellular ion fluxes. In G418-treated trophozoites, overproduction of reactive oxygen species (ROS), decreased intracellular K⁺, increased cytosolic calcium, and decreased intracellular pH levels were observed. However, externalization of phosphatidylserine was not detected. These results suggest that amoebae can undergo PCD under stress conditions, and that this PCD shares several properties with PCD reported in mammals and in a variety of unicellular organisms.

INTRODUCTION

Entamoeba histolytica, the causal agent of amoebiasis, is a protozoan parasite that resides in the colon of infected humans. The invasive trophozoites adhere to mucus and epithelial cells, proliferate by binary fusion, and release proteolytic factors that destroy the intestinal mucosa, resulting in amoebic dysentery. In one in 10 patients with intestinal *E. histolytica* infection, the trophozoites migrate through the portal vein to the liver and give rise to amoebic abscesses, the main cause of death by this parasite (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). The apoptosis of host cells such as macrophages induced by contact with *E. histolytica* trophozoites has been widely studied, and it is considered an important feature of the host–parasite relationship (Ragland *et al.*, 1994; Berninghausen & Leippe, 1997).

Programmed cell death (PCD) has been considered a critical mechanism of development, differentiation and control of cellular proliferation in metazoans. However, increasing evidence indicates that PCD is also present in

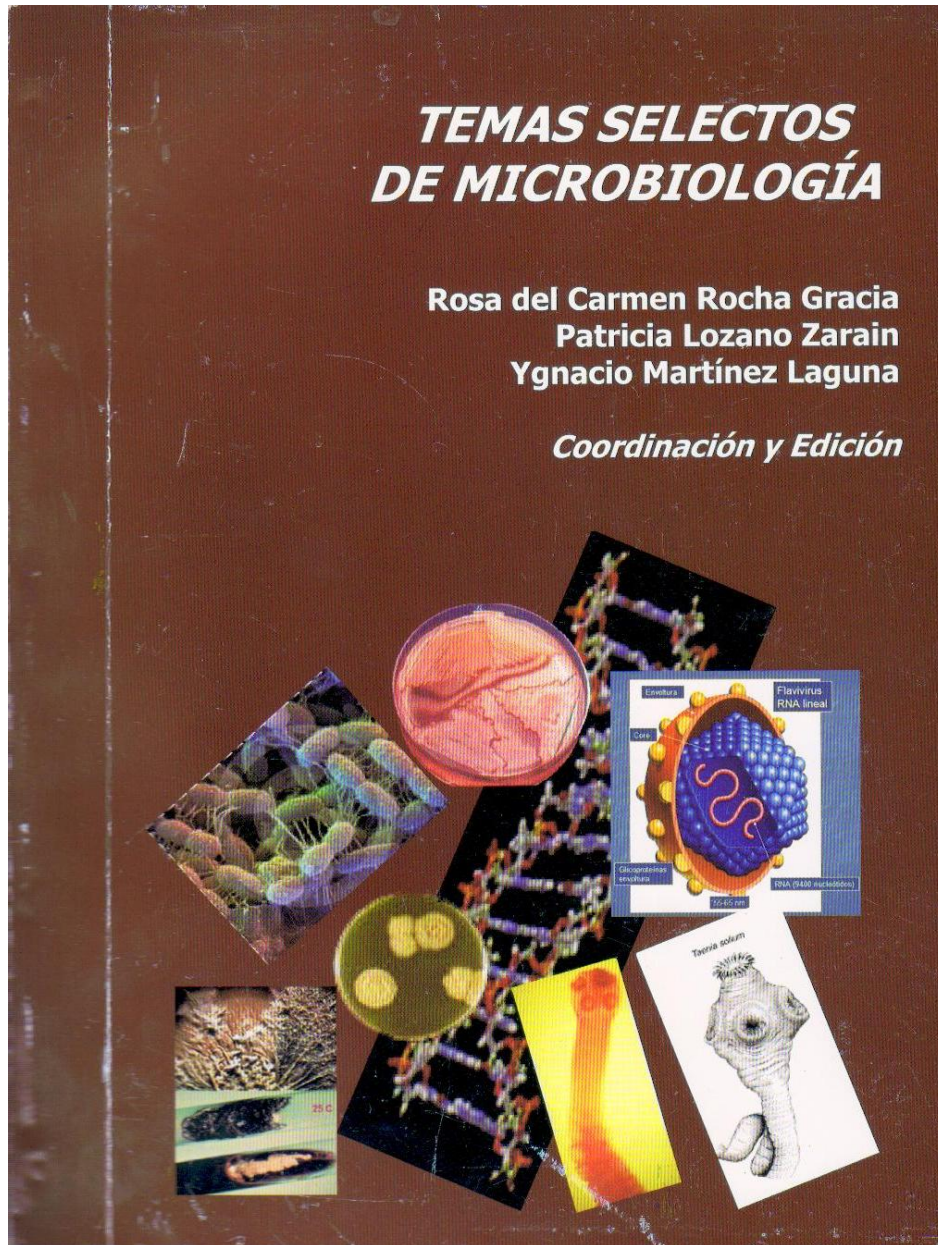
unicellular organisms. Forms of PCD such as apoptosis, apoptosis-like processes and necrosis-like processes have been identified in several bacteria (Lewis, 2000), yeast (Madeo *et al.*, 1999), the slime mould *Dictyostelium discoideum* (Cornillon *et al.*, 1994), the dinoflagellate *Peridinium gatunense* (Vardi *et al.*, 1999), the euglenoid *Euglena gracilis* (Scheuerlein *et al.*, 1995), the ciliate *Tetrahymena thermophila* (Christensen *et al.*, 1995), and the protozoan parasites *Trypanosoma*, *Leishmania* (Nguewa *et al.*, 2004) and *Plasmodium* (Al-Olayan *et al.*, 2002). Recently, results reported by Ramos *et al.* (2007) have suggested the induction of an apoptotic-like process by nitric oxide species in *E. histolytica*. Apoptosis is the result of a genetic program that induces cellular and biochemical changes, including caspase activation, externalization of phosphatidylserine (PS), an increase in intracellular Ca²⁺ and mitochondrial dysfunction, as well as physical changes such as cell shrinkage, alteration in cell volume, cytoplasmic blebbing and vacuolization, chromatin condensation, and nucleosomal fragmentation. Apoptosis is energy dependent, requiring ATP for signalling from the cytoplasm to the nucleus of the cell. The physiological role of apoptosis in protozoa is unknown. Although there is no obvious advantage at the individual level for unicellular organisms to carry the complex machinery required for PCD, the phenomenon has been related to altruistic behaviour, with clear benefits for the entire population, or as a mechanism to avoid host death (Wanderley *et al.*,

Abbreviations: BCECF, 2,7-bis(2-carboxyethyl)-5-(and 6)-carboxyfluorescein; [Ca²⁺]_i, intracellular Ca²⁺ concentration; DCFDA, dichlorodihydrofluorescein; K_i⁺, intracellular potassium; NT, not (G418) treated; PBFi-AM, potassium-binding benzofuran isophthalate; PCD, programmed cell death; pH_i, intracellular pH; PI, propidium iodide; PS, phosphatidylserine; ROS, reactive oxygen species; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotin-dUTP nick end labelling.

TEMAS SELECTOS DE MICROBIOLOGÍA

**Rosa del Carmen Rocha Gracia
Patricia Lozano Zarain
Ygnacio Martínez Laguna**

Coordinación y Edición



FACTORES DE VIRULENCIA EN *Entamoeba histolytica*

Virginia Sánchez Monroy^{2*}
María del Consuelo Gómez García¹
María Olivia Medel Flores^{*1}
José D'Artagnan Villalba Magdaleno^{*}
David Guillermo Pérez Ishiwara¹

¹Programa Institucional de Biomedicina Molecular, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENMyH del IPN.

^{*1}Estudiante de Doctorado en Biomedicina Molecular ENMyH del IPN. Guillermo Massieu Helguera 239, Fracc. La Escalera C.P. 07320 México, D.F.

² Universidad del Ejército y Fuerza Aérea Mexicanos, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Cerrada de Palomas S/N, Col. Lomas de San Isidro C.P. 11320, México, D.F.

ishiwaramx@yahoo.com.mx , dperez@ipn.mx.

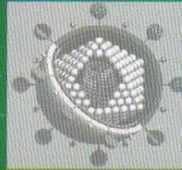
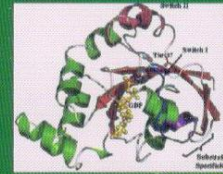
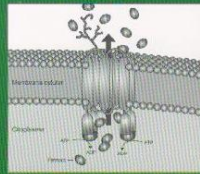
En: "Temas Selectos de Microbiología"

Rocha-Gracia Rosa del Carmen., Lozano-Zarain, Patricia y Martínez-Laguna, Ygnacio. (Eds.). 2007. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México. pp. 305-319 ISBN 978 968 9391 06 7

Mecanismos de Patogenicidad e Interacción Parásito-Hospedero II

Rosa del Carmen Rocha Gracia
Patricia Lozano Zarain
Ygnacio Martínez Laguna

Coordinación y Edición



**UNA VISIÓN SOBRE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA:
SU PROBABLE PAPEL EN LA RELACIÓN
PARÁSITO-HOSPEDERO**

**José D'Artagnan Villalba Magdaleno¹
María del Consuelo Gómez García¹
María Olivia Medel Flores¹
Virginia Sánchez Monroy¹
Ricardo Rojas Esparza¹
David Guillermo Pérez Ishiwara¹**

Centro de Biología Molecular, Sección de Estudios de
Posgrado e Investigación de la ENMyH del IPN
☞ Doctorado en Biomedicina Molecular. ENMyH-IPN
en la carrera de Medicina y Homeopatía. ENMyH-IPN
Guillermo Massieu Helguera 239, Fracc. La Escalera
C.P. 07320 México, D.F.
Tel: 5623 1111; ishiwaramx@yahoo.com.mx dperez@ipn.mx

En: "Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito hospedero II"
Rocha-Gracia Rosa del Carmen., Lozano-Zarain, Patricia y Martínez-Laguna,
Ygnacio. (Eds.). 2006. Publicación especial de la Benemérita Universidad
Autónoma de Puebla. Puebla, México. pp. 169-187 ISBN 968 9182 08 0
