



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

“Análisis del control transcripcional del gen de la Glucosamina 6-fosfato isomerasa de *Entamoeba histolytica*, enzima clave en el enquistamiento”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. EN C. JOSÉ HUGO AGUILAR DÍAZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS

DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ

COMITÉ TUTOR

DR. JUAN PEDRO LACLETTE SAN ROMÁN

DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

MEXICO, D.F. MAYO DE 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de enero de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **AGUILAR DIAZ JOSE HUGO** con número de cuenta **094197888** con la tesis titulada **"ANÁLISIS DEL CONTROL TRANSCRIPCIONAL DEL GEN DE LA GLUCOSAMINA 6-FOSFATO ISOMERASA DE ENTAMOEBIA HISTOLYTICA ENZIMA CLAVE EN EL ENQUISTAMIENTO"**, realizada bajo la dirección del **Dr. JULIO CESAR CARRERO SANCHEZ**:

Presidente: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
Vocal: DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH
Secretario: DR. JUAN PEDRO LACLETTE SAN ROMAN
Suplente: DRA. PATRICIA MARGARITA TATO ZALDIVAR
Suplente: DR. ROBERTO JOSE RAFAEL HERNANDEZ FERNANDEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de Mayo de 2012.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas** de la UNAM.

Al programa de becas para estudios de doctorado del **CONACYT, CVU/becario: 169048/169048.**

Al financiamiento otorgado por los proyectos de **CONACYT-Grant 61111 y DGAPA-IN-227707 e IN-213611-3.**

A los miembros del comité tutor:

- **Dr. Julio César Carrero Sánchez** del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

- **Dr. Juan Pedro Laclette San Román** del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

- **Dr. Roberto Coria Ortega** del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al **Dr. Julio César Carrero Sánchez**, por su dedicación, su empeño, sus consejos y total disposición para la realización de este proyecto y por la oportunidad de formar parte de su equipo.

Al **Dr. Juan Pedro Laclette**, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo, sus aportaciones, su dedicación y por todo el apoyo brindado para trabajar en su laboratorio.

A la **Dra. Dulce María Meneses Ruiz**, por todo su apoyo personal y académico, por sus aportaciones y asistencias laborales para el desarrollo y culminación de este proyecto.

Al **Dr. Roberto Coria**, por sus consejos y aportaciones a este trabajo.

A la **Dra. Ana Flisser Steinbruch**, por todo su apoyo, sus consejos y todas sus valiosas aportaciones para la culminación de este proyecto.

Al **Dr. Raúl Bobes**, por sus consejos y aportaciones.

A la **Dra. Laura Vargas Parada**, por todos sus consejos y apoyo incondicional.

A la **Dra. Emma Saavedra**, por sus aportaciones académicas y laborales en este proyecto.

A la **Dra. Martha Díaz**, por su apoyo y asistencia en el desarrollo de algunas técnicas.

Al **Dr. Jorge Morales**, por su apoyo y aportaciones para el desarrollo y culminación del proyecto.

A la **Dra. Norma Moreno**, por su asistencia y dedicación en las técnicas de microscopía electrónica de transmisión.

A la **Biol. Yolanda Ornelas**, por su asistencia en las técnicas de microscopía electrónica de barrido.

Al **Biol. Mario Nequiz** por su asistencia en el cultivo de *E. histoytica*.

DEDICATORIA

A mis padres, **José y Lolita**, por ser el motor que impulsa mi vida, por se siempre un ejemplo de superación constante y por enseñarme a ser siempre el mejor en todo los que hago, va por ustedes la tercera, los amo!!!

A mi familia **Mayra, Isabel y Alma**, hermanas nunca lo hubiera logrado sin ustedes, gracias por brindarme un calor de hogar y apoyarme, por orientarme y siempre tener una palabra de aliento para mí, las amo.

A mis sobrinas **Marijo y Tona**, hijas mías espero que siempre en su vida lleven esa luz que a mi me ha servido para seguir adelante, gracias por su amor y por todas las risas que han arrancado, las amo. **Ángel** gracias por todo el apoyo

A **Dulce María**, gracias por todo tu apoyo, en la buenas, en las malas y en las peores, por todos los momentos chidos y por dejar el alma en esto, te amo la esa!!!

A la familia **Meneses Ruiz**, gracias por todo su apoyo y cariño, por siempre tener una palabra de aliento y por dejarme formar parte de su familia, gracias! **Don Esteban Meneses, Doña Alicia Ruiz, Marthita Ruiz** (Macu), **Gabriela Meneses, Claudia Meneses y Esteban Meneses** (mi apa!) los quiero mil!!!

A mis amigos de toda la vida: **Enrique Arrellano** (piolo), **Fernando Suaste** (el Fer), **Francisco Arrellano** (Engendro), **Víctor del Río** (Vicky), **Arturo Belmont** (enano), **Araceli Argüelles** (chela), **Denise Martínez** (Denisa), **Armando Ponce** (Hippie), **Luis Mojica** (Gordito) y **Tomás Nepomuceno** (Origel).

A los del Fútbol, **Vlad, Martín, Migue, Paco, Daniel, Panther, Grouge, Sharky, Colombia, Calaba, Erick, Menonas, Come-gen y Oscar** (salgan!!!).

A **Julio César Carrero** (Chamo), por todos tus regaños, consejos, vibra y paciencia, antes que tutor eres mi amigo gracias!

A mis compañeros del laboratorio, **Yanis, Bárbara, Yulieth, Milka, José, Mariana, Oscar y Juan**.

A los del Instituto, **Oswaldo, Rene, Jaime**.

...y a todos aquellos que formaron parte de este trabajo...gracias totales!!!

“...historias de vida y trabajo que no he de perder, seré lo que deba ser o nada seré, Revolución Nacional, no pierdas la identidad!!!”

INDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	3
III. INTRODUCCIÓN.....	5
1. Antecedentes históricos.....	5
2. <i>Entamoeba histolytica</i>	9
2.1 Ubicación taxonómica.....	10
2.2 Morfología.....	11
2.2.1 Trofozoíto.....	12
2.2.2 Quiste.....	13
2.3 Ciclo de vida.....	15
3. Amibiasis.....	16
3.1 Amibiasis intestinal.....	18
3.2 Absceso hepático amibiano.....	19
3.3 Epidemiología.....	20
3.4 Patogenia.....	22
3.5 Estudios moleculares.....	24
4. El proceso de enquistamiento.....	27
5. Estructura de la pared del quiste.....	30
6. Rutas metabólicas y de señalización de los componentes de la pared del quiste...	34
7. Regulación transcripcional durante el proceso de enquistamiento.....	37
8. Enquistamiento de parásitos protozoarios.....	38
9. Inhibición del enquistamiento.....	40
10. Desenquistamiento.....	40
11. Estrés oxidativo.....	41

12. Glucosamina 6-fosfato isomerasa.....	42
13. Metabolismo de la quitina: blanco para nuevos fármacos y drogas contra parásitos...	44
14. Silenciamiento de genes.....	47
IV. RELEVANCIA E IMPACTO EN EL ÁREA DE ESTUDIO.....	52
V. HIPÓTESIS.....	53
VI. OBJETIVOS.....	54
VII. MATERIAL Y MÉTODO.....	55
1. Cultivo de parásitos.....	55
2. Ensayos de inducción del enquistamiento.....	55
3. Ensayos de viabilidad.....	56
4. Microscopia electrónica de transmisión.....	56
5. Microscopia electrónica de barrido.....	57
6. Determinación de la presencia de quitina.....	57
7. Determinación del papel de los dicatiónes metálicos en la formación de ETQ.....	59
8. Extracción de DNA, RNA y ensayos de RT-PCR.....	59
9. Ensayos de silenciamiento del gen de la Gln6Pi de <i>E. histolytica</i>	60
9.1 Evaluación la expresión de la Gln6Pi de <i>E. histolytica</i> en trofozoítos interferentes.....	60
10. Ensayos de enquistamiento con otro generador de estrés oxidativo (Menadiona)...	64
11. Ensayos de desenquistamiento en medio de Robinson.....	65
VIII. RESULTADOS.....	66
1. Ensayos de inducción del enquistamiento.....	66
2. Ensayos de viabilidad.....	67
3. Microscopia electrónica de transmisión.....	69
4. Microscopia electrónica de barrido.....	70
5. Determinación de la presencia de quitina.....	72

6. Determinación del papel de los dicatiónes metálicos en la formación de ETQ.....	74
7. Evaluación de la expresión de la Gln6Pi.....	74
8. Ensayos de silenciamiento del gen de la Gln6Pi de <i>E. histolytica</i>	77
8.1 Evaluación la expresión de la Gln6Pi en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> interferentes	79
9. Ensayos de enquistamiento con otros generadores de estrés oxidativo (Menadiona)..	84
10. Ensayos de desenquistamiento en medio de Robinson.....	84
IX. DISCUSION Y CONCLUSIÓN.....	86
X. BIBLIOGRAFÍA.....	93
XI. PUBLICACIONES OBTENIDAS.....	108

I. RESUMEN

Entamoeba histolytica protozooario causante de la amibiasis en humanos posee dos estadios en su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste. La forma infectiva el quiste, es una estructura tetranucleada formada por una cubierta de quitina que le confiere resistencia a las condiciones adversas en las que el parásito se encuentra fuera del hospedero. Los estudios sobre el quiste se han centrado en su obtención *in vitro*; sin embargo, no se ha descrito un proceso reproducible que resulte en las formas maduras infectivas. No obstante, existen reportes del enquistamiento *in vitro* de otros protozoarios como es el caso de *Giardia lamblia*, donde se ha observado que la estructura filamentosa de la pared del quiste consiste de un polímero de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), el cual es sintetizado a partir de glucosa endógena. El primer paso en la ruta biosintética de la pared de quiste y de la síntesis de GalNAc, es catalizado por la enzima glucosamina-6-fosfato isomerasa (Gln6Pi), la cual isomeriza y amina de forma reversible a la fructosa-6-fosfato en glucosamina-6 fosfato; por esta razón, es probable que el enquistamiento de *E. histolytica* también sea dependiente de su expresión. Así mismo, las condiciones luminales que inducen el proceso de enquistamiento *in vivo* aún permanecen sin dilucidarse; no obstante, el estrés oxidativo (como es la exposición a diferentes especies reactivas de oxígeno) generado por las células del sistema inmune o la microbiota intestinal, podría jugar un papel primordial en este proceso. La participación de algunos dicaciones metálicos utilizados como cofactores de ciertas enzimas involucradas en el enquistamiento y desenquistamiento también ha sido considerada. En este estudio, encontramos que el tratamiento con peróxido de hidrógeno en presencia de algunas trazas de dicaciones metálicos, es capaz de inducir la transformación de trofozoítos en estructuras pequeñas refringentes y esféricas que poseen la capacidad de resistir el tratamiento con diversos detergentes. Los análisis ultraestructurales de microscopía electrónica de transmisión y de barrido de estas estructuras, revelaron la presencia de multinucleación (hasta cuatro núcleos), aumento en el número de vacuolas citoplasmáticas, así como la presencia de una pared gruesa y lisa. Las

tinciones con calcoflúor blanco y los ensayos de unión a la aglutinina del germen de trigo (WGA) demuestran la presencia de polímeros de N-acetil glucosamina (quitina), el cual es el componente primario de las paredes de quistes en la naturaleza. Ensayos de RT-PCR mostraron la sobreexpresión de la Gln6Pi enzima limitante en la ruta metabólica de la quitina. Estos resultados sugieren que los trofozoítos activan la vía del enquistamiento cuando son expuestos a nuestro tratamiento. Por otra parte, se evaluó la participación de la Gln6Pi isomerasa en la formación de estructuras tipo quiste mediante ensayos de ARN de interferencia. Los resultados sugieren que el “knock down” de esta enzima durante el proceso de enquistamiento, resulta en la pérdida de la capacidad de los trofozoítos para formar la pared de quitina y por tanto la de resistir al tratamiento con diversos detergentes. Los resultados obtenidos en este trabajo representan un gran avance en la biología del parásito, para establecer las bases y comprender el fenómeno de enquistamiento abriendo la oportunidad de desarrollar nuevas estrategias de control para esta parasitosis de alta incidencia mundial.

II. ABSTRACT

The life cycle of the intestinal protozoan *Entamoeba histolytica*, includes two biological forms: the trophozoite and the cyst. The cyst is the infective form and has a tetranucleated structure surrounded by a chitin wall highly resistant to adverse environment conditions. In spite of the numerous *in vitro* studies focused in obtaining the infective mature forms of *E. histolytica*, a reproducible procedure in order to get the cyst forms has not yet been obtained. However, the *in vitro* encystment of other protozoan, such as *Giardia lamblia* has been reported. During the encystment process of *G. lamblia*, it has been observed that the filamentous structure of the cyst consists of a polymer of *N*-acetylgalactosamine (GalNAc). This polymer is synthesized from endogenous glucose by a biosynthetic pathway where the rate-limiting enzyme is the glucosamine-6-phosphate isomerase (Gln6Pi). This enzyme isomerizes in a reversible way from fructose-6-phosphate to glucosamine-6-phosphate, for that reason it is probable that the *E. histolytica* encystment process depends on the controlled expression of the Gln6Pi. Likewise, the luminal conditions inducing encystment of amoeba *in vivo* are also unknown, but cellular stress such as exposure to reactive oxygen species from immune cells or intestinal microbiota could be involved. A role for certain divalent cations as cofactors of enzymes involved in excyst and encystment has also been described. In this study, we show that trophozoite cultures, treated with hydrogen peroxide in the presence of trace amounts of several cations, transform into small-sized spherical and refringent structures that exhibit resistance to different detergents. Ultrastructural analysis under scanning and transmission electron microscopy revealed multinucleated structures (some with four nuclei) with smooth, thick walls and multiple vacuoles. Staining with calcofluor white, as well as an ELISA binding assay using wheat germ agglutinin, demonstrated the presence of polymers of *N*-acetylglucosamine (chitin), which is the primary component of the natural cyst walls. Over-expression of glucosamine 6-phosphate isomerase, likely to be the rate-limiting enzyme in the chitin synthesis pathway, was also confirmed by RT-PCR. These results suggest that

E. histolytica trophozoites activated encystment pathways when exposed to our treatment. Evidence is provided to support the activation of chitin biosynthesis resulting in these chitin-walled round structures that might be intermediates in the formation of infective, tetranucleated, mature cysts. On the other hand, the participation of Gln6Pi enzyme in the formation of the cyst like-structures was evaluated by RNA interference assay. Our results suggest that the Gln6Pi knock down in trophozoites results in the capacity loss of forming the chitin wall and therefore, in the lost of resistance to different detergents. The results obtained in this research represent a significant advance in the knowledge of the biology of this worldwide parasite in order to understand the encystment process in amoeba and develop new control strategies that may lead to eradication of this protozoan.

III. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes históricos

En la actualidad, el índice de infecciones intestinales causadas por parásitos protozoarios ha ido en aumento. Este crecimiento se localiza especialmente en zonas geográficas donde las condiciones socioeconómicas se asocian a la deficiente infraestructura y la pobreza extrema, sumadas a las condiciones ecológicas que favorecen la persistencia de los parásitos. Estos factores son característicos de los países en vías de desarrollo y lamentablemente en los últimos 50 años no hay avances relevantes en el control de las parasitosis. En México, las infecciones intestinales representan un problema de salud pública importante, ya que son las principales causas de morbilidad en la población.

La diarrea es un padecimiento que se presenta comúnmente durante el curso de una infección intestinal siendo los virus, bacterias y algunos protozoarios parásitos, los principales responsables de causar este tipo de afecciones en el hombre. Entre las principales infecciones causados por protozoarios se encuentran la Giardiasis causada por *Giardia duodenalis*, la enteritis causada por coccidias (*Isospora belli*, *Sarcocystis*, *Cyclospora*, *Cryptosporidium*) y la amibiasis causada por *Entamoeba histolytica*. Actualmente, se reconocen cinco especies de amiba que colonizan el intestino grueso del hombre: *E. histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba coli* y *Entamoeba moshkovskii*, de las cuales solo *E. histolytica* es patógena para el ser humano (Radvin 2000).

Los antecedentes de la infección por *E. histolytica* han existido probablemente desde que la especie humana se diferenció de sus predecesores inmediatos en el curso de la evolución. La fiebre y la disentería son dos de los padecimientos que dominaron prominentemente la literatura médica antigua. Los síntomas clásicos de una disentería amibiana también se encuentran referidos en documentos muy antiguos (Martínez-Palomo 1987). Desde el siglo V a.c. en muchos de los trabajos recopilatorios de Hipócrates, es posible identificar al padecimiento referido como

disentería, así como las primeras descripciones de las enfermedades ulcerativas del intestino (460-337 d.c). Los médicos romanos y algunos individuos dedicados al arte de curar durante la Edad Media, dejaron clara evidencia de este padecimiento que, actualmente, se encuentra asociado a diferentes patologías (incluida la amibiasis) (Martínez-Palomo 1987). Sin embargo, no fue sino hasta la segunda mitad del siglo XVII cuando se realizó un estudio detallado de un caso de disentería en el que se encontró una gran cantidad de células con movimientos parecidos a una amiba provenientes de las evacuaciones del paciente (Martínez-Palomo 1987). Tiempo después, estas células fueron identificadas como agentes causales del padecimiento asociado a la disentería amibiana y a otras manifestaciones clínicas (Martínez-Palomo 1987). En 1755, un científico llamado Rösel Van Rosenhof, examinó muestras que contenían células que parecían cambiar de forma al moverse. A estas células las llamó “*pequeños Proteos*”, que tiempo después fueron renombradas con el término “*amibas*”, del griego *amoibe*, que significa “*cambio*” (Romero-Cabello 2008). Lambl en 1860 publica el hallazgo de un microorganismo similar a una amiba encontrado en las heces de un niño que padecía diarrea infantil; sin embargo, la presencia del microorganismo no se asoció directamente a la infección por lo que no fue considerado como patógeno (Romero-Cabello 2008). Años más tarde, Lewis en 1870 y Cunningham en 1871, descubren y aíslan amibas a partir de evacuaciones de pacientes con cólera, estableciendo la asociación de la presencia del microorganismo con este padecimiento. En 1875, el doctor Fedor Aleksandrovich Lesh publicó en la revista *Virchows Archiv Für Pathologisch Anatomie and Physiologie und Für Klinische Medizin* (editada por Rudolf Virchow en Berlín) un artículo titulado: “Desarrollo masivo de amibas en el intestino grueso”. Este artículo se encuentra basado en el primer caso clínico de amibiasis conocido y documentado y que Lesh estudió en 1873 (Romero-Cabello 2008). El paciente de 24 años llamado J. Markow provenía de un distrito llamado Arkangel cerca de Leningrado, lo cual hace aún más interesante el hallazgo de Lesh ya que en la actualidad, la infección causada por *E. histolytica* es considerada como “tropical” y resulta

transcendente haberla reportado por primera vez en una zona donde la temperatura oscila entre 3 y 7°C durante tres cuartas partes del año. Markow cursaba con disentería crónica, al ser examinadas las heces por Lesh, encontraron numerosas formaciones microscópicas que presentaban características similares de forma y movilidad a las de un trofozoíto de *E. histolytica*. En su descripción Lesh menciona detalles precisos de la anatomía microscópica de las amibas, entre los que destaca: el tamaño exacto y la formación de pseudópodos, la presencia de *nucleólos* refráctiles (refiriéndose al cariosoma central del núcleo, que fue redescubierto años más tarde) y las características perfectamente bien definidas de movimiento que actualmente precisan a una célula amibiana. Además, las heces del paciente contenían sangre y gran cantidad de moco asociado a la presencia de estas amibas. Desafortunadamente, el paciente murió en abril de 1874. La autopsia practicada reveló muerte por pleuritis, encontrándose además grandes ulceraciones intestinales con lesiones en la submucosa e infiltraciones celulares que contenían una gran cantidad de parásitos (Radvin 1988). Para poder discernir si la causa de la muerte del paciente efectivamente habían sido las amibas, Lesh tomó aproximadamente 2 onzas de materia fecal conteniendo los trofozoítos e inoculó a cuatro perros por vía oral y rectal. Este experimento resultó en la infección de un solo animal que desarrolló disentería con moco y sangre. Después del sacrificio 18 días posteriores a la inoculación, Lesh observó en la autopsia el colon hipéremico y edematoso con la presencia de varias ulceraciones que presentaban un gran número de trofozoítos (Romero-Cabello 2008). El aporte del estudio realizado con este paciente y el cumplimiento casi en su totalidad de los postulados de Koch atribuyen a Lesh, el descubrimiento del agente causal de la amibiasis conocido hasta ese momento como padecimiento de Markow (Radvin 1988). Años más tarde, en 1883, Koch detectó cinco casos de disentería en Egipto, de los cuales dos evolucionaron a absceso hepático amibiano con múltiples úlceras infestadas con amibas, tanto en las lesiones intestinales como en los abscesos hepáticos (Martínez-Palomo 1987). Los hallazgos encontrados por Koch estimularon a Kartilus para llevar a cabo una investigación más profunda y publicar así una serie de artículos

en 1886, 1887 y 1904, que componen parte primordial en la historia de esta infección. Kartilus reporta alrededor de 150 casos de disentería a partir de los cuales recupera una gran cantidad de trofozoítos con un porcentaje alto de abscesos hepáticos asociados, donde también (aunque en menor cantidad) encuentra amibas. Así mismo, un hallazgo sumamente importante en la patología causada por *E. histolytica*, fue el descubrimiento de alrededor de 11 casos de 384 con absceso hepático amibiano, que mostraron también complicaciones por abscesos cerebrales. Cabe resaltar que en dos de estos casos se detectó la presencia de trofozoítos, tanto en las lesiones hepáticas como en las cerebrales (Radvin 1988). Así mismo, Kartilus pudo demostrar el poder patógeno de los aislados obtenidos de estos pacientes.

En 1893, Quincke y Ros propusieron la existencia de diferentes especies de amibas localizadas en el tracto digestivo del humano y dilucidaron el ciclo biológico de *E. histolytica* a partir del descubrimiento del quiste, proponiendo su participación en la diseminación de la enfermedad y por tanto, como la forma causal de la infección (Martínez-Palomo 1989). Un hallazgo relacionado fue reportado por Huber en 1909, quien demostró que las amibas son capaces de diseminarse de un hospedero a través de quistes (Romero-Cabello 2008). Finalmente el nombre de *E. histolytica* se lo dió Schaudin en 1903, detallando los caracteres distintivos de las formas quísticas y precisando aún más, sus características estructurales, determinando así la diferenciación con la *E. coli* (Romero-Cabello 2008). Años posteriores Walter y Sellards en 1913, realizaron uno de los experimentos más importantes en el estudio de la amibiasis, aclarando la confusión que existía entre las diferentes especies de amibas. El objetivo del ensayo era demostrar la capacidad infectiva y patógena de ocho diferentes especies de amibas. Con la ayuda de algunos voluntarios filipinos recluidos en la prisión de Bilibid, demostraron que las amibas de vida libre (como la *E. coli*), no eran capaces de producir disentería o algún síntoma similar al producido por la infección con *E. histolytica* (Romero-Cabello 2008). El material biológico administrado oralmente incluía quistes y trofozoítos obtenidos de pacientes positivos a la infección. En el caso particular de *E.*

histolytica se infectaron veinte voluntarios, sin embargo, solo cuatro presentaron un cuadro disentérico, demostrando así que el mismo organismo puede ser patógeno y causar la enfermedad en algunos individuos y en otros no. Este hallazgo apoya la idea de que un individuo asintomático podría ser el responsable de la diseminación de la infección (Romero-Cabello 2008). Los resultados obtenidos en estos experimentos fueron interpretados como un indicador de que el parásito podría presentar virulencia variable. No obstante, en 1925 Emilie Brump sugirió una explicación alternativa de la existencia de dos especies distintas: una capaz de causar disentería y/o la enfermedad invasiva y otra incapaz de producir alguna patología en el humano. A esta segunda especie la denominó *Entamoeba dispar*. La hipótesis de Brump no fue reconocida por otros investigadores, sin embargo, a partir de la década de los 70's comenzaron a acumularse datos bioquímicos, inmunológicos, genéticos y moleculares que apoyaron esta idea, siendo retomada en 1993 por Diamond y Clark. Sin embargo, no fue sino hasta 1997 que un comité de expertos de la OMS aceptó esta hipótesis. Estos hallazgos impulsaron en la última década, el desarrollo de pruebas para la detección de antígenos de *E. histolytica* mediante el uso de anticuerpos monoclonales, dirigidos a las lectinas Gal/GalNAc o mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que ayudan a diferenciar entre las dos especies (Anaya-Velázquez 2008).

Actualmente existe un gran interés en el estudio de la amibiasis por su alto impacto en la salud pública. Muchos grupos de trabajo han centrado sus esfuerzos en la obtención de nuevos protocolos que permitan el avance en el estudio de este patógeno. Entre los más importantes, sobresalen los enfocados al estudio de la inmunología que, con el apoyo de la biología molecular, pudieran acercarnos más al desarrollo de una vacuna contra la amibiasis en humanos.

2. *Entamoeba histolytica*

E. histolytica es el parásito protozoario unicelular causante de la amibiasis en humanos. Se piensa que este protozoario es exclusivo del hombre, sin embargo, existen reportes de algunos

primates en cautiverio con evidencias de la infección. Por su alta capacidad citolítica y fagocítica, este parásito es capaz de colonizar y destruir prácticamente cualquier tejido del organismo hospedero, de donde deriva su nombre *E. histolytica* (Martínez-Palomo 1989).

2.1 Ubicación taxonómica

El género *Entamoeba* se caracteriza por la presencia de un núcleo vesicular, que posee un gránulo central conocido como cariosoma y un anillo granular continuo formado por un complejo de nucleoproteínas localizadas en la periferia de la membrana nuclear. Este agregado se conoce comúnmente como cromatina periférica. Algunas amibas que pertenecen a este género poseen un gran impacto en salud pública, por lo que son consideradas de importancia médica. Los organismos que son incluidos en este rubro son: *E. histolytica*, *Entamoeba gingivalis*, *E. coli*, *E. harmanni*, *E. dispar*, *Iodamoeba büstschlii* y *Endolimax nana*; algunas especies de vida libre de géneros como: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamithia* y *Sappina*; y finalmente *E. polecki*, que ocasionalmente infecta algunos animales y al hombre (Robert 2008). El compartir un nicho y algunos rasgos morfológicos son dos de las características que dificultan la identificación de algunas especies de amibas. Sin embargo, actualmente existen varias herramientas moleculares que permiten la tipificación de un organismo, resultando en la generación de diversos sistemas taxonómicos que han contribuido a la reubicación de algunas especies que guardan relaciones filogenéticas. En el caso de *E. histolytica*, las notables características del genoma, los fenotipos y la gran variabilidad intraespecífica entre parásitos, resulta en una complicada ubicación taxonómica. Una clasificación práctica incluye a los *Sarcodinos* como parte del reino *Protista*, donde se encuentra el *Phylum Sarcomastigophora* que agrupa a los protozoos que tienen locomoción flagelar, por pseudópodos o ambos. Así mismo, este *Phylum* se divide en dos *subphyla*: *Mastigophora* (flagelados) y *Sarcodina* (amibas). El *Phylum Sarcodina* (al cual pertenece *E. histolytica*) incluye organismos que se mueven por medio de profusiones citoplasmáticas

(seudópodos), presentan uno o varios núcleos durante los diferentes estadios de su ciclo vital y su división es por fisión binaria longitudinal (Robert 2008). No obstante, otra clasificación sería: *Phylum: Sarcomastigophora, Subphylum: Sarcodina, Clase: Lobosea, Familia: Endamoebidae, Género y especie: Entamoeba histolytica* (Tay-Zavala 2008).

Actualmente, según Cavalier-Smith (1998), una de las clasificaciones taxonómicas más aceptadas para *E. histolytica*, es la siguiente:

Reino Protozoa

Subreino Neozoa

Superclase Sarcomastigota

Phylum Ameoboza

Subphylum Conosa

Género *Entamoeba*

Especie *histolytica*

Como se mencionó anteriormente, todas las especies del género *Entamoeba*, poseen características distintivas en su estructura nuclear. Así mismo, análisis filogenéticos basados en secuencias de RNA ribosomal, revelan que el género posee un origen monofilético. Otros análisis, basados en las secuencias de algunos genes y de DNA ribosomal, muestran que este género divergió de organismos superiores que ya poseían estructuras típicas de una célula eucariota. Esto podría significar que muchas de las características inusuales del grupo, deben haberse presentado con una pérdida secundaria probablemente como una adaptación o en respuesta al parasitismo (Radvin 2000).

2.2 Morfología

En su ciclo de vida, *E. histolytica* puede adoptar dos formas morfológicas: el trofozoíto, forma vegetativa activa causante de la patología intestinal y/o extraintestinal, y el quiste, una forma de resistencia responsable de la propagación de la infección. (Fig. 1 y 2).

2.2.1 Trofozoíto

El trofozoíto es la forma vegetativa móvil que habita en las criptas del colon ascendente de intestino grueso del hospedero donde se alimenta de moco y contenido intestinal; no obstante, en algunas infecciones agudas se pueden encontrar en la materia fecal recién emitida. Miden de 10 a 60 μm y poseen forma elongada e irregular, sin embargo, en presencia de algún estrés pueden deformarse perdiendo su apariencia original. La actividad dinámica y el pleomorfismo de los trofozoítos se basan en su disposición citoplasmática que se divide en dos zonas: un ectoplasma externo transparente y un endoplasma interno vacuolado. Este endoplasma contiene una gran cantidad de inclusiones que lo hacen sumamente granuloso con aspecto de vidrio molido. La locomoción es por medio de movimientos enérgicos, basados en la emisión rápida de pseudópodos protáctiles y digitiformes compuestos principalmente de ectoplasma. El trofozoíto se divide por fisión binaria longitudinal tanto en el intestino, como en los tejidos del hospedero. Es amitocóndriado con un citoesqueleto estructurado y microtúbulos citoplasmáticos. En el endoplasma se puede observar un núcleo redondo y vesiculoso de 5 a 7 μm de diámetro con un endosoma central constituido por cromatina en forma de gránulo, llamado cariosoma. El núcleo posee una membrana muy delgada, asociada a cromatina periférica en forma de gránulos finos. Los gránulos están formados por varios complejos nucleoproteicos. El endoplasma consta también de algunos organelos organizados como un sistema de membranas equivalentes al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi, ribosomas y poliribosomas, y un sistema de lisosomas primarios y secundarios semejante al que se encuentra en otros eucariontes (Radvin 1988,

Martínez-Palomo 1989, Tay-Zavala 2008). En cepas virulentas se puede observar la presencia de eritrocitos en el endoplasma de algunos trofozoítos que son fagocitados cuando la amiba los encuentra a su alcance y representa una clara evidencia de la naturaleza invasora de estos parásitos (Fig. 1).

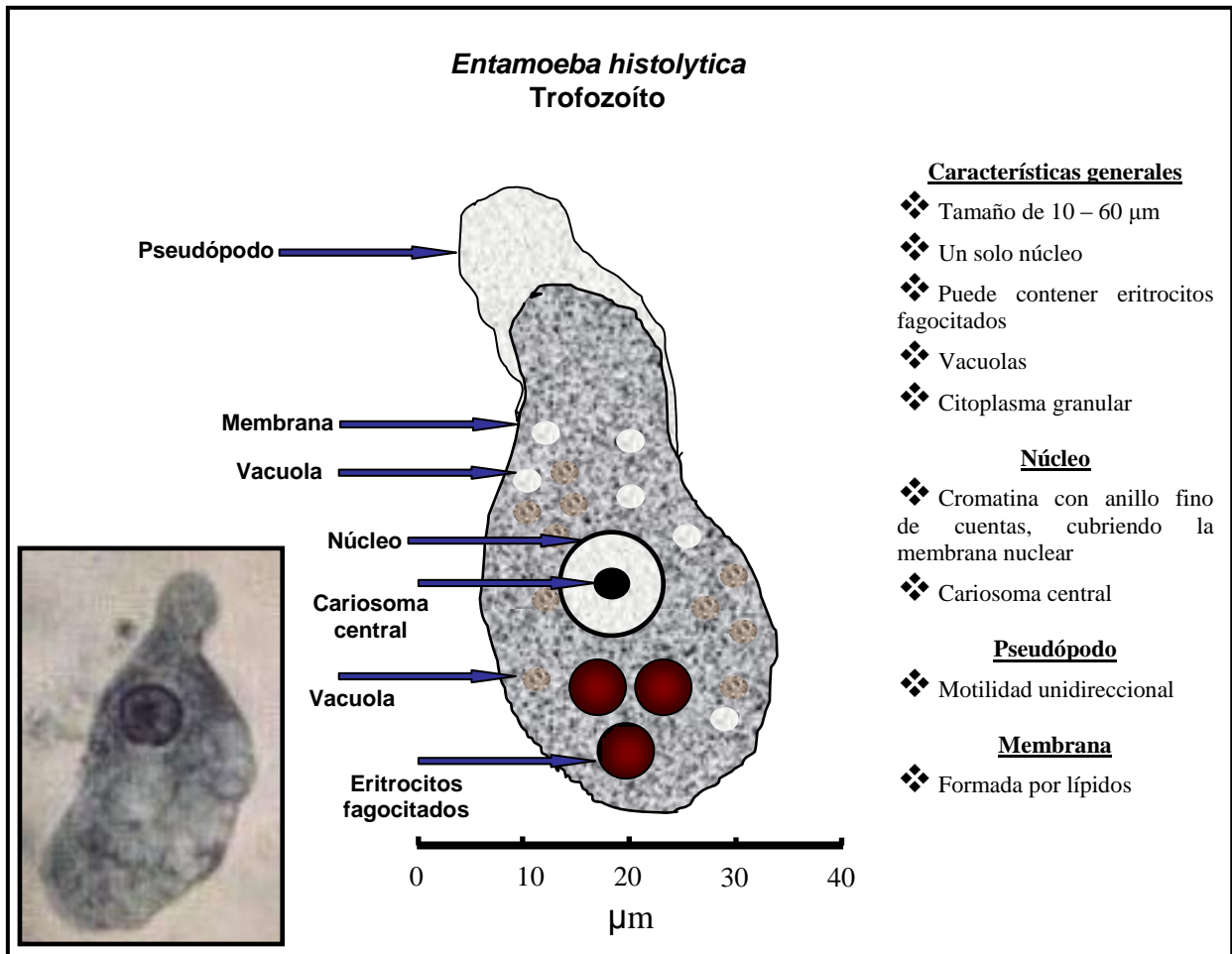


Fig. 1. Características morfológicas del trofozoíto de *Entamoeba histolytica*.

2.2.2 Quiste

El quiste es el estadio infeccioso y de diseminación responsable de la transmisión de la enfermedad de un hospedero a otro. Son estructuras unicelulares inmóviles, generalmente esféricas aunque a veces se presentan con forma ovoide, no replicativas, con un tamaño aproximado de 5 a

20 μm de diámetro y poseen una pared extracelular formada principalmente por quitina (Fig. 2). Esta cubierta protectora, le confiere una gran resistencia a condiciones adversas fuera del hospedero cuando el parásito es expulsado en las heces (Mc Connachie, 1955). El quiste es producto de una reproducción esquizogónica es decir, el resultado de una división múltiple del núcleo sin división citoplasmática. Dependiendo de su madurez, el quiste puede contener de uno a cuatro núcleos, pero sin duda, el quiste tetra nucleado es la forma infectante en la naturaleza. Sus núcleos son morfológicamente muy parecidos a los presentes en los trofozoítos, poseen un cariosma central y cromatina periférica formada por ribonucleoproteínas, no obstante, en el quiste maduro son más pequeños (Fig. 1). En los prequistes (quistes inmaduros) se pueden observar depósitos de glucógeno contenidos en vacuolas y los cuerpos cromatoides, que son estructuras alargadas con bordes romos formados a partir de agregados ribosomales (Fig. 1). Durante la maduración del quiste, el glucógeno se va consumiendo y desaparece paulatinamente, así mismo, los cuerpos cromatoides se hacen poco visibles o definitivamente imperceptibles. El quiste es capaz de sobrevivir en el suelo húmedo durante al menos una semana de 20 a 34°C y hasta cuarenta días si la temperatura es menor a 10°C. Son muy resistentes al ácido clorhídrico y a las concentraciones de cloro presentes en el agua purificada. Los quistes pueden morir por desecación, ebullición, calor, superclorinación o exposición al yodo (Radvin 1988, Tay-Zavala 2008).

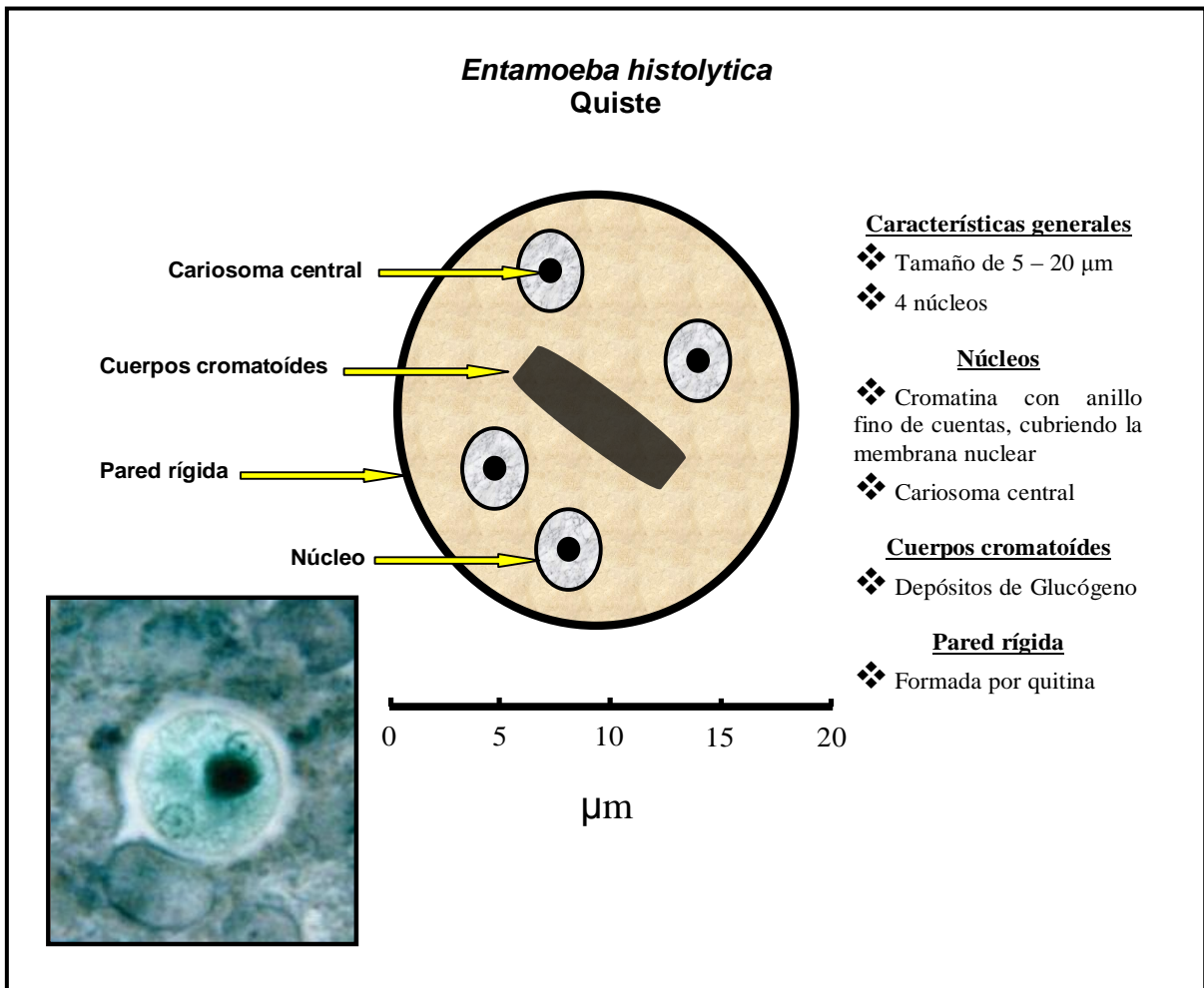


Fig. 2. Características morfológicas del quiste de *Entamoeba histolytica*.

2.3 Ciclo de vida

La forma de transmisión es oral- fecal. El ciclo comienza por la ingestión de quistes maduros provenientes de comida o agua contaminada con materia fecal (Fig. 3 [1]). Los quistes descienden por la parte alta del tubo digestivo y gracias a su pared rígida formada por quitina, son capaces de resistir los jugos gástricos y viajar a través del tracto intestinal hasta alcanzar la parte baja del intestino delgado donde ocurre el desenquistamiento (Fig. 3 [2-B]). Del quiste eclosiona un trofozoíto metacíclico tetranucleado que inmediatamente duplica sus núcleos hasta obtener ocho. Esta división resulta en la formación de ocho pequeñas amébulas metaquísticas (Eichinger 2001a). Cada amébulas migra al colon ascendente donde madura hasta formar un trofozoíto (Fig. 3 [3]). En el colon, los trofozoíto maduros se adhieren a la mucosa intestinal por medio de lectinas

expresadas en su superficie, allí se alimentan de bacterias y detritus celulares y se reproducen por fisión binaria (Fig. 3 [3-A]). En algunas ocasiones, los trofozoítos son capaces de penetrar la mucosa y el epitelio, causando lesiones de diferente magnitud que son la vía de diseminación a otros tejidos (principalmente el hígado) y que llevan a la forma extraintestinal de la infección (Fig. 3 [C]). Después de su multiplicación y conforme los trofozoítos viajan a través del tracto intestinal, el microambiente se vuelve más hostil. La materia fecal se vuelve más seca y existe un aumento en la tensión de oxígeno. Para protegerse y bajo el contacto de varios estímulos luminales incluyendo factores inmunes del hospedero y el propio metabolismo bacteriano, los trofozoítos se enquistan (Fig. 3 [4]). El ciclo se cierra cuando estos quistes alcanzan la madurez y son expulsados al medio ambiente en las heces y una vez fuera, pueden ser ingeridos por otro hospedero o bien causar una reinfección (Fig. 3) (Radvin 1988, Martínez-Palomo 1989, Eichinger 2001, Tay-Zavala 2008).

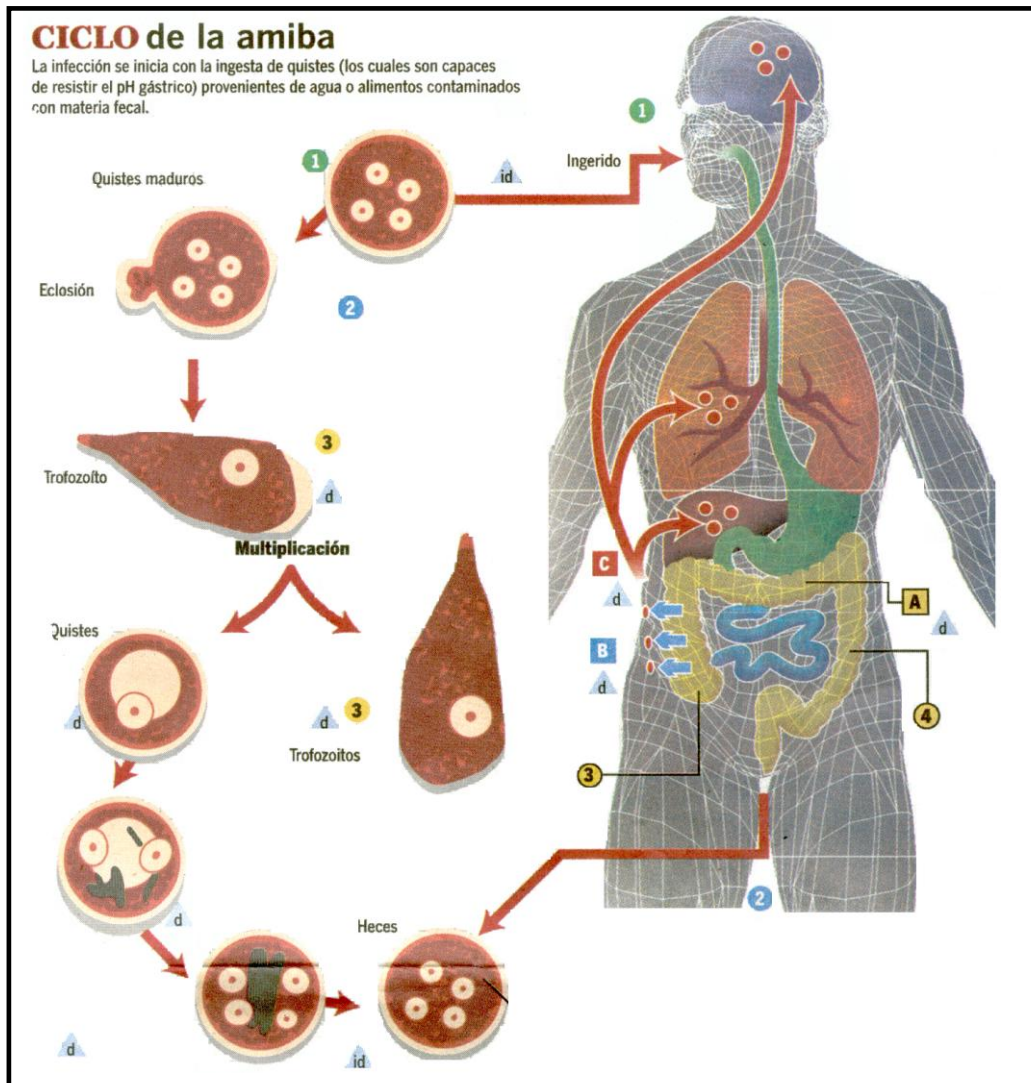


Fig. 3. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* (Carrero 2007).

3. Amibiasis

La amibiasis humana es definida como la infección invasiva del tracto intestinal o extraintestinal causada por *E. histolytica*. Este parásito entérico tiene la capacidad de invadir la mucosa intestinal y en algunos casos atravesar el epitelio hasta alcanzar los vasos sanguíneos y diseminarse a diversos órganos y tejidos. La amibiasis humana generalmente es sintomática, sin embargo, muchos de los pacientes pueden resolver la infección y pasarla desapercibida. Estos portadores asintomáticos son, en gran parte, los responsables de mantener la infección dentro de la población humana (Stanley 2003, Alcántara-Vázquez 2008).

La amibiasis sintomática puede clasificarse en amibiasis aguda y en amibiasis extraintestinal. La aguda puede ser de dos tipos: severa, también conocida como colitis amibiana fulminante y la amibiasis aguda no severa. Así mismo, existen otras formas clínicas de la infección, por ejemplo, la amibiasis crónica causada por la presencia de trofozoítos en el intestino que sólo causan un daño mínimo, no obstante, este cuadro es controversial ya que por definición, la existencia de la enfermedad está condicionada a la invasión y daño tisular por parte del parásito. No existe evidencia de lesiones en estos pacientes, sin embargo, se puede detectar la presencia de quistes en las heces por lo que en realidad se les considera portadores del parásito (Radvin 1988, Alcántara-Vázquez 2008).

La amibiasis extraintestinal primordialmente se localiza en el hígado donde causa el absceso hepático amibiano (AHA) y dependiendo de su ubicación y severidad, puede producir la muerte (ver abajo). Así mismo, existen otras formas diseminadas que se adquieren por contacto directo (amibiasis cutánea) presentando tres formas clínicas (úlceras fagedénicas, lesiones vegetativas y amébides); la amibiasis pulmonar que habitualmente se desarrolla como una complicación del AHA resulta en el contacto de los trofozoítos (abscesos) con el diafragma, perforándolo y causando una fístula hepatobronquial. Adicionalmente, la amibiasis pulmonar puede ser producto de la diseminación sanguínea a partir de úlceras colónicas. La amibiasis cardiaca evoluciona a partir de un AHA por la ruptura y diseminación del absceso a través del diafragma que al alcanzar el corazón provoca pericarditis. La amibiasis cerebral es un padecimiento poco reportado, sin embargo, los trofozoítos pueden invadir sistema nervioso central vía plexo venoso vertebral y en algunas ocasiones aunque menos frecuente, a través de los pulmones. Una vez que se alcanza el cerebro las lesiones pueden variar en tamaño y forma. Generalmente, las lesiones microscópicas presentan zonas reblandecidas con petequias y congestión, mientras que las lesiones de mayor tamaño, presentan zonas necróticas bien definidas y en algunas ocasiones asociadas a hemorragias (Martínez-Palomo, Radvin 1988 y 2000, Alcántara-Vázquez 2008).

3.1 Amibiasis intestinal

La amibiasis intestinal es causada por la invasión de los trofozoítos de *E. histolytica* en la mucosa colónica. Este padecimiento es causado por la micro-ulceración con bordes hiperémicos en áreas epiteliales ínter glandulares de baja resistencia mecánica. Los órganos que principalmente afecta son el ciego, el recto, el colon y ocasionalmente la parte final del íleon. El daño puede extenderse hasta la submucosa, donde las lesiones pueden aumentar y originar úlceras de mayor tamaño acompañadas con necrosis y en algunos casos con hemorragia causada por el daño de algunos vasos sanguíneos asociados (Alcántara-Vázquez 2008).

La amibiasis aguda disintérica, la colitis fulminante, la apendicitis amibiana y el ameboma, son los cuatro tipos de padecimientos intestinales causados por *E. histolytica*. En la amibiasis aguda disintérica, las manifestaciones clínicas se encuentran asociadas a la localización de las lesiones (regiones superiores del colon o en el recto sigmoides). Las ulceraciones superficiales están presentes sólo en algunas áreas del intestino grueso. Las evacuaciones muco-sanguinolentas acompañadas de tenesmo rectal y dolor tipo cólico son recurrentes de 3 a 5 veces al día. La colitis amibiana fulminante resulta en una ulceración confluyente y necrosis. Estas lesiones pueden ocupar gran parte del colon afectando todo el espesor de la pared. El intestino se dilata particularmente la porción transversal. La disentería se presenta con evacuaciones de sangre mezclada con materia fecal o incluso sólo sangre (más de veinte evacuaciones por día). Los pacientes presentan cuadros de anorexia, náuseas, desbalance electrolítico, tenesmo rectal constante, hipovolemia y fiebre (39-40°C). Los amebomas o granulomas amibianos son lesiones constituidas por necrosis, ulceración, edema, fibrosis e infiltrado inflamatorio agudo y crónico causado por una respuesta inmune exacerbada presente en la mucosa y submucosa. Pueden presentarse como lesiones múltiples y se localizan en el ciego, recto sigmoides, colon ascendente, o bien en los ángulos hepáticos y esplénico. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son la diarrea o disentería y dolor abdominal. La apendicitis amibiana cursa con dolor y rigidez en el cuadrante inferior derecho del

abdomen, hay presencia de fiebre, taquicardia y náuseas. Cuando ésta se presenta en el ciego puede causar diarreas sanguinolentas que en algunas ocasiones pueden confundirse con apendicitis bacterianas (Alcántara-Vázquez 2008).

3.2 Absceso hepático amibiano

Como se mencionó anteriormente, el AHA es la manifestación más común de la amibiasis extraintestinal. Este padecimiento es producto de la diseminación vía vena porta, de los trofozoítos desde el intestino al hígado. Los trofozoítos en el torrente sanguíneo son resistentes a la acción lítica del complemento, un marcador común de virulencia de muchos patógenos que causan infecciones diseminadas (Reed 2000). Una vez en el parénquima hepático, el absceso inicia con un infiltrado de neutrófilos que son lisados por los trofozoítos, lo que provoca un aumento marcado en la lisis de los hepatocitos. Una vez que disminuye el infiltrado, aumenta la cantidad de macrófagos y de células epitelioides que también son lisadas por los trofozoítos, acrecentando la necrosis de los hepatocitos (Alcántara-Vázquez 2008). Los abscesos generalmente se sitúan en el lóbulo derecho del hígado del 70 al 100% de los casos. Microscópicamente se presentan como una cavidad de varios centímetros que contiene líquido, circunscrita por una gran cantidad de hepatocitos muertos, por tejido conjuntivo, células de la respuesta inmune inflamatoria y por supuesto de trofozoítos (Alcántara-Vázquez 2008). El paciente cursa con malestar general, hepatomegalia, anorexia, anemia, astenia y fiebre (39 a 40°C). Finalmente, el AHA puede complicarse y evolucionar en la ruptura del pericardio, mediastino, pleura, pulmón o peritoneo, o bien fistulación de la piel (SMP, Cap 5 2008). El absceso es mas común en hombres (75-100%) y en aproximadamente 33-72% de los casos, ocurren entre los 21 y los 40 años (Radvin 1988). Las pruebas de funcionamiento hepático muestran un leve incremento en las transaminasas, y la fosfatasa alcalina se encuentra elevada en más de dos tercios de los casos. A nivel sistémico se

presentan alteraciones en el metabolismo de la bilirrubina (excreción) (Radvin 1988). Este tipo de complicaciones pueden resultar fatales si no son tratadas a tiempo.

3.3 Epidemiología

Las enfermedades diarreicas representan una de las principales causas de morbi-mortalidad infantil en muchos de los países en vías de desarrollo. Actualmente, sabemos que gran parte de estas diarreas, son causadas por diversos agentes infecciosos. Por su alta prevalencia, las parasitosis intestinales representan un problema de salud pública; a pesar de esto, no reciben atención prioritaria dentro de los programas de salud. La amibiasis ha sido y continúa siendo un grave problema de salud pública a nivel mundial. Geográficamente las tasas de prevalencia más altas, pertenecen a las zonas tropicales y subtropicales (Fig. 4) donde las comunidades pobres y con mal saneamiento son las que presentan mayor incidencia. Según Walsh, la amibiasis es la tercera enfermedad parasitaria más importante del mundo, produciendo cerca de 100 mil muertes anuales; sólo la malaria y la esquistosomiasis superan este nivel de mortalidad mundial (Walsh 1986). Hasta 1997 la OMS consideraba a la amibiasis como la segunda causa de mortalidad producida por parásitos protozoarios sólo por debajo de la Malaria (OMS 1997). Se estima que cerca del 10% de la población mundial podría estar infectada por este parásito pero sólo el 1% desarrolla enfermedad (Walsh 1986). En cerca del 10 al 15% de los casos, la amiba invade la mucosa del intestino grueso causando diarrea y disentería. De este último grupo, aproximadamente el 10% presenta amibiasis invasiva, resultando de 40 000 a 100 000 muertes anuales (Eichinger 2001a). En México, debido a los escasos estudios epidemiológicos, no se conocen con precisión las frecuencias de la enfermedad amibiana. Sin embargo, la última encuesta nacional seroepidemiológica, reportó 8.42% de seropositividad en la población de nuestro país, lo que demuestra un alto índice de infección invasiva por este parásito (Caballero-Salcedo 1994). La tasa de morbilidad de la amibiasis intestinal en México durante el periodo comprendido entre 1995 y

2000, muestra entre 1000 y 5000 casos por cada 100 000 habitantes (Ximenéz 2000). Durante 1995-2000, el absceso hepático amibiano indicador de la transmisión de cepas invasoras, presentó una incidencia de 39 casos por cada 100 000 individuos (Dirección General de Vigilancia Epidemiológica, 1995-2000). La incidencia de la amibiasis en México, se presenta en la Fig. 5.

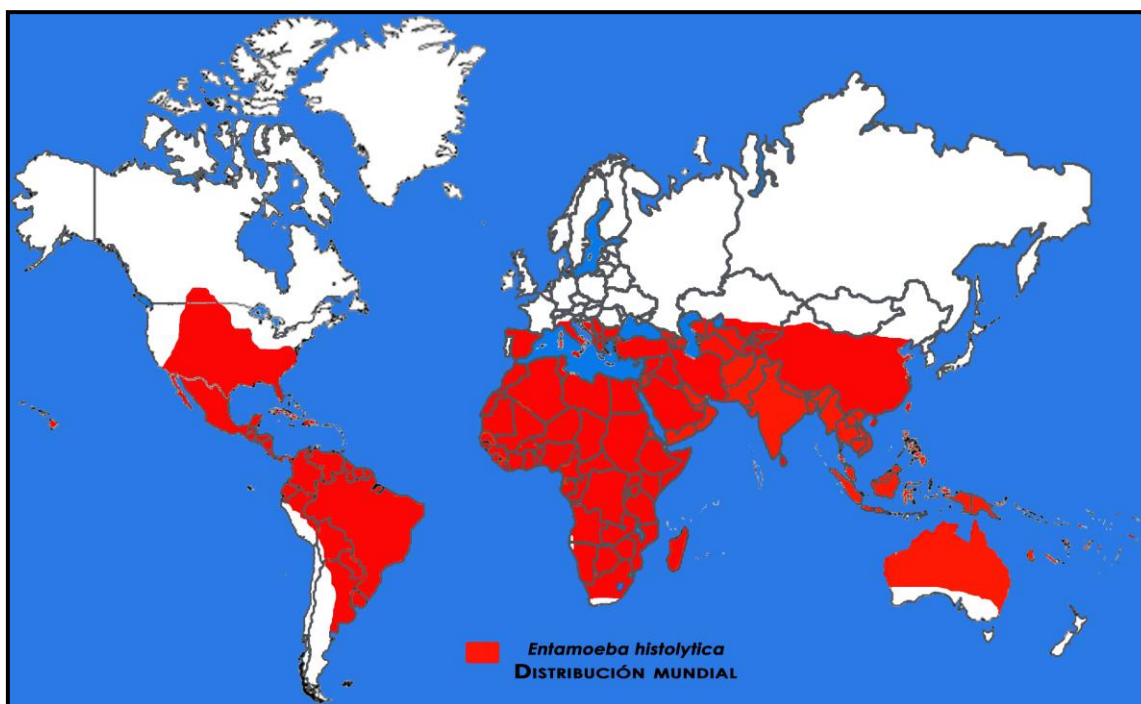


Fig. 4. Distribución mundial de la amibiasis (Eichinger 2001).

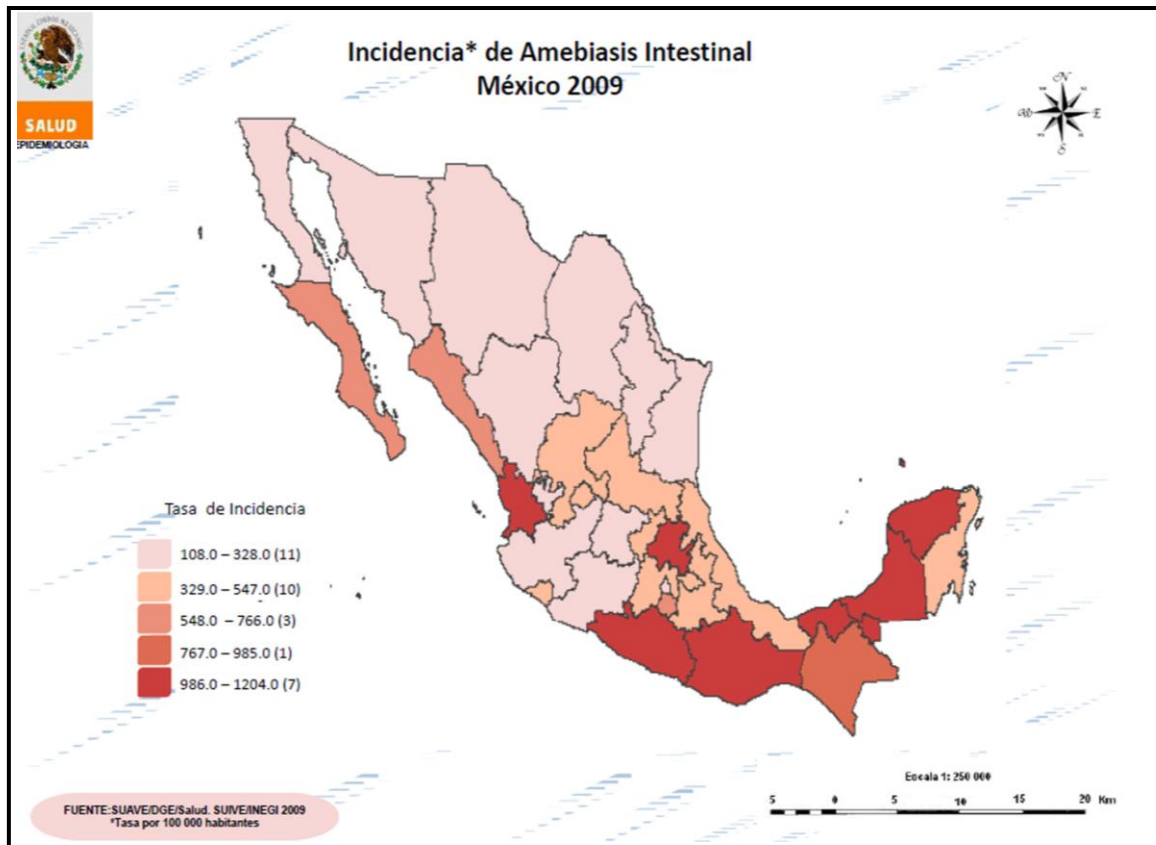


Fig. 5. Incidencia de amebiasis intestinal en México (CENAVECE, 2009 <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>).

3.4 Patogenia

La gran capacidad de *E. histolytica* para invadir y destruir prácticamente cualquier tejido así como su habilidad de persistir en el tracto digestivo, dependen en gran parte de la expresión de factores patogénicos y de su capacidad de evadir la respuesta inmune. En general, la patogénesis está determinada por varios factores relacionadas con la capacidad de destrucción de la matriz extracelular (actividad proteolítica), la citólisis celular dependiente de contacto, la fagocitosis, la adherencia y el desarrollo de la resistencia a lisis por el complemento (Ramakrishnan, *et. al.* 2000). Dentro de los mecanismos propios de *E. histolytica*, algunas moléculas juegan un papel primordial en la infección. Las lectinas (moléculas capaces de reconocer carbohidratos en la superficie de las células epiteliales), participan activamente en la adhesión y probablemente estén involucradas en la citólisis y en algunos mecanismos citotóxicos. La lectina de *E. histolytica* más

ampliamente estudiada es la lectina con afinidad por galactosa/N-acetil D-galactosamina (lectina Gal/GalNAc) que tiene un peso molecular de 260 kDa. Esta proteína es un heterodímero que consta de una subunidad pesada de 170 kDa y una ligera de 31 a 35 kDa. Ambas subunidades se unen covalentemente a una subunidad intermedia de aproximadamente 150 kDa. Una de las principales funciones de esta molécula es la del contacto y adherencia. Sumado a la lectina Gal/GalNAc, dos moléculas tipo adhesinas han sido también implicadas en la adhesión: la proteína de superficie celular de 220 kDa y la adhesina de 112 kDa que además posee actividad de proteasa de cisteína (Ramakrishnan, *et. al.* 2000). Ensayos *in vitro* muestran que estas moléculas también participan en la eritrofagocitosis uniéndose en la superficie de los glóbulos rojos, proveyendo así una fuente rica de hierro. Otra función descrita para esta lectina es la de citotoxicidad. Esto se comprobó mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a un epítipo de la subunidad pesada, que lograron inhibir la citotoxicidad del trofozoíto pero no su adherencia. Otras de las moléculas involucradas en patogenicidad son los ameboporos, péptidos no enzimáticos de aproximadamente 18 kDa cuya función es la de producir canales iónicos en la membrana de las células blanco. Otra proteína de 77 aa tipo ameboporo, es capaz de inducir la salida de Na^+ , K^+ y en menor grado Ca^+ en la célula blanco, sin embargo, no se ha comprobado su participación en la lisis celular (Said-Fernández 1990). *E. histolytica* además contiene numerosas enzimas proteolíticas incluyendo catepsina B, fosfolipasa A y numerosas proteinasas implicadas en la ruptura de la matriz extracelular degradando colágena, elastina, fibrinógeno y laminina. Algunas proteinasas de cisteína están involucradas en la evasión a la respuesta inmune, ya que son capaces de hidrolizar a C3, IgG's e IgA's y las anafilotoxinas como la C3a y C5a (Said-Fernández 1990, Ramakrishnan, *et. al.* 2000).

La fagocitosis en *E. histolytica* es un proceso biológico caracterizado por la ingestión de células muertas, fragmentos celulares, partículas inertes e inclusive células vivas. Es altamente ordenada e involucra la unión del parásito a la célula, molécula y/o partícula blanco preparándola

para su ingestión. En este proceso además intervienen un gran número de adhesinas y de enzimas digestivas (Rodríguez, *et al.* 1989), el citoesqueleto juega un papel preponderante ya que la unión de la superficie celular de los trofozoítos a los ligandos específicos activa diversas señales que llevan a la polimerización de la actina. No obstante, también el tráfico vesicular es esencial ya que controla la maduración del fagosoma (Okada, *et al.* 2005) que posteriormente se fusionará con los compartimentos endocíticos para formar el fagolisosoma (Stuart y Ezekowitz 2005). Este proceso es dirigido por GTPasas y proteínas Rab que modulan la fusión vesicular con la membrana de la célula blanco. En *E. histolytica*, Rab5 y Rab7 participan en la formación de un compartimento llamado vacuola prefagosomal. Además Rab5 está implicada en la vía de señalización de la endocitosis y transporte de enzimas hidrolíticas al interior del fagosoma. En cambio, Rab7 participa en el transporte de hidrolasas hacia el fagosoma, localizándose en vesículas que sufren fusión heteróloga con los lisosomas (Saito-Nakano, *et al.* 2004; Nakada-Tsukui, *et al.* 2005). Se piensa que los niveles de virulencia de la amiba están íntimamente relacionados con las actividades intracelulares, con el tráfico de membranas entre los lisosomas y fagosomas y con las actividades secretoras de las proteasas de cisteína. Además debe de existir un mecanismo regulador que module la secreción y el tráfico de las proteasas al espacio extracelular, favoreciendo al trofozoíto mediante un incremento en su capacidad de digestión.

3.5 Estudios moleculares

Los estudios moleculares han ayudado a dilucidar gran parte de la biología de *E. histolytica*. Actualmente sabemos que el ADN de este parásito es rico en A+T y que el total de G+C es aproximadamente del 25%. La organización genómica es diferente a la encontrada comúnmente en eucariotas superiores. Los genes se encuentran relativamente cercanos con distancias intergénicas de no más de 1.5 kb. Los ARNm poseen regiones 5' y 3' no traducibles con extremos muy cortos de 5-21 pb y de 14-61 pb, respectivamente. No obstante, existe evidencia de que algunos genes poseen regiones no traducibles 5' y 3' con terminaciones largas, lo que sugiere la presencia de

“capping” en por lo menos algunos de los ARNm. Estudios recientes han demostrado que sólo tres genes de *E. histolytica* contienen intrones con secuencias muy cortas, lo cual indica que el “splicing” es muy raro en este parásito. La subunidad de la ARN polimerasa II de *E. histolytica* posee una estructura diferente a la comúnmente encontrada en los eucariontes superiores, ya que la transcripción de genes que codifican para proteínas es resistente al tratamiento por α -amanitina, péptido no ribosomal cíclico que impide la traslocación del ARN y ADN impidiendo la síntesis de la cadena de ARN (Radvin 2000). En contraste con las células de los metazoarios, los genes ribosomales contenidos en el ADN se agrupan en plásmidos circulares de aproximadamente 24.5 kb con transcripción episomal (Bhattacharya y Huber 1989, Sehgal 1994). Estos episomas han sido adoptados como modelo de estudio en la replicación del organismo. Gran parte de la capacidad invasiva y de la virulencia de *E. histolytica* es ejercida por los cambios en el nivel de expresión de sus genes. En ensayos *in vitro* se ha observado que mucha de la variabilidad en la expresión de los ARNm específicos se presenta como respuesta a diferentes cambios en las condiciones de crecimiento. Por ejemplo, la expresión del gen de la superóxido dismutasa es inducida por la presencia de radicales de aniones superóxido (Bruchhaus y Tannich 1994); la expresión del gen EhADH2 que codifica para la alcohol aldehído deshidrogenasa, es inducida por etanol (Flores 1996)); la expresión de actina es autoregulada en respuesta a diferentes estímulos en el medio (Manning-Cela 1997). Así mismo, la adquisición de resistencia a la emetina se ha relacionado con el incremento en la expresión del ARNm de la Eh-glicoproteína P (Descoteaux 1995). La obtención de trofozoítos viables a partir de transfecciones transitorias y estables ha permitido el avance en la caracterización y análisis molecular de la expresión del genoma de *E. histolytica*. Actualmente sabemos que muchos de los procesos de regulación transcripcional están relacionados con la arquitectura de la secuencia promotora de los genes. Diferentes elementos que controlan su expresión han sido encontrados en estas secuencias (Bruchhaus 1993 y 1994, Purdy 1996). Uno de los genes de *E. histolytica* mas ampliamente estudiado es el de la lectina (*hgl5*), en el cual se ha

observado que 1.0 kb del extremo 5' que flanquea al gen, es capaz de controlar la transcripción episomal de un reportero (Purdy 1994). Análisis mutacionales de la estructura del promotor del *hgl5* muestran que 272 pb río arriba del inicio de la transcripción existe la presencia de cinco elementos regulatorios (URE). Asimismo, se demostró la presencia de algunos elementos dentro del promotor "core" que controlan la transcripción (Caja TATA, Elemento Inr y elemento GAAC) (51). URE1 y URE2 muestran secuencias altamente homologas a elementos activadores en eucariontes superiores; PEA3 presenta homología con ambos elementos URE; conjuntamente URE2 también presenta homología con AP-1 (Purdy 1996). El elemento URE4 se encuentra flanqueado por un factor nuclear río arriba del último gen *hgl* (Schaenman 1998), mientras que URE3 es el único elemento de control transcripcional negativo, presente en los genes *hgl* (Gilchrist 1995). URE3 también está presente en otros genes relacionados con la regulación sensible al crecimiento y en extractos nucleares de *E. histolytica*. La comparación de las regiones 5' que flanquean 37 genes de *E. histolytica* indican la presencia de tres motivos conservados dentro del promotor core (Gilchrist 1995). La primer secuencia (GTATTTAAAG/C) situada a -31 pb del inicio de la transcripción, se encuentra presente en extractos nucleares de *E. histolytica*, posee un elemento tipo caja TATA (TBP) similar al presente en algunos eucariontes superiores (Bruchhaus 1993, Singh 1998). La segunda (AAAAATTCA) se encuentra traslapada con el inicio de la transcripción (*Inr*) y su función al parecer es la de regular el sitio exacto de transcripción, sin embargo, interactúa poco con las otras dos secuencias (Singh 1998); y la tercera (GAAC), presenta localizaciones variables dentro del promotor *core*, siendo importante para el eficiente y correcto inicio de la transcripción (Singh 1998) (Fig. 6). La presencia de los elementos *Inr*, cajas TATA y de un nuevo elemento (GAAC), conforman una estructura del promotor *core* desmesuradamente inusual. Este arreglo sugiere que la regulación basal transcripcional de *E. histolytica* difiere de la presente en otros eucariontes. Esto correlaciona con hallazgos moleculares donde se demuestra que

los promotores de virus de mamíferos no funcionan en *E. histolytica* y que los promotores de *E. histolytica* no funcionan en células de mamíferos.

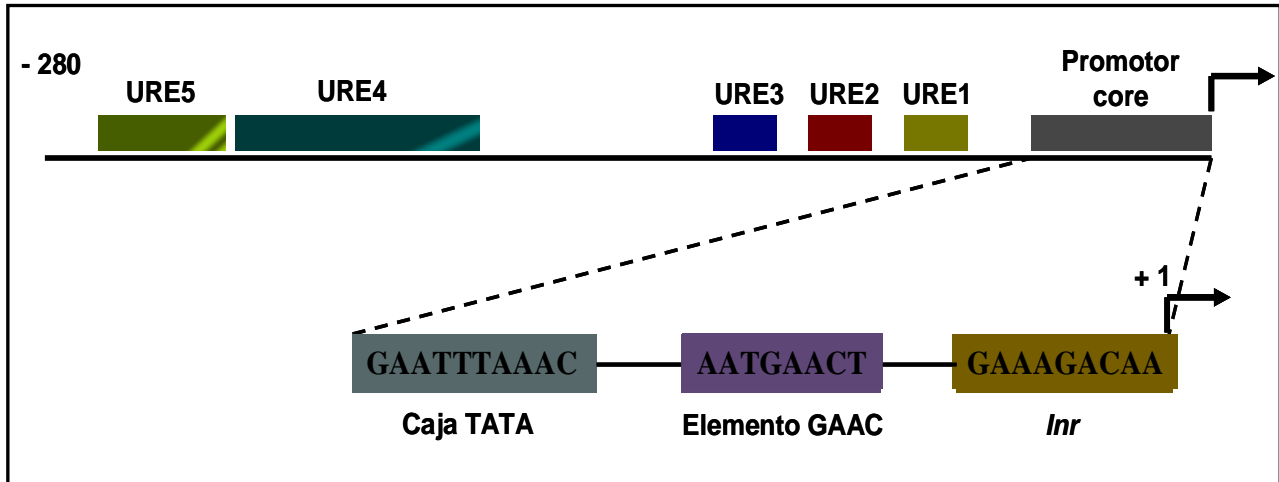


Fig. 6. Elementos de regulación transcripcional en el promotor del gen *hgl5* de *E. histolytica* (Ramakrishan y Petri 2000). Análisis mutacionales muestran que aproximadamente 272 pb río arriba del inicio del gen existe la presencia de cinco elementos regulatorios llamados URE 1, 2, 3, 4 y 5, involucrados en el control transcripcional de *hgl5*.

4. El proceso de enquistamiento

El enquistamiento es el proceso por el cual muchos organismos forman estructuras latentes altamente resistentes a condiciones adversas y que preceden la liberación del estadio vegetativo y reproductivo dentro de su hospedero. En los parásitos intestinales *Entamoeba* y *Giardia*, la formación de estas estructuras se lleva a cabo en el tracto digestivo donde el microambiente presente estimula la conversión del trofozoíto a la forma quística (Aguilar 2011). Durante este proceso existen muchos cambios morfológicos altamente coordinados con el ciclo celular y el decremento en el metabolismo (Lauwaet 2007). Estos cambios incluyen la biosíntesis de una pared rígida que es esencial para la formación y supervivencia del quiste. A pesar de los avances que se tienen en el estudio del enquistamiento de muchos parásitos humanos, la mayoría de estos reportes se basan en *G. duodenalis* que recientemente se ha tomado como modelo para el estudio de este

proceso debido a la facilidad con la que puede ser inducido a enquistarse *in vitro*. Muchos de los datos obtenidos por diferentes grupos cuyo objeto de estudio son otros parásitos protozoarios (*E. histolytica*, *E. invadens* y *Acanthamoeba castellanii*), sugieren que el enquistamiento en estos organismos se realiza de manera muy similar donde básicamente se pueden distinguir dos fases altamente sincronizadas: una temprana y otra tardía. Durante la fase temprana el trofozoíto pleomórfico y móvil rápidamente adquiere una forma redonda, pierde su movilidad y la capacidad de adherirse alguna superficie como resultado del rearrreglo del citoesqueleto (Svärd 2003). Los cambios morfológicos se encuentran altamente coordinados con el metabolismo, con cambios en la expresión y silenciamiento de diversos genes, con la expresión y transporte de proteínas y con varias divisiones nucleares. El resultado es la formación de una estructura tetranucleada producto de dos rondas de replicación cromosómica sin división celular (Bernarder 2001). En *Giardia*, durante la fase tardía del enquistamiento, ocurre una replicación nuclear completa y por recombinación homóloga se obtienen quistes maduros tetranucleados con una haploidía 16N (cuatro núcleos 4N) (Bernarder 2001, Poxleitner 2008). Uno de los cambios más evidentes durante esta fase es el inicio de la síntesis de los componentes de la pared del quiste y su transporte al exterior de la membrana plasmática por exocitosis (Reiner 1990, Chávez-Munguía 2003 y 2005). El transporte de estos componentes se realiza por medio de vesículas específicas del enquistamiento (ESV's) y muchos estudios con *Giardia*, sugieren que estas vesículas pueden ser tipo-*trans*-Golgi, ya que son producidas y transportadas desde las cisternas del retículo endoplásmico hasta el exterior. Sin embargo estas ESV's, contienen cotámeros (Giβ'COP), BiP1, YIP1 (GiYip1) y ARF (factor de ribosilación dependiente de ADP) marcadores típicos del Aparato de Golgi, lo que sugiere la presencia de un nueva vía donde el retículo endoplásmico y el Aparato de Golgi podrían estar funcionalmente co-localizados (Lanfredi-Rangel 2003, Lujan 1995, Marti 2003). De hecho en *Giardia*, el transporte de proteínas de la pared del quiste como la CWP1 hacia la superficie puede ser inhibida por la Brefeldina A, un metabolito que bloquea el intercambio

guanidina-nucleótido de ARF produciendo un desensamble del Aparato de Golgi por la unión de ARF-cotámero (Lujan 1995). En *E. invadens*, seis horas después del inicio del proceso de enquistamiento, se pueden observar muchas vesículas pinocíticas, protuberancias redondas y estructuras tipo cordón que se dirigen hacia la superficie de los trofozoítos (Carranza-Rosales 2000). Por otra parte en *Giardia* durante la fase temprana, la captación de glucosa y de oxígeno disminuye gradualmente hasta ser prácticamente indetectable al comienzo de la fase tardía (Paget 1998). Al mismo tiempo, los precursores de *N*-acetilgalactosamina son co-polimerizados e incorporados a la pared del quiste formando una red intrínseca de fibras. Aproximadamente 5 h post-inducción algunas proteínas de la pared como la CWP1 se co-localizan dentro de las ESV's y después de 9 a 10 h, los monómeros de *N*-acetilgalactosamina comienzan a visualizarse dentro de las ESV's tardías (Argüello-García 2002) (Fig. 7).

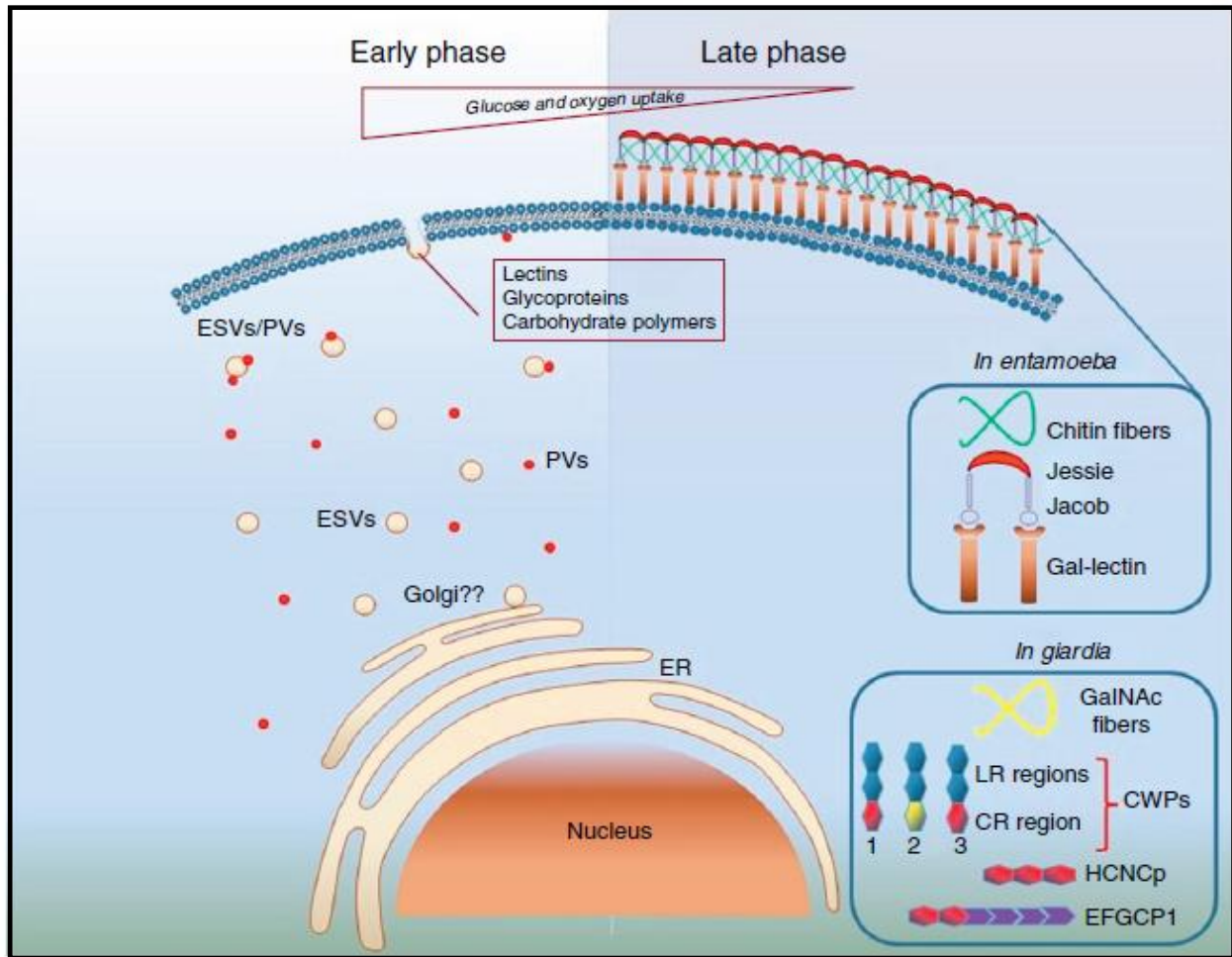


Fig. 7. Proceso de enquistamiento en los parásitos *Giardia* y *Entamoeba*. Durante la fase temprana se forman vesículas específicas del enquistamiento (ESV's) provenientes del aparato de Golgi y Retículo Endoplásmico (ER). Las ESV's transportan los componentes de la pared del quiste hacia la superficie. Existe la presencia de abundantes vesículas pinocíticas (PV's) y disminución en la concentración de glucosa. Durante la fase tardía se realiza el ensamble de los componentes sobre la membrana plasmática de la célula enquistándose. Los componentes de la pared del quiste de *Entamoeba* sp. y *Giardia* sp. se resumen en los cuadros. Abreviaciones: CWPs, proteínas de pared del quiste en *Giardia*; GalNAc, N-acetilgalactosamina; LR, regiones ricas en leucinas; CR, regiones ricas en cisteínas. (Aguilar-Díaz 2011).

5. Estructura de la pared del quiste

En el caso de *Entamoeba* y *Giardia*, la envoltura de la pared del quiste posee una estructura similar a una matriz filamentosa compuesta por polisacáridos (Chávez-Munguía 2007). En algunos parásitos protozoarios estos polímeros forman microfibras que cubren la cara exterior de la membrana citoplasmática. Esta envoltura confiere resistencia a condiciones adversas a las que se enfrenta la célula fuera del hospedero, o bien, durante el paso del quiste a través del tracto digestivo del hospedero hasta llegar al sitio blanco del desenquistamiento. Generalmente esta pared es una envoltura de 120 a 150 nm de grosor compuesta por una red de polisacáridos asociados a diversas proteínas con propiedades de lectinas (Chávez-Munguía 2007).

La pared del quiste mejor caracterizada es la del parásito de reptiles *E. invadens*, ya que (al igual de *Giardia*) puede enquistarse fácilmente *in vitro*. En este parásito y en otras amibas, la pared del quiste esta compuesta por una red fibrilar asociada a la membrana plasmática (Chávez-Munguía 2007) donde el mayor componente es la quitina, un homopolímero de *N*-acetil D-glucosamina de uniones β -(1,4), similar al descrito en las paredes celulares de hongos, insectos y de algunos nemátodos (Arroyo-Begovich 1980, Das 1991, Coppi 1999). Estructuralmente existen proteínas asociadas a estos polímeros con dominios de unión a quitina ricos en cisteínas, como las proteínas de Jacob (6-Cys) y Jessie (8-Cys). Esto sugiere que, durante el ensamble de la pared, estas proteínas son responsables del entrecruzamiento de los polímeros sobre la superficie de los trofozoítos apoyando la idea del modelo de “caña y teja” previamente reportado (Frisardi 2000, Van-Dellen 2002, Chatterjee 2009). Adicionalmente se han descrito glicoproteínas de entre 100 y 150 kDa reconocidas por anticuerpos monoclonales anti-quiste que poseen sitios de unión a la aglutinina del germen de trigo (AGT) y que aún permanecen sin caracterizarse (Chayen 1985). En contraste, la composición de la pared del quiste en *E. histolytica* ha sido poco estudiada. La falta de un método reproducible de enquistamiento *in vitro* ha impedido el avance en el conocimiento de la estructura del quiste de este parásito; sin embargo, se sabe que además de la quitina, la pared del

quiste de *E. histolytica* contiene ácido neuramínico y algunas proteínas que aún permanecen sin caracterizarse (Campos-Góngora 2004).

En la amiba de vida libre *A. castellanii*, la pared del quiste consiste en una doble envoltura llamada ecto y endoquiste formadas por D-glucopiranososa y por celulosa respectivamente (Tomlinson 1962, Blanton 1978). Los sitios de contacto entre las envolturas se conocen como ostiolos (poros), por los cuales algunas veces es posible observar algunos opérculos cuya función es la eclosión del trofozoíto durante el desenquistamiento (Hirukawa 1998, Dudley 2009). El ectoquiste sintetizado durante las etapas tempranas del enquistamiento despliega muchas capas de no más de 50 Å de diámetro, con forma amorfa y discontinua; no obstante, en el quiste maduro su espesor incrementa aproximadamente 0.3 a 0.5 µm (Dudley 2009). En contraste, durante las fases iniciales del enquistamiento, el endoquiste no está claramente diferenciado de la membrana plasmática; sin embargo, cuando el quiste alcanza la madurez la separación entre la membrana y la pared interna se hace evidente (Dudley 2009). Como ya se mencionó en *A. castellanii*, una tercera parte del ectoquiste (en peso seco) está formado por celulosa, incluyendo a la hidroxiprolina que es un componente común de las fibras de colágeno. No obstante, la pared del ectoquiste parece ser una amalgama de diferentes proteínas y polisacáridos donde el mayor componente es una proteína no caracterizada de 70 kDa (Neff 1962 y 1969). Estudios recientes también revelan la presencia de una proteína de 21 kDa rica en residuos de ac. Glutámico que se localiza en las paredes del endo y ectoquiste, y de otra rica en arginina (CSP21) cuya expresión se asocia a etapas tempranas del enquistamiento similar a lo que ocurre en *Giardia* con las CWP's (Hirukawa 1998). La composición de la pared del quiste en *A. castellanii* presenta alrededor de 35% de carbohidratos, 33% de proteínas, 4 a 6% de lípidos y 20% de material que aún no ha sido identificado, sin embargo, esta constitución puede variar de un aislado a otro (Neff 1962 y 1969). La matriz de la pared del quiste en el protozoario entérico *G. duodenali*, presenta una organización estructural similar a la de *Acanthamoeba* compuesta por una doble capa interna membranosa y una capa

externa protofilamentosa de 0.3 a 0.5 μm de ancho formada por filamentos de 7 a 15 nm de diámetro. Esta cubierta externa se compone por un homopolímero de uniones β -(1,3) de N-acetil galactosamina (GalNAc) que equivale a un 63% del peso total (Manning 1992, Jarroll 2001, Gerwig 2002, Argüello-García 2009). El otro 37%, corresponde a tres tipos de polímeros estructurales (CWP 1, 2 y 3) que poseen repeticiones ricas en leucinas y regiones ricas en cisteínas en el carboxilo terminal. Además, estos polímeros poseen la capacidad de agruparse formando agregados (Luján y Mowatt 1995, Sun 2003). Adicionalmente en estos agregados se observa la presencia de otros péptidos similares a las VPS's, pero que no presentan variabilidad (HCNCp) (Davids 2006) y una proteína de superficie tipo EGF (factor de crecimiento epidérmico) llamada (EGFCP1) (Chiu 2010). Las repeticiones ricas en leucinas de las proteínas CWP1 y CWP2 son capaces de unirse a las fibras de GalNAc deprotonizadas de manera similar como las proteínas Jacob se unen a la quitina en *Entamoeba sp.* actuando como un nuevo tipo de lectinas (Chatterjee 2010). Las repeticiones ricas en cisteínas presentes en las CWP's también favorecen la formación de puentes disulfuro entre heterodímeros considerando que la extensión básica del carboxilo terminal de la CWP2 (TCWP2) podría actuar como guía de la CWP. Estos heterodímeros cuando se acumulan en regiones especializadas del retículo endoplásmico (tipo *trans*-Golgi) promueven la biogénesis de las ESV's (Luján 1995 y 2003, Sun 2003, Gotting 2006). El procesamiento proteolítico de TCWP2 por una proteinasa de cisteína dentro de las ESV's en etapa de maduración, está asociado a una extensa condensación selectiva de las ESV's de carga y con una secuencial secreción de los componentes de la pared del quiste por exocitosis (fase temprana, Fig. 7). Esto ocurre de tal manera que las proteínas CWP1 y CWP2 se agregan primero seguidas de la CWP3 y probablemente HCNCp (Konrad 2010). Al parecer además de estas proteínas estructurales, algunas proteinasas de cisteína son necesarias durante el enquistamiento de *Giardia*, en contraste con el proceso de desenquistamiento donde las proteinasas son aportadas por el hospedero, como ejemplo tenemos a la tripsina y la quimotripsina que al parecer son las más relevantes (Ward 1997, Touz

2002). La ruta metabólica de la pared del quiste en *Entamoeba sp* y *Giardia sp.* al parecer son exactamente idénticas, excepto que la de *Giardia* posee un paso más donde la UDP-GlcNAc 4' epimerasa sintetiza los polímeros de N-acetil galactosamina (Fig. 8).

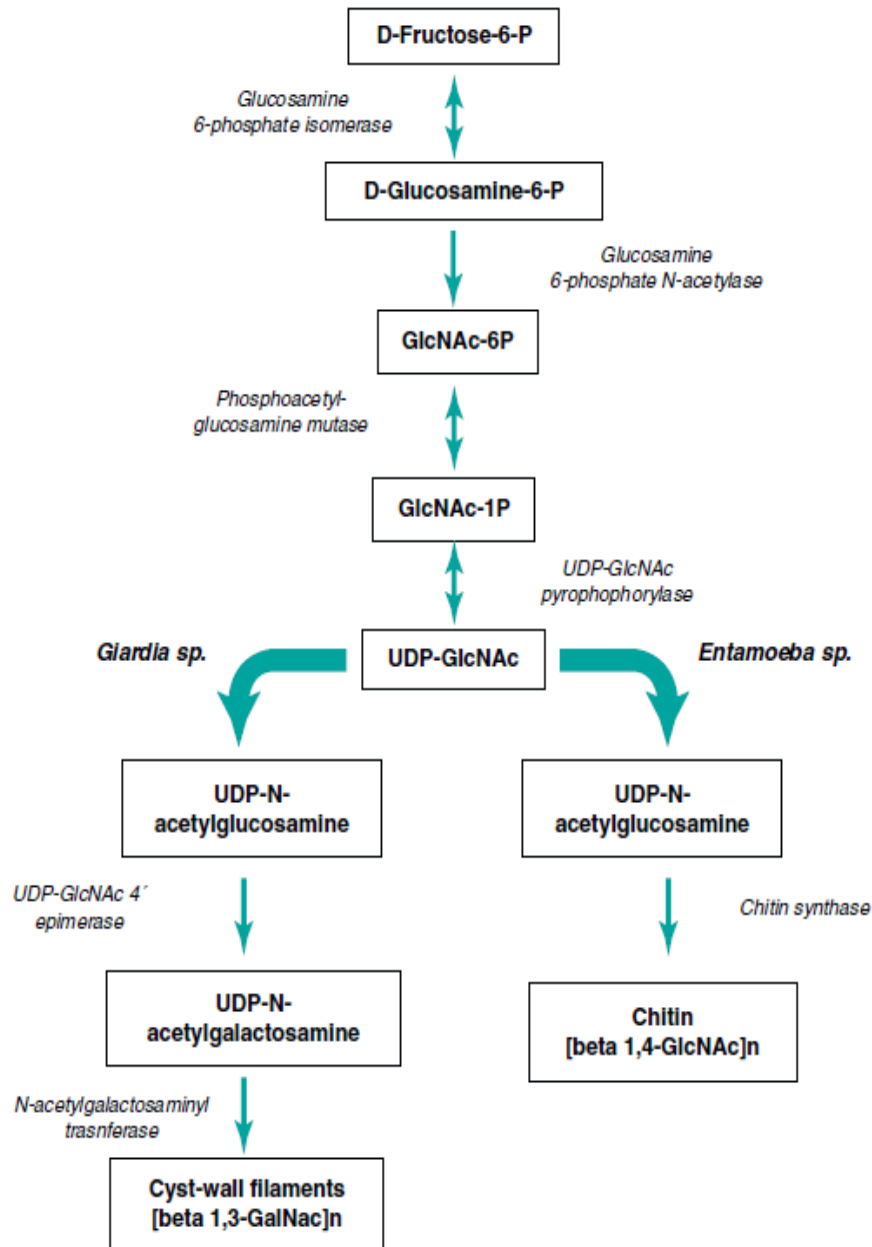


Fig. 8. Ruta metabólica de la formación de los polímeros que conforman la pared del quiste en *Giardia* y *Entamoeba sp.* La vía es similar para ambos parásitos, hasta la formación de N-acetilglucosamina (GlcNAc). En el caso de *Entamoeba sp.*, las moléculas de GlcNAc, son polimerizadas por la quitina sintasa y en el caso de *Giardia sp.*, son convertidas en UDP-N-Acetilgalactosamina (GalNAc), para posteriormente ser polimerizadas por la N-acetilgalactosaminil

transferasa en los filamentos que conforman la pared del quiste. Todas la enzimas involucradas en la reacciones se presentan en letras itálicas (Aguilar-Díaz 2011).

6. Rutas metabólicas y de señalización de los componentes de la pared del quiste

La formación de la pared del quiste es un proceso complejo que involucra múltiples reacciones enzimáticas acopladas. En *G. duodenalis* la síntesis de los glicopolímeros de GalNAc consta básicamente de dos procesos. El primero se lleva a cabo en el citoplasma celular e involucra cinco reacciones enzimáticas altamente reguladas que culminan con la obtención de UDP-GalNAc, precursor de los polímeros de GalNAc. La primer enzima en esta vía y por tanto “start limiting” es la Glucosamina 6-fosfato isomerasa (Gln6Pi) que posee actividad de aminosasa/deaminasa. En *Giardia* se han reportado dos isoformas (A y B), las cuales muestran sobre-expresión durante el proceso de enquistamiento (Steimle 1997, López 2002). La cascada enzimática continúa con la actividad secuencial de cuatro enzimas más, donde la UDP-GlcNAc pirofosforilasa (enzima limitante) es regulada alostéricamente por la glucosamina-6-fosfato (Fig. 8.) (Jarrol 2001, Sener 2004). El segundo proceso en la biosíntesis de los polisacáridos dentro de las ESV's que consta de la síntesis (ensamble) de la pared del quiste (Fig. 8 y 9) (Karr 2004). Se piensa que en la biosíntesis de los polímeros de la pared que ocurre en *E. histolytica*, también la Gln6Pi es la enzima que inicia la cascada de reacciones (Loftus 2005). Sin embargo en *Entamoeba*, la biosíntesis es completada con la polimerización y formación de la quitina por la acción de la β -glycosil-transferasa. Esta enzima pertenece a la familia de las sintasas de quitina que son responsables de la activación y transferencia de residuos de azúcares hasta un aceptor, incluyendo la formación de las cadenas de polímeros (Fig. 8) (Campos-Góngora 2004, Merz 1999). En *Entamoeba sp* y *Giardia sp*, la naturaleza del estímulo blanco del enquistamiento, el inicio de la expresión de los polipéptidos y las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis de los polisacáridos, tiene muchas variaciones, sin embargo, en ambos casos este proceso está

relacionado con múltiples condiciones de estrés. La transducción de estos estímulos, puede llevar a una expresión diferencial de genes que están involucrados en distintos mecanismos (Fig. 9).

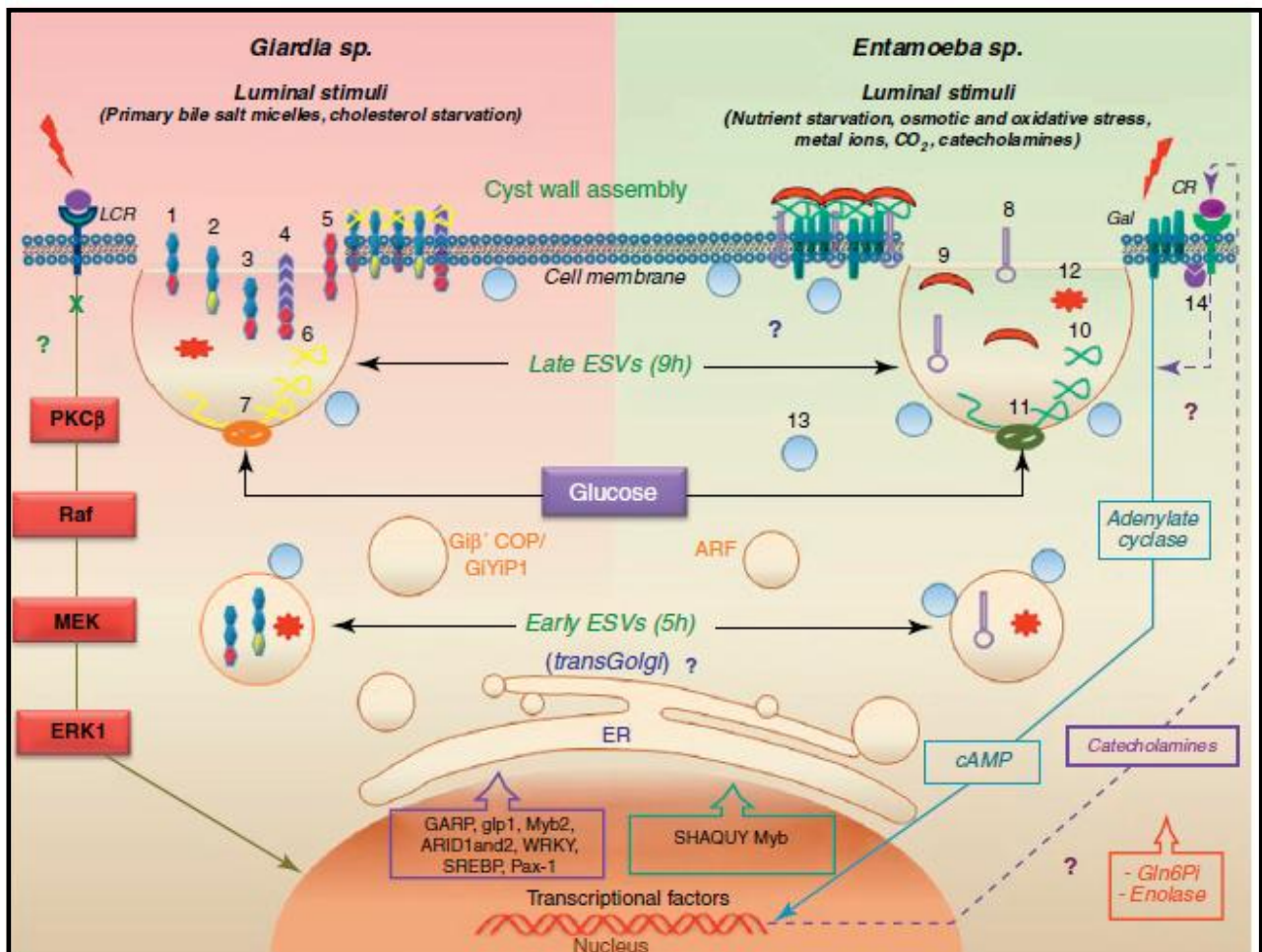


Fig. 9. Señalización y modificaciones celulares, asociadas al la fase temprana del enquistamiento en *Giardia* (panel izquierdo) y *Entamoeba* (panel derecho). 1, 2 y 3: CWP 1, 2 y 3 respectivamente; 4: Proteína HCNC; 5: Proteína EFGC-1; HCNC; 6: Fibras N-acetil-galactosamina; 7: β -1,3 Gal-Nac-transferasa; 8: Proteína Jacob; 9: Proteína Jessie; 10: Fibras de quitina; 11: quitina sintasa; 12: Proteasas; 13: Vesículas pinocíticas; 14: fosfatidil-inositol 3-cinasa.

En el modelo de *Giardia*, se ha hipotetizado que el mitógeno que activa la vía señalización (PKC/Raf/MEK/ERK) es activado en respuesta a la privación del colesterol extracelular y/o en presencia de micelas de sales biliares primarias. Las micelas estarían interactuando e inactivando el receptor de colesterol-LDL (RCL) estimulando la activación transcripcional de marcadores de fase temprana tales como: CWP1-3 y la Gln6PiB (Fig. 9) (Kaul 2001, Ellis 2003, Bazán-Tejeda

2007, Argüello-García 2009). Así mismo, se induce la expresión de enzimas, lectinas y otras proteínas involucradas en otros procesos de transducción de señales, como la cinasa de fosfatidilinositol-3 encargada de la fosforilación de fosfolípidos de inositol, los cuales se unen específicamente algunas proteínas involucradas en el enquistamiento (Luján 1997). Así mismo, la transducción de señales para la activación de genes es probable que sea dependiente de una proteólisis catalizada por una dipeptil-peptidasa tipo IV membranal, sin embargo, el mecanismo exacto de cómo se realiza aún no se conoce con exactitud (Touz 2002).

En el caso de *Entamoeba*, las vías de transducción de señales para la activación de los genes específicos del enquistamiento, permanece sin esclarecerse. Actualmente se propone una vía de señalización derivada de una lectina tipo Gal/GalNAc y de un receptor adrenérgico $\beta 1$ de catecolaminas, asociado al enquistamiento en *E. invadens*. Este parásito expresa en la superficie una lectina similar a la de *E. histolytica*, la cual aparentemente es limitada por galactosa. Se sabe que la lectina Gal/GalNAc posee un dominio transmembranal con funciones de señalización, debido a la presencia de secuencias tipo integrinas encontradas en su dominio citoplasmático (Vines 1998), sin embargo, las moléculas que se activan río abajo en la cascada de señalización aún no se han dilucidado. No obstante, algunos estudios realizados con el receptor de catecolaminas usando agonistas y antagonistas, concomitante con un tratamiento de ligando Gal, sugiere la participación de la adenilato ciclasa y el AMP cíclico mediando la señalización (Eichinger 2001a). Estos resultados sugieren una interacción entre ambos receptores, con la lectinas Gal/GalNAc induciendo la síntesis autocrina de catecolaminas que a su vez van actuar con su receptor induciendo una vía de señalización río debajo de la lectina Gal/GalNAc y río arriba de la adenilato ciclasa (Fig. 9) (Eichinger 2001a).

7. Regulación transcripcional durante el proceso de enquistamiento

A pesar de la gran cantidad de estudios acerca de la regulación transcripcional durante el enquistamiento basados en análisis del transcriptoma y abundancia relativa de los transcritos (Morf 2010, Birkeland 2010), muchas de las rutas metabólicas involucradas en el control transcripcional y en la señalización permanecen sin esclarecerse. En el modelo de enquistamiento de *Giardia*, se sabe que durante la fase inductiva los niveles de ARNm de las *CWPI-3* y de la *Gln6Pi-B* son altamente expresados (Lauwaet 2007). La naturaleza de este mecanismo es multifactorial, no obstante, estudios recientes han reportado la presencia de seis factores transcripcionales que se sobre-expresan durante la fase inductiva del enquistamiento. Estos factores poseen la habilidad de interactuar con regiones en el genoma ricas en A-T's, contenidas dentro de los promotores de los genes *CWPI-3* y de la *Gln6Pi-B*. Los factores incluyen miembros de la familia *myb* (Myb2), GARP (GLP1/2), homólogos de ARID1 y WRKY, y elementos tipo Pax (Pax1) (Lauwaet 2007, Pan 2009, Wang 2010). Así mismo, en *Giardia* existe la presencia de factores relacionados con el censo de colesterol celular, como los homólogos de proteínas de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP) (Kaul 2001, Worgall 2004). Estudios estructurales y funcionales durante la fase inductiva, han demostrado que estas proteínas sufren un procesamiento proteolítico mediado por proteínas asociadas al aparato de Golgi (Argüello-García 2001). En contraste durante el enquistamiento de *Entamoeba sp*, solo se ha identificado el factor transcripcional que pertenece a la familia de los elementos *Myb* (SHAQUY). Este elemento interactúa con regiones ricas en motivos CCCCCC, ubicados en regiones de algunos promotores de genes específicos del enquistamiento (Ehrenkauf 2009). Los genes que muestran sobre-expresión durante el enquistamiento, incluyen quitina sintetas, quitinasas y algunas proteínas putativas como la Fe-hidrogenasa y algunas cinasas.

8. Enquistamiento de parásitos protozoarios

En algunos parásitos resulta relativamente sencilla la inducción del enquistamiento. El uso de diferentes tratamientos que incluyen condiciones parecidas al microambiente generado en el hospedero, han sido factores que pueden activar este proceso. No obstante, en los trofozoítos de algunos parásitos intestinales como *E. histolytica*, *Toxoplasma sp.* y *Cryptosporidium sp.* no ha sido posible inducir su transformación a estructuras quísticas bajo ningún estímulo (Lauwaet 2007). En el caso de *E. histolytica*, muchos de los experimentos de inducción de enquistamiento realizados han resultado en la formación de estructuras con escasas características a las de un quiste. Sin embargo, en estudios recientes, el uso de estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno mas algunas trazas de dicaciones metálicos, han permitido la obtención de estructuras con características similares a las de un quiste maduro, como la presencia de quitina, multinucleación (2 a 4 núcleos) y resistencia al tratamiento con diversos detergentes (Aguilar-Díaz 2010). No obstante, el nivel de madurez de estas estructuras no ha sido determinado debido a la falta de un modelo animal donde se pueda reproducir la infección de manera natural. En otro ensayo, el co-cultivo de *E. histolytica* con dos especies de enterobacterias (*Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*) en combinación con una alta tensión de CO₂ e histamina, resulta en la obtención de estructuras binucleadas (Barrón-González 2008). Así mismo, el uso de dicaciones metálicos como Mg⁺², Mn⁺² y Co⁺² pueden inducir la formación de estructuras uninucleadas que además expresan quitina sintasa (Campos-Góngora 2000, Said-Fernández 2001) (Tabla 1).

Por el contrario, otros parásitos protozoarios como *E. invadens*, *A. castellanii* y *G. duodenalis*, son fácilmente inducidos a enquistarse *in vitro*, sirviendo como modelo para dilucidar los estímulos involucrados en la activación de este proceso celular. El método mas comúnmente utilizado para inducir el enquistamiento en *E. invades* es mediante la depleción de la fuente de carbono (deprivación de glucosa), el choque hiperosmótico y/o la combinación de ambos (Bailey 1980, Vázquez 1984, Avron 1986). En estos experimentos se ha encontrado que el desarrollo del

quiste requiere de la presencia de moléculas multivalentes con terminales de residuos de galactosa (en consecuencia, lectinas que unen a galactosa) (Coppi 1999), así como catecolaminas, epinefrina y norepinefrina (Coppi 2002). En la amiba de vida libre *A. castellanni*, la depleción de nutrientes (Byers 1980), la depleción de la fuente de carbono más un choque hiperosmolar (Demoraes 2008) o la adición de $MgCl_2$ al medio de cultivo (Schuster 2002), son estímulos suficientes para inducir su enquistamiento. En el caso de *G. duodenalis*, el enquistamiento *in vitro*, se ha logrado inducir mediante numerosos tratamientos, los más comúnmente utilizados incluyen la variación en la concentración de sales biliares en el medio de cultivo; la deprivación de la fuente de nutrientes y de colesterol; el cultivo en presencia de glicocolato más ácido pentadecanoico ó ácido mirístico; el glicocolato sódico más ácido mirístico y ácido oleico; la bilis porcina más ácido láctico y sal de hemicalcio (Luján 1997, Svärd 2003, Lauwaet 2007) (Tabla 1). Adicionalmente, estos ensayos se optimizan, mediante el uso de una pequeña variación en el rango del pH de 7.2 a 7.8 (Luján 1997).

Tabla 1. Estímulos utilizados para inducir el enquistamiento en *Giardia sp.* y *Entamoeba sp.*

Parasite	Encystment stimuli	Cyst-related features
<i>Entamoeba histolytica</i>	a) Hydrogen peroxide plus metal dications	Multinucleated (2 to 4 nuclei), detergent lysis resistance, chitin synthesis, GlN6PI over-expression
	c) Enterobacteria, high CO ₂ tension and histamine	Detergent lysis resistance, chitin synthesis, wrinkled wall, multinucleated (2 to 3 nuclei), ribonucleoproteic helices
	b) Mg ⁺² , Mn ⁺² , Co ⁺²	Detergent lysis resistance, chitin synthase expression, GlcNAc high content
<i>Entamoeba invadens</i>	a) Glucose deprivation	Cyst wall, multinucleation, water and detergent lysis resistance
	b) Osmotic shock	Cyst wall, multinucleation, water and detergent lysis resistance
	c) Glucose deprivation plus osmotic shock	Cyst wall, multinucleation, water and detergent lysis resistance
	d) Galactose residues	Self-aggregation, detergent lysis resistance, chitinase 1 and gen 122 expression
	e) Catecholamines epinephrine and norepinephrine	Not indicated
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	a) Nutrient depletion	Double walled, water lysis resistance
	b) Nutrient depletion and hypo-osmolar saline (effect increased with bacteria)	Double walled, water lysis resistance, reduction in number and size of digestive vacuoles
	c) Addition of MgCl ₂	Double walled, water lysis resistance
<i>Giardia lamblia</i>	a) Nutrients and cholesterol deprivation	ESVs formation, CWPs expression, hypotonic lysis resistance
	b) Human, porcine or bovine bile salts	Hypotonic lysis resistance, multinucleated, infective
	c) Glycocholate plus either pentadecanoic acid or myristic acid	ESVs formation, recognition of a cyst wall epitope with GCSA-1 antibody, water lysis resistance
	d) Sodium glycocholate plus myristic acid and oleic acid	Cyst wall, axostyle, water lysis resistance
	e) Porcine bile plus lactic acid hemicalcium salt	Cyst wall, axostyle, water lysis resistance

9. Inhibición del enquistamiento

La mayor parte de los compuestos utilizados para inhibir el enquistamiento han sido probados *in vitro* en medios de cultivo. En algunos ensayos, se ha observado que la citocalacina D, inhibidor específico de los microfilamentos celulares, bloquea el enquistamiento y crecimiento de trofozoítos de *E. invadens* en cultivos axénicos. Esto es una evidencia que demuestra la participación activa de los microfilamentos de actina en el proceso de enquistamiento (Makioka 2000). Así mismo, se ha observado que los derivados de la Lactacistina (β -lactona) inhibidor específico del proteosoma, al unirse covalentemente a los grupos hidroxilo y/o a los sitios activos de la treonina de las subunidades beta, es un potente inhibidor del enquistamiento de *E. invadens* (Makioka 2002). La wortmanina metabolito furanoesteroide producido por algunos hongos, debido a la potente acción inhibitoria que tiene sobre la PI 3-cinasa (enzima involucrada en el proceso de enquistamiento), es capaz de inhibir el enquistamiento de *E. invadens* (Makioka et al 2001). Muchos investigadores proponen que la pérdida de la capacidad de enquistamiento se debe al mantenimiento prolongado de los parásitos en medio de cultivo. En el caso de *A. castellani*, el cultivo de trofozoítos de manera sincronizada durante largos periodos de tiempo provoca que las células pierdan gradualmente la capacidad de formar estructuras de resistencia (Köshler 2008).

10. Desenquistamiento

Durante su paso por el tracto digestivo del hospedero, los quistes están expuestos a un microambiente que posee altas concentraciones de H^+ en el estómago (pH 3.0), la presencia de una gran cantidad de enzimas involucradas en los procesos digestivos como las lipasas y proteasas, y además, la liberación de diversas secreciones como bicarbonato y sales biliares que ayudan a la absorción de lípidos provenientes de la dieta diaria del hospedero (Eichinger 2001). En *G. lamblia*, dos estímulos son capaces de inducir el desenquistamiento, la exposición a bajas concentraciones de pH y la presencia de proteasas. Ambos estímulos inducen cambios ultraestructurales en los niveles de RNAm y en la expresión de las proteínas (Eichinger 1997). En modelos de

experimentación *in vitro* utilizando quistes de *Giardia*, el uso de soluciones acidificantes que simulen el pH del tracto digestivo en medios de cultivo puede inducir el desenquistamiento (Bingam y Meyer 1979). En el caso de *E. histolytica*, los estímulos involucrados en el proceso de desenquistamiento aún permanecen sin esclarecerse. A pesar de esto, se ha encontrado que quistes provenientes de muestras fecales pueden desenquistarse colocando algún ácido (Eichinger 1997). Por otra parte, *Naegleria gruberi* ameba fagotrófica de vida libre considerada como un parásito oportunista, posee la capacidad de iniciar un proceso de desenquistamiento al aumentar de manera gradual la concentración de CO₂ en el medio de cultivo (Averner 1966).

11. Estrés oxidativo

El trofozoíto de *E. histolytica* es una forma anaerobia facultativa, capaz de resistir ciertas concentraciones de O₂ en el medio. Estudios recientes han demostrado que los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de soportar hasta 5% de oxígeno en fase gaseosa, detoxificando los productos de la reducción del oxígeno en el medio (Band and Cirrito 1979). El colon del hospedero humano, principal órgano blanco de los trofozoítos, es una región con una baja concentración de O₂. No obstante, algunos reportes describen la presencia de altas concentraciones de componentes oxidantes en el lumen, generados por diversos procesos digestivos, la actividad metabólica de la microbiota, y en particular por el infiltrado de células del sistema inmune, especialmente macrófagos y neutrófilos (Nathan 1987, Jourdeuil 1997, Halliwell 2001). Así mismo dentro del microambiente generado en el lumen, existen evidencias de la presencia de ciertas concentraciones de H₂O₂, producido por bacterias que habitan en el colon del humano; incluso algunos autores proponen que el LPS de algunos microorganismos es capaz de inducir la producción de este compuesto. Entre los múltiples factores luminales involucrados en el proceso de enquistamiento, la exposición de los trofozoítos a diversas especies reactivas de oxígeno no ha sido estudiada. Actualmente sabemos que los trofozoítos son liberados en el intestino, colonizan la mucosa e

inducen un proceso inflamatorio, exponiéndose a una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno. Conforme los trofozoítos migran a través del colon ascendente al colon descendente (lugar donde se enquistan), las bacterias anaerobias que se encuentran poblando las paredes intestinales, producen una mayor cantidad de precursores de especies reactivas de oxígeno (como el H_2O_2), proveyendo un microambiente de mayor estrés (Mirelman 1988, Eichinger, 2001a y 2001b). En este sentido, se ha sugerido que junto con otros, el estrés oxidativo es un estímulo presente en la transición de trofozoíto a quiste en *G. lamblia* (Luján 1997). Otros reportes han demostrado que el peróxido de hidrógeno en particular, es capaz de inducir diferenciación celular en hongos y algunas células osteoblásticas (Belozerskaia 2006, Szymczyk 2006, Menon 2007). Asimismo durante la invasión tisular, la amiba se enfrenta a un aumento en la tensión de O_2 que puede ser controlado gracias a que *E. histolytica* posee un sistema oxidativo independiente formado por microcuerpos que contienen oxidasa y catalasa. Cuando los trofozoítos se encuentran en presencia de altas densidades de O_2 la oxidasa lo cataliza y produce H_2O_2 (Chen 1997). La catalasa es capaz de transformar el H_2O_2 en O_2 intracelular, que es uno de los más importantes aceptores de electrones. El O_2 al aceptar un electrón y reducirse al radical anión superóxido (O_2^-), se vuelve extremadamente tóxico (Chen 1997). Por su parte, la enzima superóxido dismutasa puede catalizar al O_2^- y producir H_2O_2 . En *Entamoeba histolytica*, la peroxidasa y la catalasa pueden catalizar la reacción que forma O_2 y H_2O a partir de H_2O_2 (Chen 1997). Dentro de la biología de *E. histolytica*, el estrés oxidativo juega un papel de suma importancia en la supervivencia del trofozoíto, pero probablemente también esté relacionado con las vías de señalización involucradas en la diferenciación celular.

12. Glucosamina 6-fosfato isomerasa

La ruta metabólica de la formación de la pared del quiste involucra la síntesis quitina. Esta vía está integrada por varios procesos enzimáticos. El primer paso concomitante en esta vía está

mediado por una enzima conocida como Glucosamina 6-fosfato isomerasa (Gln6Pi) (EC 5.3.1.19). Esta proteína posee otros nombres comunes como: Glucosamina 6-fosfato sintasa, Glucosamina 6-fosfato deaminasa (EC 5.3.1.10); sin embargo, el nombre sistémico actual es el de L-glutamina: D-fructosa-6-fosfato (EC 2.6.1.16) (Sławomir 2006). Existen reportes que señalan a la Gln6Pi como la enzima limitante en este proceso. Esta enzima cataliza una reacción que prácticamente se puede dividir en dos pasos: (a) la transferencia de amonio desde un grupo amino (L-glutamina) a la fructosa 6-fosfato y (b) una isomerización que resulta de la Frucosamina 6-fosfato a Glucosamina 6-fosfato (Sławomir 2006). La Gln6Pi exhibe completa especificidad por la L-glutamina como donador del grupo amino. Esta característica según algunos autores, es crucial en la distinción entre la Gln6Pi isomerasa o deaminasa y la Gln6Pi sintasa (Sławomir 2006). En sistemas de degradación de amino azúcares como en el caso de las bacterias, la Gln6Pi posee generalmente funciones metabólicas (Natarajan 1993) donde la síntesis de nucleótidos (amino-azúcares) resulta en la formación de la pared de péptidoglicanos (Vicent 2005). Además posee un activador alostérico (N-acetil-glucosmina-6-fosfato) que le permite actuar en ambas direcciones de la reacción (isomerasa-deaminasa) (Calcagno 1984). Esta es una propiedad inusual, ya que esta reacción generalmente no se presenta en algunas células eucarióticas como *Candida albicans* (Calcagno 1984). En bacterias, los genes que codifican para la Gln6Pi son conocidos como *glmS* y en eucariontes son denominados como *GFAI* y/o *GFAT* (Sławomir 2006). La conformación estructural funcional en eucariontes es generalmente en forma de tetrámeros, donde cada subunidad posee entre de 712 y 715 residuos de aminoácidos (Fig. 10-b), mientras que en procariotas se encuentra como dímeros, cada subunidad con aproximadamente 70 a 90 residuos (Fig. 10-a) (63). La Gln6Pi se considera miembro de la familia de enzimas amido-transferasas clase II en las cuales, la cisteína catalítica se encuentra en el a.a N-terminal. Se componen básicamente por dos dominios distintos: uno de transferencia de amino-glutamina (GAT) y otro de síntesis, sin embargo, recientemente se ha propuesto un dominio C-terminal tipo isomerasa

(Slawomir 2006). Muchos de los mecanismos regulatorios en la actividad celular relacionados con esta enzima han sido dilucidados en levaduras. Estos mecanismos incluyen el control transcripcional, así como controladores alostéricos y/o modificaciones covalentes en la propia enzima. En *Saccharomyces cerevisiae* se ha observado que la expresión del gene *GFA1* se puede inducir en respuesta a la activación de la cascada de las MAP cinasas y que la fosfatasa Glc7, está involucrada en la regulación del gen. Así mismo, esta expresión se puede potencializar en respuesta a un estrés en la pared celular (Lagorce 2002, Bulik 2003, Boorsma y Ram 2004).

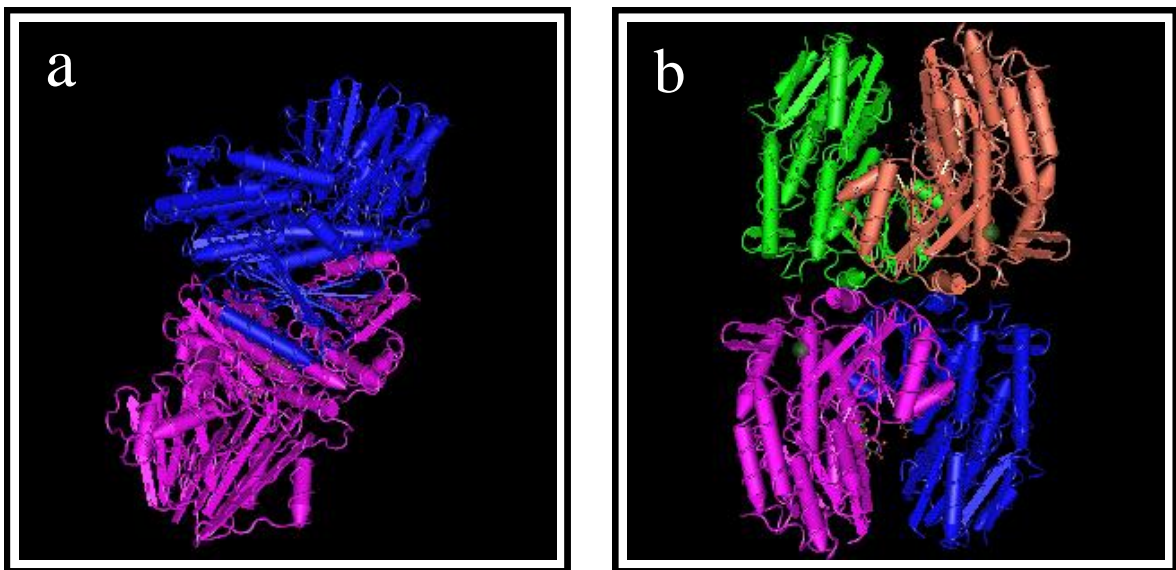


Fig. 10. Estructura cristalográfica de la Glucosamina 6-fosfato isomerasa de a) *Escherichia coli* formada por 2 subunidades; y b) *Candida albicans* por 4. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure>).

13. Metabolismo de la quitina: blanco para nuevos fármacos y drogas contra parásitos

La quitina ocupa el segundo lugar de los carbohidratos con la mayor biomasa distribuida en la naturaleza, su biocatálisis únicamente es sobrepasada por la celulosa. La síntesis de este polímero no ocurre en vertebrados ni en mamíferos, por esta razón representa un blanco parásito-específico que se encuentra disponible para el ataque quimioterapéutico con baja toxicidad para el hospedero, además de ser esencial en diversos procesos metabólicos de muchos microorganismos, como hongos, protozoarios, nemátodos y artrópodos (Spindler 1990). Generalmente se presenta en forma de fibras helicoidales, formando un homopolímero de aminoazúcares de unión β -(1-4).

Estas microfibras pueden presentar un arreglo en paralelo (quitina- β) ó con orientación antiparalela (quitina- α), sin embargo, también puede presentarse en una forma mixta llamada quitina- γ (Fig. 11). Hasta el momento no existen reportes de la presencia de quitina pura en la naturaleza, siempre está acompañada de otros aminoazúcares y proteínas unidas covalentemente (Spindler 1990). Esta interacción, así como la estructura, puede determinar muchas de las propiedades del homopolímero. Dentro del metabolismo de la quitina las diferencias principales radican en los componentes no-quitinosos. Por ejemplo en los artrópodos, la quitina se encuentra embebida sobre una matriz proteíca a la que se une covalentemente, además se encuentra cubierta por una capa lipídica externa que la protege contra algún químico que pueda interferir en su metabolismo. Este tipo de estructura no esta presente en los hongos (Spindler 1990). Otro aspecto importante es la degradación de la quitina, la cual juega un papel primordial sobre todo en aquellos organismos donde el polímero se encuentra como parte estructural de sus huevos y/o quistes (forma de diseminación). La quitinasas son las enzimas encargadas de la degradación de la quitina y de acuerdo con sus actividades enzimáticas se pueden dividir en exo y endoquitinasas (Spindler 1990).

A nivel inmunológico el uso de carbohidratos como inmunógenos es muy limitado debido a su pobre naturaleza inmunogénica. No obstante, algunos estudios recientes han evaluado los efectos inmunológicos de la quitina tanto *in vivo* como *in vitro*, sugiriendo que este polímero es capaz de activar macrófagos y otras células de la inmunidad innata generando una respuesta celular de tipo Th1 y/o Th2. (Lee 2009) (Fig. 12). Así mismo, algunos investigadores sugieren que la quitina puede comportarse como pro ó anti-alérgico, aunque esta teoría aún es objeto de discusión (Lee 2009). Actualmente, el uso de compuestos que interfieran en el metabolismo de la quitina es un campo que va avanzando en la búsqueda de blancos accesibles, sin embargo, la elucidación del mecanismo de síntesis, resulta ser la alternativa más viable.

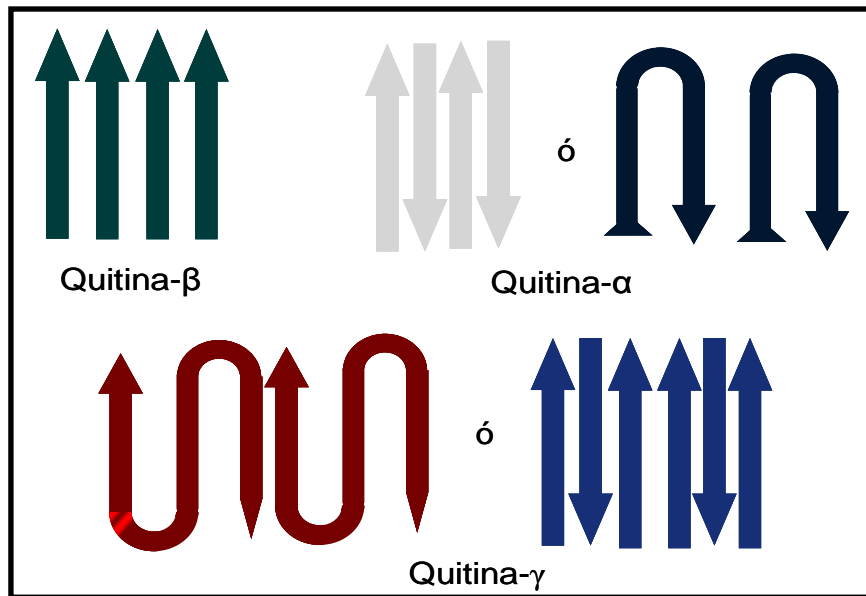


Fig. 11. Orientación espacial de las cadenas estructurales de la quitina α , β y γ (Klaus 1990).

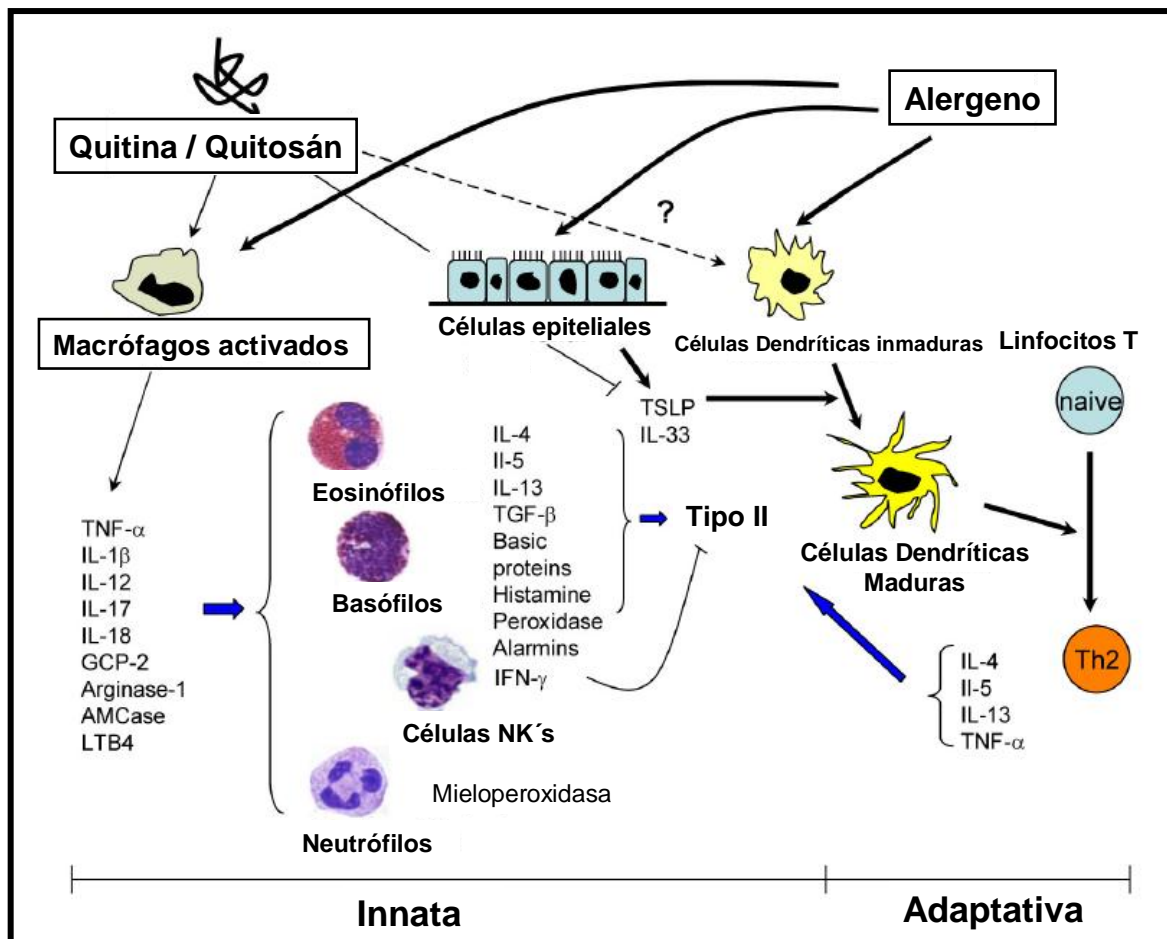


Fig. 12. Estimulación de respuesta inmune innata y regulación de la respuesta inmune alérgica adaptativa mediada por la quitina y quitosán. La activación de macrófagos se realiza mediante el estímulo generado por la quitina y/o el quitosán. Los macrófagos vía receptor de manosa, TLR-2 y

receptor de lectina tipo-C, expresan diversas citocinas, quimiocinas proinflamatorias y otros mediadores inflamatorios. Esta activación produce el reclutamiento de eosinófilos, basófilos y neutrófilos, generando una respuesta alérgica, por la secreción de citocinas tipo Th2 (IL-4, 5 y 13), así como histamina y peroxidasas. Los eosinófilos y basófilos, potencian la respuesta Th2 (Lee 2009).

14. Silenciamiento de genes

En todos los seres vivos existen mecanismos de regulación que están relacionados con la respuesta a diferentes estímulos a los que las células se exponen en el medio donde se desarrollan. Esta regulación se puede dar a diferentes niveles, sin embargo, los mecanismos más conocidos son los epigenéticos, las modificaciones pos-traduccionales y los procesos encargados de regular la transcripción de un gen. Actualmente sabemos que una de las principales funciones del ARN es la de formar parte de la maquinaria encargada de dotar a la célula de su carga proteica. Este mecanismo posee diferentes niveles que regulan la transcripción del ARNm. Un ejemplo son los diferentes elementos en *cis* y *trans* que interactúan con el promotor cuya función es regulatoria y el “splicing” o edición del ARN que puede proporcionar variabilidad y control de la expresión de un gen. Hasta hace apenas una década se avanzó sobre el estudio de otro mecanismo de regulación negativa, el ARN de interferencia. En este proceso, una hebra de ARN bicatenario es capaz de inhibir la transcripción de un gen. Existen varias moléculas capaces de inducir silenciamiento por interferencia, sin embargo, las más ampliamente estudiadas son: los ARN interferentes pequeños (siARN) y los microARN (miARN) (Naqvi1 2009). Los siARN son moléculas con un tamaño de 20-25 nt cuyos precursores son moléculas de RNA de doble cadena, procesados por una enzima llamada DICER. Estas proteínas son ARNasas que al igual que la ARNasa III, son enzimas que degradan y/o cortan RNA (Lee 2004, Naqvi1 2009). Una vez procesados, los precursores ARNm se reconocen e incorporan a un complejo denominado siRISC (*Small-Interference RNA-induced silencing complex*). El mecanismo de interacción entre los siARN y el siRISC resulta en el acoplamiento de una sola de las hebras de los siARN que servirá como guía para el

reconocimiento del ARNm blanco por complementariedad (Tomari 2004). Este reconocimiento media la degradación del mensajero por medio de ARNasas acopladas al complejo siRISC (Fig. 13).

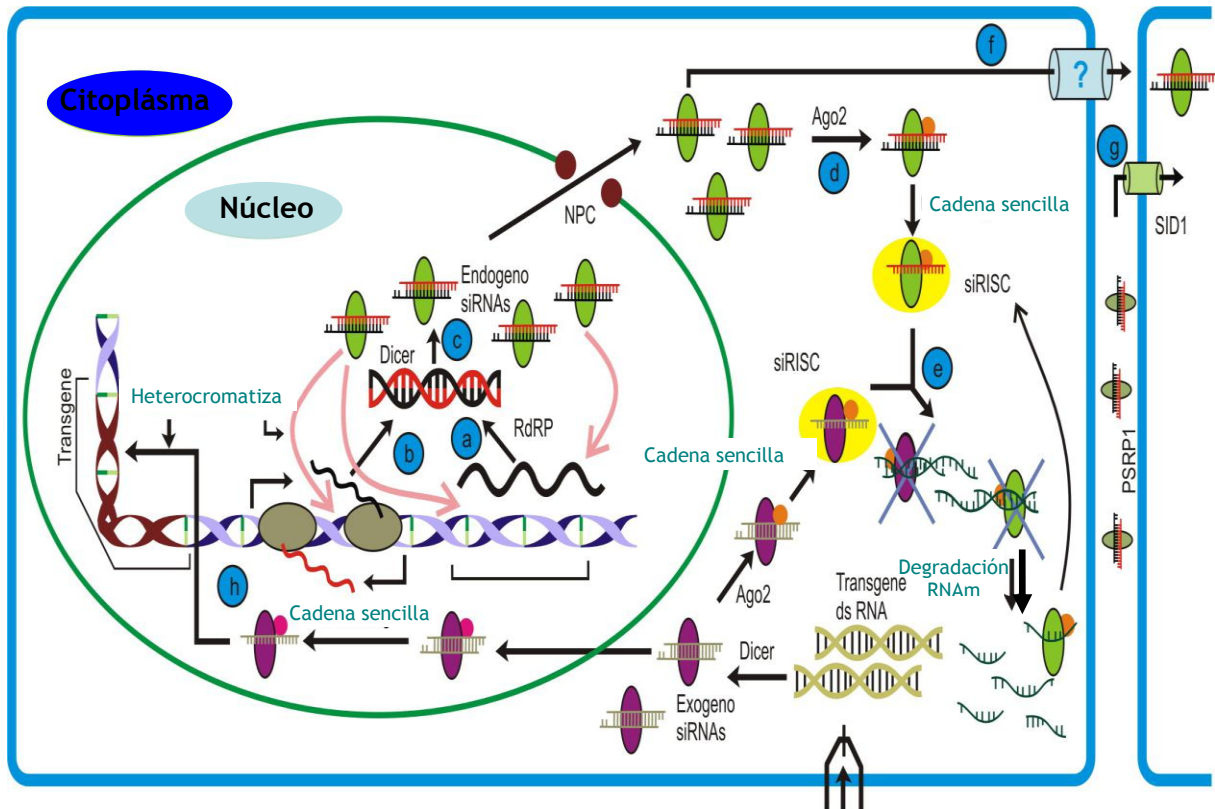


Fig. 13. Mecanismo de silenciamiento mediante los RNA interferentes pequeños (siRNA) (Naqvi 2009).

La segunda vía de procesamiento está dirigida por los miARN. Estas moléculas, a diferencia de los siARN, son obtenidas y procesadas de diferente forma. Los precursores de los miARN son secuencias encontradas en el genoma de la célula. Estas secuencias son transcritas como cualquier mensajero y el producto obtenido es conocido como pri-microARN (Bartel 2004). Esta molécula es procesada directamente en el núcleo por una ARNasa tipo III conocida como *Drosha*. El corte resulta en moléculas de 70-100 pb llamadas pre-microARN, capaces de auto-complementarse y originar una estructura tipo *tallo-asa* pero con la característica de tener varios "missmatches". Los pre-microARN's son transportados al citoplasma por la proteína *exportina-5* cuya función además del transporte, es la de regular el tráfico de estas moléculas fuera del núcleo (Hwang 2007). En el citoplasma los pre-microARN serán procesados al igual que los siARN por DICER, resultando en

moléculas de ARN de doble cadena de 21 a 24 nt denominadas miARN. Una vez cortadas y procesados los miARN serán reconocidos por un complejo ribonucleoproteínico (miRNP o miRISC) similar al siRISC. Del mismo modo que el complejo siARN-siRISC, los miARN son acoplados a miRISC como cadena guía. A diferencia de los siARN, el mecanismo de silenciamiento en esta vía es mediado por la unión del complejo miARN-miRISC al ARNm blanco, impidiendo la unión al ribosoma y por tanto su traducción (Bartel 2004, Naqvi 2009) (Fig. 14).

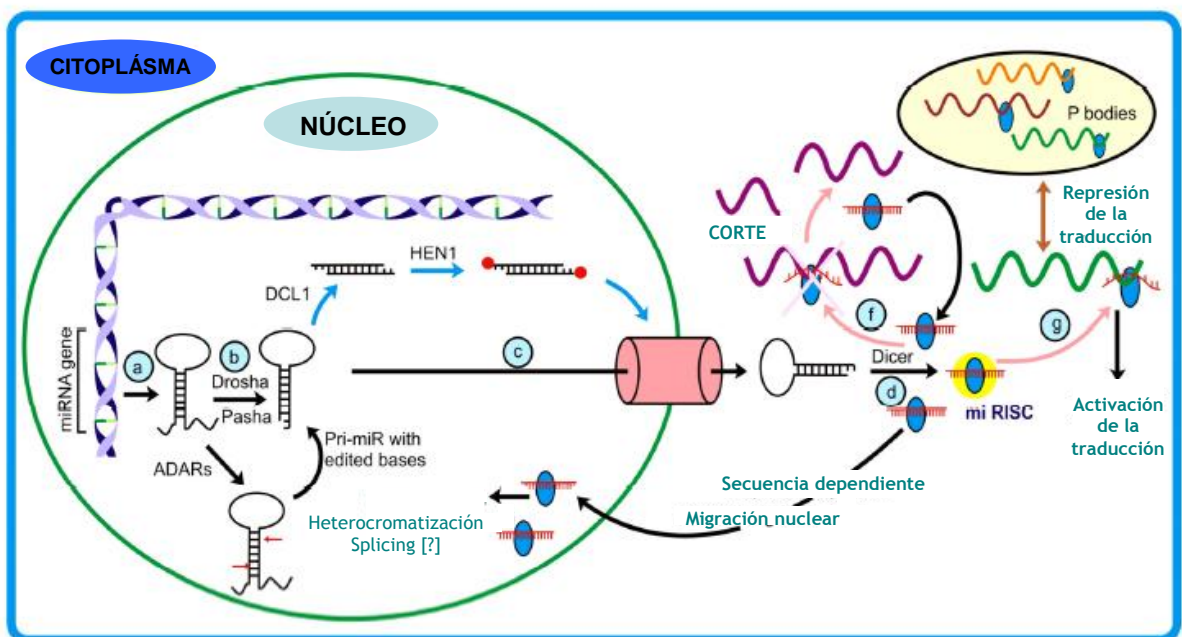


Fig. 14. Mecanismo de silenciamiento mediante los micro RNA (miRNA) (Naqvi 2009).

Estudios recientes en *Entamoeba histolytica* han demostrado que en el genoma de la ameba existe la maquinaria genética necesaria para llevar a cabo el silenciamiento de genes mediante el mecanismo de ARNi. Así mismo, existen pruebas que muestran silenciamiento de los genes que codifican a los ameboporos (Anbar 2005). El uso de transgenes que poseen elementos de regulación transcripcional y la presencia de estos elementos en el extremo 5' son suficientes para inducir el fenómeno de silenciamiento (Bracha 2005). Con base en todo lo anterior, este trabajo evaluó el papel de la Gln6Pi durante el enquistamiento de *E. histolytica*. Parte de esta caracterización se basó en el silenciamiento del gen mediante el uso de ARNi. El estudio del

control transcripcional de esta enzima y el control de su expresión génica, puede ser la pauta para el entendimiento del proceso de enquistamiento en la búsqueda de nuevos blancos para el bloqueo de su expresión mediante el desarrollo de nuevos fármacos, interrumpiendo el ciclo de vida, para evitar su propagación.

IV. RELEVANCIA E IMPACTO EN EL ÁREA DE ESTUDIO

E. histolytica es el parásito causante de la amibiasis en humanos. Se estima que cerca del 10% de la población mundial se encuentra infectada por este protozooario (OMS 1997). Por su alta tasa de morbilidad y mortalidad, la amibiasis se ubica como la tercera causa de muerte por parásitos protozoarios en el mundo, lo cual resulta un grave problema de salud pública (Walsh 1986). A pesar de la eficacia de algunos fármacos, la incidencia de la enfermedad va en constante aumento paralela al incremento de la pobreza. En virtud de no existir una solución efectiva para los graves problemas socioeconómicos que favorecen la transmisión de esta parasitosis, el desarrollo de una vacuna o la búsqueda de blancos para la generación de nuevos fármacos parecen ser la mejor alternativa. Con base en esto, múltiples grupos se han dado a la tarea de investigar diferentes aspectos de la biología de *E. histolytica*, así como la expresión génica y la regulación transcripcional con el fin de proponer nuevas estrategias que contribuyan al bloqueo del ciclo de vida de este patógeno humano. El quiste, estadio infeccioso de la amiba, es una estructura tetranucleada resistente a los ácidos del tracto digestivo del hospedero que posee un tamaño aproximado de 9 a 25 μm y son responsables de la transmisión de la enfermedad (Radvin 1988). Los quistes son ricos en carbohidratos, proteínas y quitina, lo que resulta en una pared extracelular rígida resistente a condiciones adversas como aquellas a las que se enfrenta el parásito cuando es expulsado en las heces al medio ambiente (Radvin 1988). A pesar de que la mayoría de los estudios se han centrado en lograr su obtención *in vitro*, lamentablemente no se ha descrito un proceso reproducible y convincente que resulte en las formas maduras infectivas. La mayoría de estos estudios se han basado en reportes previos de enquistamiento *in vitro* de otros protozoarios, como es el caso de *Entamoeba invadens* y *Giardia lamblia*. En general, estos parásitos han sido enquistados ante una amplia variedad de estímulos, como el agregar a los cultivos de trofozoítos bilis, carbohidratos secretados por las mucinas del epitelio intestinal y diversos tipos de bacterias que tienen similitud con aquellas del tracto digestivo, así como variar el pH de cultivo y las

concentraciones de azúcares (Bailey 1980, Vázquez 1984, Avron 1986, Luján 1997, Svärd 2003, Lauwaet 2007). A pesar de la similitud entre *E. invadens* y *E. histolytica*, los ensayos con esta última para inducir su enquistamiento han sido infructuosos. En el caso de *G. lamblia*, se ha observado que la estructura filamentosa de la pared del quiste consiste de un polímero de N-acetilgalactosamina (GalNac), un carbohidrato que es sintetizado a partir de glucosa endógena por medio de una vía de biosíntesis asociada al proceso de enquistamiento (Chávez-Munguía 2007). El primer paso en la vía biosintética de la pared del quiste y por lo tanto en la síntesis de GalNac, es catalizado por una enzima de nombre glucosamina-6-fosfato isomerasa (Gln6PI), la cual isomeriza y amina de forma reversible a la fructosa-6-fosfato a glucosamina-6 fosfato (Steimle 1997, López 2002). La expresión de esta enzima se incrementa notablemente cuando los trofozoítos comienzan a transformarse en quistes, indicando que se inicia la vía biosintética de la GalNac y por lo tanto de la pared quística (Steimle 1997, López 2002). La contribución de este tipo de estudios es de suma importancia para poder sentar las bases que ayuden a conocer los estímulos y procesos involucrados en el enquistamiento y con ello encontrar la forma de bloquear su formación y la propagación de la enfermedad.

En base a lo anterior, este proyecto pretende abordar el fenómeno de enquistamiento desde el punto de vista molecular, evaluando la participación de la Glucosamina 6-fosfato isomerasa, enzima clave en el proceso de la síntesis de quitina y de la formación de la pared del quiste.

V. HIPÓTESIS

Ya que el enquistamiento de algunos protozoarios intestinales patógenos como *G. lamblia* se inicia con la sobre-expresión de la Gln6Pi y que en teoría la ruta metabólica de la pared del quiste es similar en la amiba, el enquistamiento de *E. histolytica* será dependiente de la sobre-expresión de esta enzima.

VI. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar a nivel molecular la participación de la enzima Glucosamina 6-fosfato isomerasa de *E. histolytica* en el proceso de enquistamiento *in vitro*.

Objetivos particulares

- Realizar ensayos de inducción del enquistamiento *in vitro* en trofozoítos de *E. histolytica*.
- Evaluar la morfología y viabilidad de las estructuras obtenidas después de la inducción.
- Evaluar mediante RT-PCR y western blot los niveles de expresión de la Gln6Pi durante el enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica*.
- Evaluar el efecto del bloqueo de la expresión del gen de la Gln6Pi mediante RNA de interferencia sobre el enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo de parásitos

La obtención de las células para los experimentos se realizó de la siguiente forma: trofozoítos axénicos de *E. histolytica* (cepa HM-1:IMSS) fueron cultivados en medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100U/ml de penicilina, 100µg de sulfato de estreptomicina y 3% de Vitaminas de Diamond 8 (SAFC, Biosciences, USA) (Diamond *et al.* 1978) e incubados a 37°C.

2. Ensayos de inducción del enquistamiento

Trofozoítos se desprendieron del crecimiento en monocapa por enfriamiento en hielo durante 5 min y se cosecharon por centrifugación a 150 x g durante 7 min a 4°C. Las células (1×10^5), fueron resuspendidas en tubos con 50 ml de medio TYI-S-33 fresco e incubadas a 37°C. Después de 72 h los trofozoítos en fase *log* de crecimiento (aprox. 5×10^6), fueron sometidos al tratamiento con solución comercial de H₂O₂ al 30% conteniendo los siguientes elementos: 0.02ppm cadmio, 0.02ppm cobalto, 0.02ppm cobre, 0.1ppm hierro, 0.02ppm nickel, 0.02ppm plomo, 0.02ppm zinc, 40ppm ac. Sulfúrico libre, 0.5ppm cloro, 5ppm fosfato y 2ppm sulfato (Merck, Darmstadt, Germany). La estimación final de la concentración de H₂O₂ añadida fue de 2 a 8 mM con trazas de los elementos en un orden de 10^{-10} ppm. Estos cultivos fueron incubados a 37°C y se tomaron muestras de 5ml cada 2, 4, 6, 8 y 24 h. Después del tratamiento, los parásitos fueron lavados tres veces con PBS pH 7.2, contados con cámara de Neubauer e incubados durante 10min con diferentes detergentes (PBS más Sarcosil 0.5%, Tritón X-100 0.5% ó SDS 0.5%), para determinar su grado de resistencia (González-Salazar 2000, Barrón-González 2005). Al término de la incubación los trofozoítos resistentes a los detergentes fueron resuspendidos en PBS y contados nuevamente. A partir de aquí, las estructuras resistentes al detergente (estructuras tipo quiste) fueron denominadas ETQ. El índice o rango de conversión fue estimado como el porcentaje de parásitos que presentaron resistencia al tratamiento con SDS y lograron la conversión a ETQ. Este índice fue determinado para cada concentración de H₂O₂ y tiempo de incubación. Se realizaron tres

experimentos independientes con triplicados para cada concentración de la solución de tratamiento y tiempo de incubación. Adicionalmente, las ETQ fueron teñidas con Lugol (Lugol Solution, SIGMA, Germany) y verde Malaquita (Malachita Green, SIGMA-ALDRICH, Germany) y se realizaron observaciones con microscopía de luz. Todos los experimentos subsecuentes fueron realizados usando ETQ obtenidas con el tratamiento de 4 mM de H₂O₂ durante 6 h, ya que estos resultados mostraron ser los óptimos para la conversión de los trofozoítos (ver resultados).

3. Ensayos de viabilidad

Diacetato de Fluoresceína. La determinación de la viabilidad de las ETQ se realizó mediante el uso de Diacetato de Fluoresceína (FDA). Este ensayo se basa en la conversión de FDA a fluoresceína mediante la actividad de esterasas y carboxilasas en el citoplasma, sugiriendo un metabolismo celular activo. Este método ha sido empleado previamente para la evaluación de la viabilidad de quistes en *Giardia sp.* (Schupp 1988). La viabilidad se determinó en aquellos trofozoítos que fueron tratados con 2, 4 y 8 mM de H₂O₂ durante 2, 6 y 24 h. Una vez tratadas las células fueron centrifugadas y el botón se lavó 3x con solución PBS. La selección de las ETQ resistentes se realizó incubando con 0.5% de SDS durante 10 min. Después de 3 lavados, las ETQ resultantes se contaron, ajustaron y resuspendieron en PBS para tener 1x10⁶ células/ml. De esta mezcla se tomaron 100 µl (1x10⁵ células) y se trataron con 1.6 µl de solución stock (FDA 2.5 mg/ml en acetona) (Invitrogen, USA) 8 min a temperatura ambiente. El porcentaje de viabilidad se determinó por el conteo de las células fluorescentes bajo un microscopio de epifluorescencia con filtro BP350-460.

4. Microscopia electrónica de transmisión

Las ETQ resistentes al tratamiento con detergentes (ver arriba) fueron centrifugadas y lavadas tres veces con PBS. La fijación se realizó incubando en solución de Karnovsky (formaldehído-paraformaldehído 1:1) por 72 h a 4°C. Subsecuentemente, las células se lavaron con cacodilato de sodio 0.1 M seguido de la adición de algunas gotas de tetróxido de sodio 0.1% en

buffer Zelterqust. La deshidratación se efectuó mediante el pase por etanol a diferentes porcentajes (70, 80, 90, 95 y 100%), (2x durante 10 min c/u). Adicionalmente se realizaron dos incubaciones en acetronitilo durante 20 min. Las muestras se incluyeron en EPON y se cortaron en microtomo para la obtención de cortes ultrafinos (3 μ m). En los cortes se realizó una doble tinción mediante el uso de 5% de acetato de uranilo en agua destilada y con 0.25% de citrato de plomo en 0.1 N de NaOH. Las observaciones se llevaron a cabo en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010.

5. Microscopia electrónica de barrido

Las ETQ resistentes se centrifugaron y cosecharon como anteriormente se describió. Los botones obtenidos se fijaron incubando en formaldehído al 10% durante 72 h. La deshidratación se realizó incubando 24 h en etanol gradual (50, 60, 70, 80 y 90%) y en etanol absoluto durante 48 h. Una vez deshidratadas, las células fueron resuspendidas en acetona pura y colocadas en un secador a punto crítico. Finalmente, las muestras se montaron en laminillas de vidrio y se bombardearon con partículas de oro durante 20 min. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL LSM6360LV.

6. Determinación de la presencia de quitina.

Tinción con calcoflúor blanco. La determinación de quitina en las ETQ se realizó mediante el uso de Calcoflúor blanco M2R (Fluorescent Brightener 28-SIGMA), una sal disódica del ac. 4,4-bis-[4-anilino-bis-dietilamino-5-triazino-2-ilamino]-2,2 estilbeno-disulfónico capaz de unirse a los polisacáridos con enlace β 1-3 y enlace β 1-4 (p. ejemplo la quitina y la celulosa), produciendo fluorescencia verde o blanco azulado al exponerse a la luz ultravioleta de longitud de onda corta. Para la tinción, las ETQ resistentes al tratamiento con detergentes se cosecharon por centrifugación y se lavaron 3x con PBS. Del botón final se realizaron preparaciones en portaobjetos, se añadieron varias gotas de solución 0.05% de calcoflúor blanco en agua (M2R Fluorescent Brightener SIGMA, USA) y se incubaron durante 10 min. Las observaciones se realizaron bajo luz U.V. en

microscopio de epifluorescencia con filtro BP350-460. El mismo procedimiento fue utilizado para teñir los quistes maduros de *E. histolytica* utilizados como controles positivos, los cuales fueron aislados de materia fecal de un paciente con amibiasis intestinal usando el método de sedimentación de Ritchie.

Ensayos de unión a la Aglutinina del Gérmen de Trigo (WGA). Para corroborar la presencia de quitina en las ETQ se realizó un segundo ensayo con la lectina WGA (Germ Agglutinin Wheat, Sigma L-9640), que al igual que el calcoflúor blanco es capaz de unirse específicamente a los polímeros de quitina. Este ensayo se basó en el método modificado de la estimación de presencia de quitina en levaduras (Lucero 2002), como se describe: placas de 96 pozos de poliestireno se sensibilizaron con una solución de WGA en agua (50 mg/ml), incubando a 4°C durante toda la noche. Para remover el exceso de WGA, las placas fueron lavadas cinco veces, con PBS-Tween 0.05% y bloqueadas con solución BSA 0.4%-Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 durante 3 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS-Tween se añadieron a cada pozo 100 µl de 1×10^4 ETQ (1×10^4 cel/100ml PBS). Como control negativo se utilizaron extractos totales de 1×10^4 trofozoítos sin tratar, lisados por ciclos de calor-enfriamiento (Nitrógeno líquido-37°C). Se añadieron 100 µl de estos extractos a cada pozo. Como control de pegado inespecífico (blanco) se utilizaron todos los reactivos pero sin muestras biológicas (ETQ ni extractos). Las placas fueron incubadas 2 h a temperatura ambiente en agitación lenta. Al término de la incubación las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0.05%. Posteriormente se añadió el conjugado secundario (WGA-HRP) (Sigma L-3892, USA) a una dilución 1:1000 en buffer de bloqueo. Se incubó 15 min a temperatura ambiente. Al término de la incubación, los pozos se lavaron cinco veces y se revelaron añadiendo 100 µl de solución TMB (5,5'-tetrametilbenzidina; Sigma Aldrich 860336) durante 5 min. La reacción se detuvo adicionando 1 N de H₂SO₄ y fue evaluada a 430 nm por espectrofotometría. Se realizaron tres experimentos independientes cada uno por cuadruplicado.

7. Determinación del papel de los dicaciones metálicos en la formación de ETQ

Se montaron dos diferentes ensayos de inducción utilizando solo dicaciones metálicos como inductores del enquistamiento. El primer método consistió en consumir totalmente el H₂O₂ de la solución de tratamiento (H₂O₂ + dicaciones metálicos) mediante la adición de catalasa. La solución obtenida sin H₂O₂ (conteniendo únicamente los dicaciones metálicos), fue utilizada a diferentes volúmenes (5, 10, 20, 50 y 100 µl) para tratar a trofozoítos en fase *log* resembrados en medio de cultivo TYI-S33. La evaluación del fenotipo se realizó 2, 4, 6 y 24 h post-tratamiento por microscopia de luz y evaluando el índice de conversión (grado de resistencia a detergentes) como se describió previamente. El segundo ensayo, consistió en la preparación de una solución stock que contuviera todas las trazas de los dicaciones metálicos contenidos en la solución de inducción original (0.02ppm cadmio, 0.02ppm cobalto, 0.02ppm cobre, 0.1ppm hierro, 0.02ppm nickel, 0.02ppm plomo, 0.02ppm zinc, 40ppm ac. Sulfúrico libre, 0.5ppm cloro, 5ppm fosfato y 2ppm sulfato). Así mismo, trofozoítos en fase *log* fueron resembrados en presencia de diferentes volúmenes de esta solución (1, 2, 4, 8, 16 y 20 µl). La evaluación del fenotipo se realizó a las 2, 4, 6 y 24 h pos-tratamiento como se describió previamente.

8. Extracción de DNA, RNA y ensayos de RT-PCR

La secuencia del gen de la enzima de la Gln6Pi de *E. histolytica* se identificó mediante un análisis *in silico* por homología con otras secuencias de Gln6Pi. Todas las secuencias fueron obtenidas a partir de la base de datos del proyecto de secuenciación del genoma de *E. histolytica*, reportada en el TIGR (The Institute of Genome Research). La secuencia completa del gen de la Gln6Pi se amplificó por PCR a partir de ADN obtenido de trofozoítos en fase *log* cultivados en medio TYI-S33 (Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24.1)). La PCR se realizó con oligonucleótidos específicos (Tabla 2) por 35 ciclos, con una TM=58°C (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Germany). Los productos de PCR obtenidos fueron corridos en geles de agarosa al 1.5%. La determinación de los niveles de ARNm del gen de la Gln6Pi se realizó mediante ensayos

de RT-PCR. El ARN utilizado para estos ensayos se obtuvo a partir de trofozoítos de *E. histolytica*, ETQ y quistes obtenidos de las heces de pacientes positivos para amibiasis intestinal. La purificación del ARN total se realizó por el método de TRIZOL (Invitrogen USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las reacciones de RT-PCR se hicieron utilizando el kit Super Scrip III One-step RT-PCR (Invitrogen, USA) como se describe: 400 µg de ARN total fue utilizado para cada reacción realizada en el termociclador (Mastercycler gradient by Eppendorf) a una $T_M=58^{\circ}\text{C}$ durante 35 ciclos. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la secuencia de la Gln6Pi (TIGR XM_648225) y del ARF (factor de ribosilación dependiente de ADP) (TIGR XM_648949) de *E. histolytica*, éste último utilizado como control de interno de carga (Gosh 1999, Eichinger 2001) se describen en la tabla 2. Todos los productos obtenidos del RT-PCR fueron corridos en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. Los análisis de densitometría de las imágenes obtenidas se realizaron en un *Gel Logic Imaging System* (Kodak) usando el programa Kodak Molecular Imaging Software (Standard Edition).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para evaluar la expresión del ARNm del gen de la Gln6Pi de *E. histolytica*.

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Gene Blanco
gln6Pi Gln6Pi-F	ATGTCATCCACAAACGAAAATATTC	<i>gln6Pi</i>
gln6Pi Gln6Pi-R	CAATAGACATGGATTTATCATATC	<i>gln6Pi</i>
EhARF ARF-F	GTAGGACTTGATGCTGCC	<i>EhARF</i>
EhARF ARF-R	TCACCATTAGTTGCAC	<i>EhARF</i>

9. Ensayos de silenciamiento del gen de la Gln6Pi de *E. histolytica*

Diseño de los interferentes (siARN). Estos ensayos se basaron en el uso de los siARN que son moléculas de ARN de 19-21 pb perfectamente complementarias y apareadas. Estas moléculas

son producto de la acción de una enzima llamada DICER que por medio de la unión de una de sus hebras al ARNm del gen blanco (*Gln6Pi*), inducen su degradación vía complejo RISC. Para la obtención de los siARN's se realizó un análisis *in silico* a partir de la secuencia completa de la *Gln6Pi* de *E. histolytica* (Applied Biosystems), en busca de posibles blancos de silenciamiento. Una vez obtenidos los interferentes se realizaron alineamientos a partir de la secuencias de los siARN contra el genoma de *E. histolytica* para evitar algún alineamiento con otro gen no deseado. Con base a los resultados obtenidos las secuencias de los oligonucleótidos interferentes (siARN) usados para los ensayos interferentes fueron las siguientes:

1) Si 154-*Gln6Pi* 5'GGACAUGCAGUAUUAGGAUTT-3'

2) Si 229-*Gln6Pi* 5'GCUGGAGAAGUUUCAUUUATT-3'

Ensayos de silenciamiento. Para evaluar la capacidad interferente y el efecto del silenciamiento del gen de la *Gln6Pi* sobre el enquistamiento, se utilizaron los siARN por separado a diferentes concentraciones (5, 10, 20 y 40 μ g). Así mismo, para evaluar un posible efecto sinérgico se preparó una mezcla de ambos siARN (Si 154-*Gln6Pi* y Si 229-*Gln6Pi*) (Applied Biosystems) con las mismas concentraciones. Como control negativo se utilizó un siARN (scrambled-sequence) (siRNA-A:sc-37007, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una concentración de 0.9 μ M/8x10⁵ trofozoítos. Este siARN posee una secuencia incapaz de inducir degradación de cualquier ARNm en la célula blanco. La incorporación de las sondas de siARN a los trofozoítos se realizó mediante la técnica de "Soaking" descrita por Solís y Guillen (2008, 2009) (Fig. 15). Se cultivaron 1x10⁵ trofozoítos en cajas de poliestireno con 6 ml de medio TYI-S33. Una vez obtenida una confluencia de \approx 50% (\approx 24 h después) se añadieron diferentes concentraciones de cada una de la mezclas con los siARN (5, 10, 20 y 40 μ g) por triplicado y se dejaron incubando a 37°C durante 16 h. Los análisis del fenotipo se realizaron incubando los trofozoítos interferentes 6 h, en presencia de la solución inductora de enquistamiento (H₂O₂ + dicationes metálicos), como previamente se describió. Después de la incubación se evaluó el grado de resistencia al Sarcosil

0.5% y se realizaron observaciones con microscopia de luz en busca de características similares a las de ETQ y tinciones con calcoflúor blanco para determinar la presencia de quitina (Fig. 15). Todas las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de ARN de interferencia se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para evaluar la expresión del ARNm del gen de la Gln6Pi de *E. histolytica* en trofozoítos interferentes (siARN).

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Gene Blanco
gln6Pi Gln6Pi-F	ATGTCATCCACAAACGAAAATATTC	<i>gln6Pi</i>
gln6Pi Gln6Pi-R	CAATAGACATGGATTTATCATATC	<i>gln6Pi</i>
EhARF ARF-F	GTAGGACTTGATGCTGCC	<i>EhARF</i>
EhARF ARF-R	TCACCATTAGTTGCAC	<i>EhARF</i>
siRNA 154-Gln6Pi	GGACAUGCAGUAUUAGGAUTT	<i>gln6Pi-RNA</i>
siRNA 229-Gln6Pi	GCUGGAGAAGUUUCAUUUATT	<i>gln6Pi-RNA</i>
siRNA-A:sc-37007	_____	<i>ninguno</i>

9.1 Evaluación la expresión de la Gln6Pi de *E. histolytica* en trofozoítos interferentes

La evaluación la expresión de la Gln6Pi se llevó a cabo mediante ensayos de western blot y RT-PCR a partir de extractos proteicos obtenidos de trofozoítos interferentes y de la purificación de RNA total respectivamente.

RT-PCR. La evaluación de los niveles de expresión del gen de la Gln6Pi, se realizó mediante ensayos de RT-PCR utilizando el Kit Super Script III One-Step (Invitrogen, USA). La extracción de ARN se realizó por el método de Trizol siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Las reacciones de RT-PCR para cada uno de los tratamientos (5, 10, 20, y 40 µg de siRNA's), se realizaron a partir de 900 ng de ARN total y utilizando oligonucleótidos específicos de la Gln6Pi de *E. histolytica* (Tabla 2-3). Los amplicones obtenidos se cuantificaron y se corrieron en geles de

acrilamida al 1%. Para cada muestra se cargaron 100 ng del producto de RT-PCR. Como control de carga se utilizó el ARF de *E. histolytica* (TIGR XM_648949) que había sido utilizado en ensayos previos como control para determinar la expresión de la Gln6Pi de *E. histolytica* (Gosh 1999, Eichinger 2001 y Aguilar-Díaz 2010). Como control del silenciamiento se utilizó ARN total obtenidos a partir de trofozoítos transfectados con el siRNA-A:sc-37007 (scrambled-sequence).

Western blot. Para evaluar la expresión de la Gln6Pi se realizaron ensayos de western blot a partir de proteínas totales de los trofozoítos interferentes transfectados con la mezcla de siARN (5, 10, 20 y 40 µg). Los controles utilizados fueron extractos de proteínas de trofozoítos sin tratar y de trofozoítos transfectados con el siRNA-A:sc-37007 (scrambled-sequence). Un total de 15 µg de los extractos se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% y fueron transferidos en membranas de nitrocelulosa. Para evaluar los rendimientos de la transferencia, se realizaron tinciones con rojo de *Ponceau*. Las membranas se bloquearon con solución PBS-Tween (0.3%)/BSA 5% por espacio de 18 h a 4°C. El primer anticuerpo anti-Gln6Pi policlonal de ratón (GNPDA1, Affinity Bioreagents, USA) se incubó toda la noche a 4°C a una dilución 1:500. El anticuerpo secundario (Anti-Mouse-HRP, IgGAM, Zymed, USA) se incubó 2 h a temperatura ambiente. Ambos anticuerpos se diluyeron en una solución PBS-Tween (0.3%)/BSA 1%. El revelado se realizó con el kit ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, UK) en placas radiográficas Amersham Hyperfilm (GE Healthcare, UK).

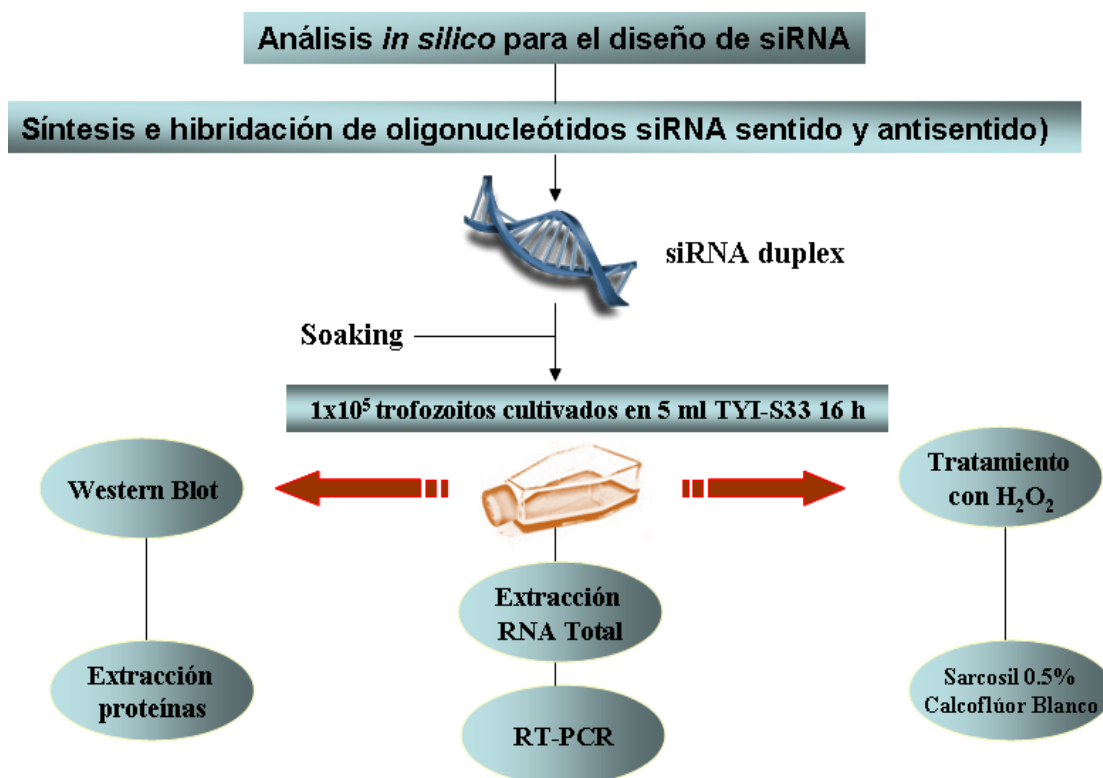


Fig. 15. Incorporación de los siRNA para el silenciamiento del gen de la Gln6Pi de *E. histolytica* mediante un “soaking” (Solís y Guillén, 2008 y 2009).

La captura y documentación de los geles obtenidos se realizó en un Bio-Imaging System MiniBis Pro y todos los análisis de densitometría de las imágenes obtenidas se realizaron en el programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java).

10. Ensayos de enquistamiento con otro generador de estrés oxidativo (Menadiona)

En términos generales para determinar el papel del estrés oxidativo en la diferenciación de la ameba se realizaron ensayos con otro inductor de estrés. La menadiona es una cetona aromática policíclica capaz de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y obtenido de manera sintética. Ramos-Martínez *et al.* (2009) reporta un ensayo *in vitro* en el que observa que este compuesto es tóxico para los trofozoitos de *E. histolytica* a una concentración mayor o igual a 1mM. Con base en este reporte se decidió utilizar dos concentraciones de menadiona por debajo de la concentración letal (0.5 y 0.8 mM). Trofozoitos (5×10^5) en medio de cultivo TYI-33 se incubaron utilizando estas concentraciones y post-tratamiento se realizaron revisiones de los

diferentes tratamientos a las 2, 4, 6 y 24 h. Los controles utilizados fueron trofozoítos tratados con concentraciones mayores a 1 mM (1.5, 2 y 2.5 mM) y trofozoítos sin tratamiento. Se realizaron observaciones en microscopía de luz en busca de características similares a las de un quiste de *E. histolytica*, ensayos de resistencia a diversos detergentes (PBS más Sarcosil 0.5%, Tritón X-100 0.5% ó SDS 0.5%) y tinciones con calcoflúor blanco (M2R Fluorescent Brightener SIGMA, USA) como los realizados para las ETQ (ver arriba).

11. Ensayos de desenquistamiento en medio de Robinson

Para evaluar un posible desenquistamiento de las ETQ se realizaron siembras en medios bifásicos de Robinson (Robinson 1968). Las ETQ utilizadas para este ensayo fueron aquellas que se obtuvieron después de 6 h de tratamiento con 4 mM de H₂O₂ + dicationes metálicos. Antes de la siembra se realizaron preparaciones en fresco con Lugol de las ETQ y se observaron al microscopio. Las siembras se efectuaron añadiendo 1x10⁵ ETQ en un frasco conteniendo agar salino inclinado (agar bacteriológico 1.5% y NaCl 0.7%) y 3 ml de mezcla 1:1 de medio BR-ácido ftálico 0.05M pH 6.2. Previo a esta mezcla se añadieron 5 mg de almidón de arroz, eritromicina al 0.05% y peptona al 20% (100µl). La siembra se incubó a 37°C y se realizaron re-siembras cada 24 h durante 3 días. Las revisiones se efectuaron por microscopía de luz cada 24 h post-siembra en busca de eclosión de ETQ y presencia de trofozoítos.

VIII. RESULTADOS

1. Ensayos de inducción del enquistamiento

Los cultivos suplementados con la solución de tratamiento conteniendo 2 y 8 mM de peróxido de hidrógeno más diferentes trazas de dicaciones metálicos, resultó en un eficiente índice de conversión de los trofozoítos pleomórficos (ETQ). Estas estructuras poseen características similares a las de un quiste maduro como son: forma esférica, multinucleación, refringencia parcial y resistencia al tratamiento con diferentes detergentes (Sarcosil, SDS y Tritón) (Fig. 17 y 18). El índice de conversión definido como el porcentaje de trofozoítos resistentes al tratamiento con 0.5% de SDS fue dependiente del tiempo y concentración del peróxido de hidrógeno utilizado para inducir la transformación. Los mejores índices de conversión obtenidos (30%) fueron aquellos donde los medios de cultivo se suplementaron con 4 mM de H₂O₂ conteniendo 10⁻¹⁰ ppm de los dicaciones metálicos e incubados a 6 h (Tabla 4). Después de 2 h postratamiento aproximadamente un 10% de los trofozoítos mostraron transformación. Esta proporción aumenta gradualmente en función del tiempo sin embargo, después de 24 h este índice disminuye hasta el 1% (Tabla 4). Los medios suplementados con 2 mM y 8 mM reducen notablemente el índice de conversión. Las concentraciones menores a 2 mM no producen conversión de los trofozoítos y las mayores a 8 mM son letales para las células. Los trofozoítos que fueron expuestos a la solución de tratamiento seguido de la selección con detergentes, mostraron mortalidad dependiente del tiempo. Como se mencionó anteriormente, el índice de conversión óptimo se presentó en donde la concentración de la solución inductora fue de 4 mM de H₂O₂. A esta concentración después de 2 h se obtuvieron porcentajes de aproximadamente 90% de células viables que disminuyeron a 65% después de 6 h de tratamiento. La mortalidad continuó aumentando hasta llegar a un 90% después de 24 h de exposición continua a la solución de tratamiento (H₂O₂ + dicaciones metálicos) (Tabla 4). Los tratamientos con 2 mM de H₂O₂ resultaron en una baja mortalidad, sin embargo, también disminuye considerablemente el índice de conversión. En contraparte, los tratamientos con 8 mM

producen un alto índice de células muertas hasta llegar al 100% de mortalidad a las 24 h post-exposición (Tabla 4).

Tabla 4. Índice de conversión de trofozoítos tratados a diferentes tiempos con solución de tratamiento (CFDA: Diacetato de fluoresceína; D.S.: Desviación estándar).

<i>Solución de Tratamiento^a</i>	<i>Tiempo de incubación (hr)</i>	<i>Morfología</i>	<i>Viabilidad (CFDA) (%±D.S.)^b</i>	<i>Índice de conversión (%±D.S.)^b</i>
10µl (2mM)	2	Reducción de tamaño	95 ± 3.6	5 ± 1.5
	6		83 ± 2.5	10 ± 3.0
	24		20 ± 2.5	0
20µl (4mM)	2	Forma redonda	90 ± 1.7	10 ± 1.5
	6	Refringencia	65 ± 9.0	30 ± 5.5
	24	Incremento en vacuolización	10 ± 3.6	2 ± 1.0
40µl (8mM)	2	Multinucleación	85 ± 12	1 ± 1
	6		20 ± 3.6	5 ± 2
	24		0	0

^aSolución de tratamiento (Merck): H₂O₂ 30%, 0.02ppm cadmio, 0.02ppm cobalto, 0.02ppm cobre, 0.1ppm hierro, 0.02ppm nickel, 0.02ppm plomo, 0.02ppm zinc, 40ppm ac. Sulfúrico libre, 0.5ppm cloro, 5ppm fosfato y 2ppm sulfato

^bSe realizaron tres experimentos independientes por triplicado

2. Ensayos de viabilidad

Diacetato de fluoresceína. Para determinar la viabilidad de las estructuras tipo quiste obtenidas después del tratamiento con H₂O₂ más dicaciones metálicos, las células se trataron con acetato de fluoresceína (CFDA), compuesto no polar capaz de penetrar hasta el citoplasma celular, donde por la actividad enzimática de esterasas y carboxilasas produce una coloración fluorescente (Huang 1986). El CFDA ha sido utilizado por varios grupos para determinar la viabilidad en quistes de *Giardia* (Smith 1989 y Thiriat 1998). El análisis realizado a las ETQ expuestas al tratamiento con H₂O₂ más las trazas de dicaciones metálicos seguido al tratamiento con diferentes detergentes, mostró una mortalidad dependiente del tiempo. No obstante, en las incubaciones

donde se utilizó la concentración para el rango de conversión óptimo (4 mM H₂O₂ durante 6 h), aproximadamente el 90% exhiben fluorescencia después de 2 h post-tratamiento (Fig. 16-B). Esta fluorescencia disminuye a 65% después de 6 h de tratamiento (Fig. 16-E). Sin embargo, las tinciones realizadas después de transcurridas 8 h mostraron una caída en el número de células con fluorescencia del 10% (Fig. 16-E), hasta llegar a un 100% de mortalidad a las 24 h post-tratamiento donde ya ninguna estructura presenta fluorescencia (Fig. 16-F). Estos resultados sugieren que las ETQ pueden permanecer viables alrededor de las primeras 6 h post-tratamiento, pero la exposición prolongada al H₂O₂ daña su cubierta y puede inducir su muerte a partir de las 8 h.

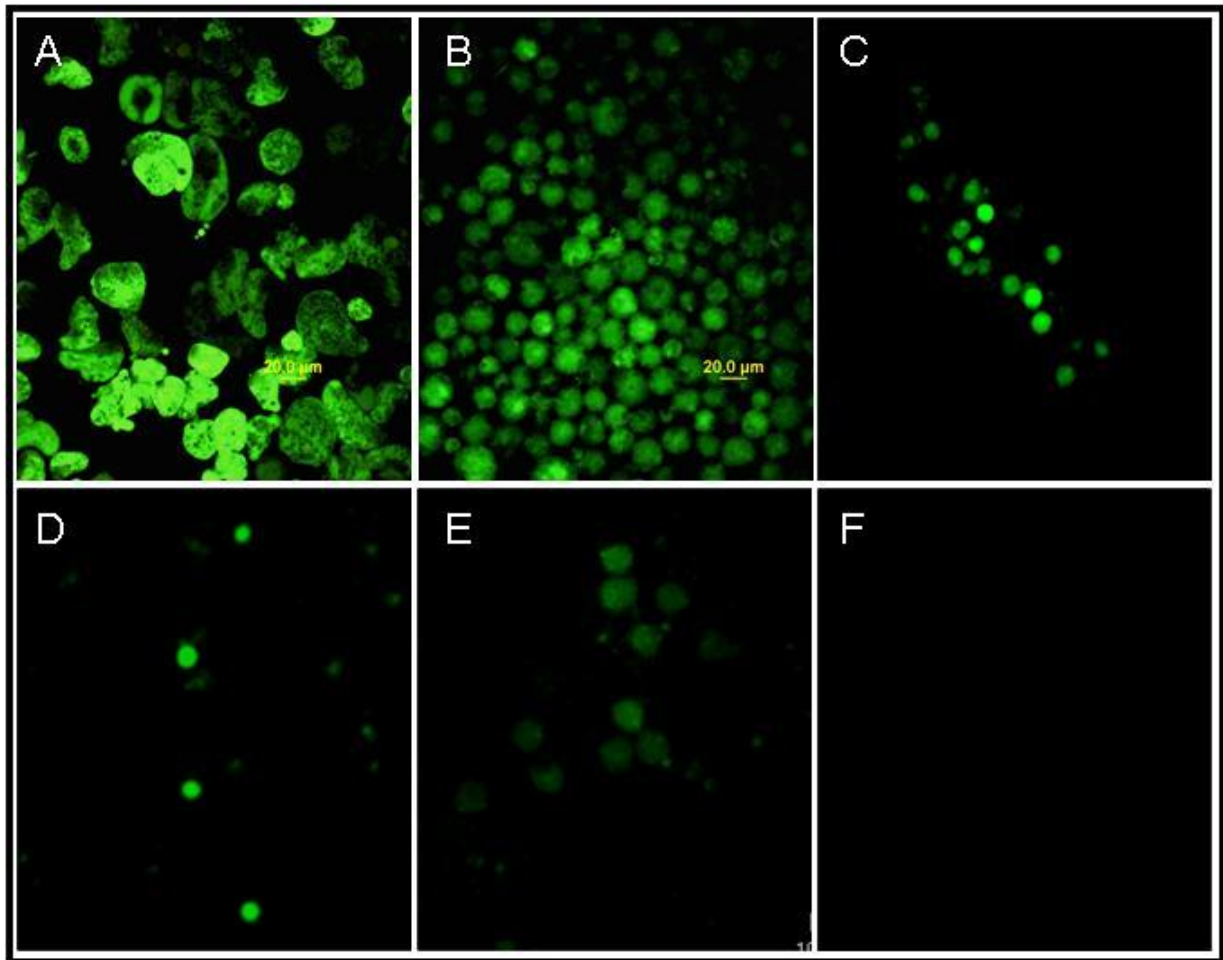


Fig. 16. Ensayo de viabilidad (FDA) en trofozoítos tratados con 4 mM de H₂O₂+ dicationes metálicos.

A) Trofozoítos sin tratar (control); **B)** 2 h; **C)** 4 h; **D)** 6 h; **E)** 8 h y **F)** 24 h.

3. Microscopia electrónica de transmisión

La determinación del número de núcleos se realizó mediante cortes de trofozoítos tratados con 4 mM de H₂O₂ más dicaciones metálicos durante 6 h. Estos resultados mostraron multinucleación de las ETQ con dos, tres y hasta cuatro núcleos (Fig. 17-B, C y D). Las cuantificaciones celulares revelaron un 35% de células binucleadas (Fig. 17-B) y 15% de células con tres núcleos (Fig. 17-C). Por su parte, el porcentaje de células tetranucleadas fue de 5% del total de la población celular (Fig. 17-D). Estos porcentajes contrastan con los obtenidos en los medios de cultivo de trofozoítos sin tratar utilizados como controles (Fig. 17-A), donde se encontró solamente un 5% de células binucleadas. Así mismo, se puede notar un aumento en el número de las vacuolas en las células multinucleadas. Estas vacuolas citoplasmáticas se ubican en su mayoría en las regiones adyacentes a la membrana celular (Fig. 17-B, C y D) y probablemente contengan material que está siendo transportado hacia la periferia para la síntesis de la pared. Por otra parte, las secciones de las ETQ con dos y tres núcleos muestran la presencia de posibles cuerpos cromatoides (Fig. 17-B y C, flechas blancas) que es un rasgo característico de un quiste inmaduro de *E. histolytica*. Este hallazgo contrasta con lo mostrado en las células tetranucleadas donde probablemente por su nivel de transformación (casi maduro), no se encuentran presentes los cuerpos cromatoides (Fig. 17-D).

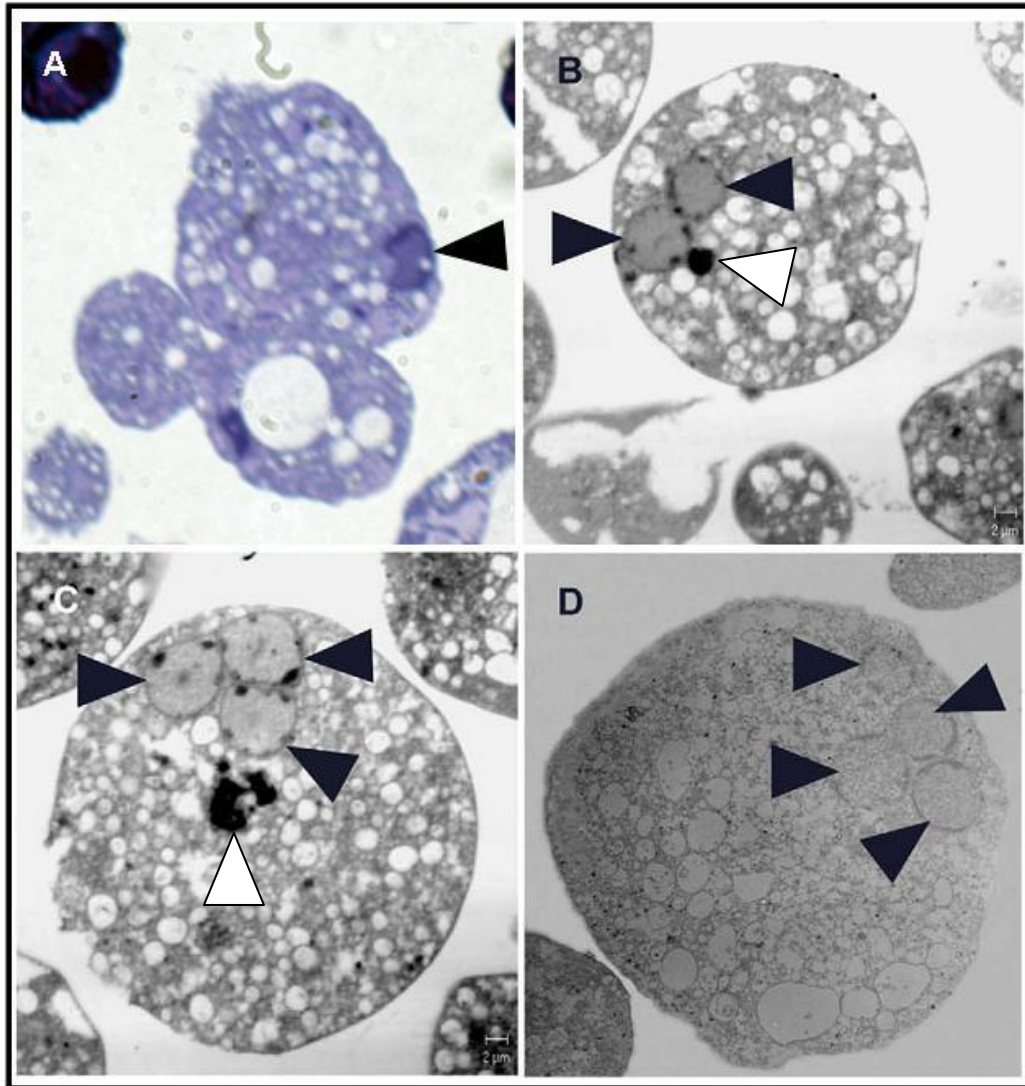


Fig. 17. Secciones de trofozoítos tratados con 4 mM de H₂O₂ + dicationes metálicos durante 6 h. A: Trofozoíto sin tratar (CTR); B, C, y D: ETQ con 2, 3 y 4 núcleos respectivamente. Las Flechas negras indican los núcleos y las blancas los posibles cuerpos cromatoides.

4. Microscopía electrónica de barrido

La morfología externa de las estructuras obtenidas después del tratamiento H₂O₂ más dicationes metálicos (ETQ) se realizó mediante microscopía electrónica de barrido. Los resultados de las observaciones mostraron que las ETQ poseen forma esférica y un tamaño que va de 10 a 20 μm (Fig. 18-C, D y E) muy semejante en forma y tamaño a un quiste maduro de *E. histolytica*, obtenido de muestras clínicas positivas a la infección (Fig. 18-B). Por otra parte, los trofozoítos no

tratados utilizados como controles, presentaron forma clásica ameboide con un tamaño aproximado de 40 μm , (casi lo doble de tamaño que las ETQ) y con presencia de proyecciones citoplasmáticas similares a las de un pseudópodo (Fig. 18-A). Estas proyecciones un ninguno de los casos se encontró presente en las ETQ (Fig. 18-B, C y D). La amplificación de un hoyo presente en la superficie de una ETQ, nos permite observar la presencia de un red de fibras sobrelapadas similares en tamaño y forma a las fibras de quitina presente los exoesqueletos de algunos insectos y crustáceos (Fig. 18-E imagen ampliada en el recuadro). Este hallazgo apoya la idea de que está pared rígida presente en las ETQ esta formada por polímeros de quitina.

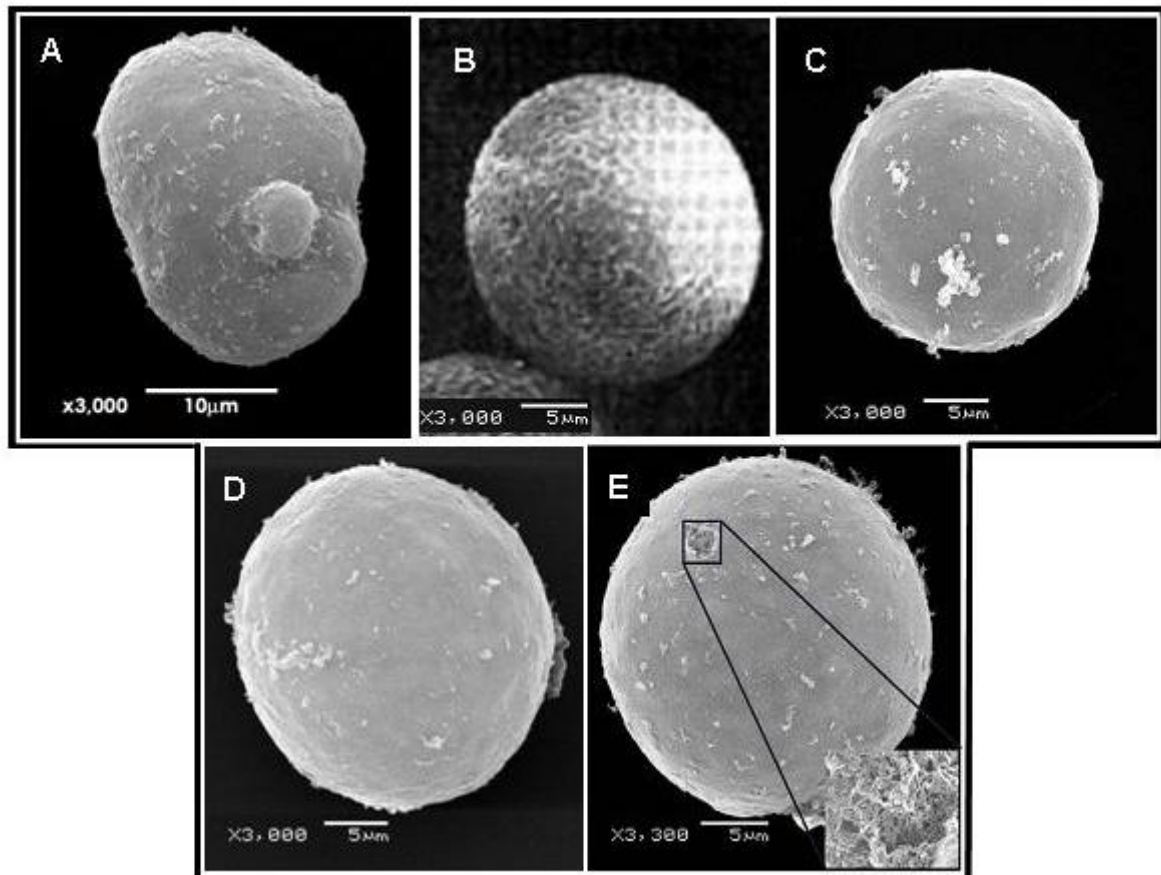


Fig. 18. Microscopía electrónica de barrido. a) Trofozoíto sin tratar (CTR); b) Quiste de *Entamoeba histolytica*; c, d, e y f) Trofozoíto tratado con 4 mM de H_2O_2 + dicationes metálicos durante 6 h. El recuadro muestra el aumento en un hoyo presente en la superficie de una ETQ, donde se observa la presencia de una red de fibras sobrelapadas similares a las fibras que conforman la quitina.

5. Determinación de la presencia de quitina

Tinción con calcoflúor blanco. La determinación de quitina en las ETQ se realizó mediante el uso de una sal disódica llamada calcoflúor blanco, compuesto capaz de unirse a los polisacáridos con enlace β 1-3 y β 1-4 como la quitina y la celulosa y producir fluorescencia. La observación de las ETQ teñidas con este colorante bajo microscopia con luz UV, mostró una intensa emisión de fluorescencia blanco-azulada distribuida a lo largo de toda su superficie, incluso en algunos casos se puede observar dentro de las estructuras (Fig. 19-C). El mismo patrón de emisión lo presentaron los quistes de *E. histolytica* que fueron utilizados como controles positivos (Fig. 19-D). Por el contrario, los trofozoítos sin tratamiento (controles negativos) mezclados con las ETQ y teñidos con el mismo colorante no mostraron ningún tipo de fluorescencia (Fig. 19-A y B), lo que indicó la ausencia de quitina en estas células. Los mayores índices de fluorescencia se encontraron en los tratamientos con la solución de 4 mM de H_2O_2 durante 6 h (Fig. 19-C) corroborando los resultados obtenidos en los índices de resistencia a los diversos detergentes (ver arriba).

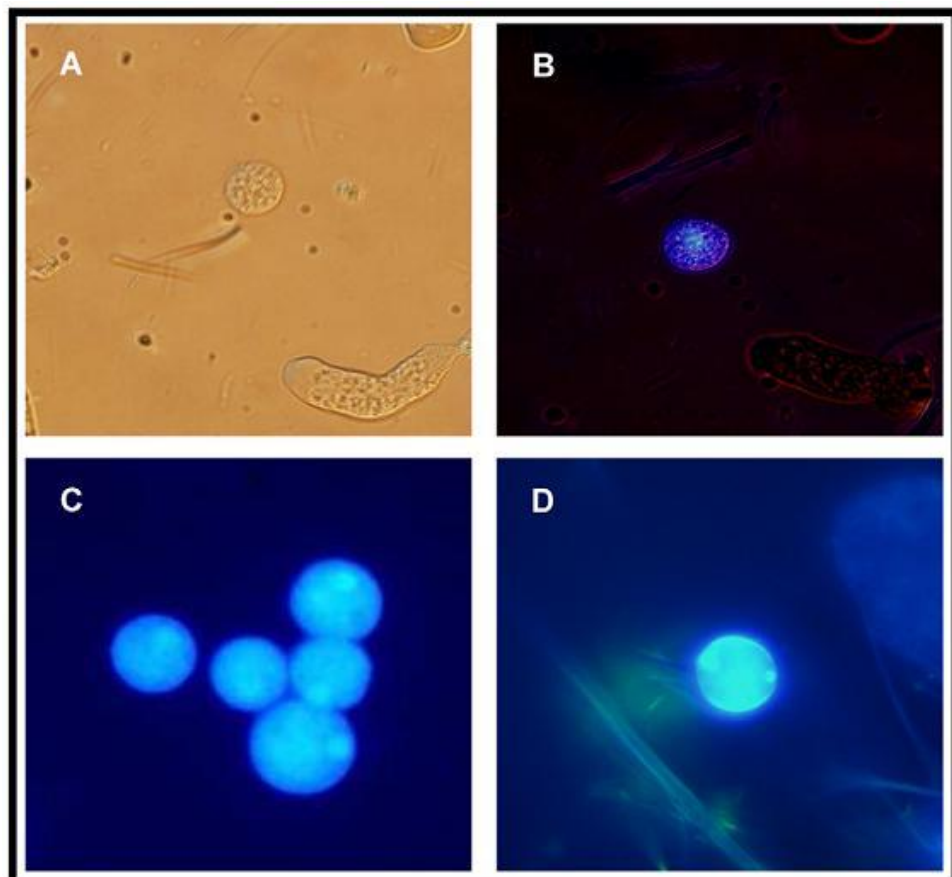


Fig. 19. Trofozoítos de *E. histolytica* teñidos con calcoflúor blanco después del tratamiento con 4 mM de H₂O₂ + dicationes metálicos durante 6 h. A y B: mezcla de trofozoítos y ETQ, teñidos con calcoflúor blanco (microscopia de luz y U.V. respectivamente); C y D: ETQ y quiste maduro de *E. histolytica*, teñidos con calcoflúor blanco bajo luz U.V.

Ensayos de unión a la Aglutinina del Gérmen de Trigo (WGA). La evaluación de la presencia de quitina en las ETQ se realizó mediante un ensayo de unión a WGA, una lectina que posee alta afinidad por los polímeros de N-acetil-glucosamina que forman a la quitina. Los resultados mostraron la presencia de un aumento en la cantidad de polímeros de GlnNAC en los extractos obtenidos a partir de las ETQ en un orden de 20X en comparación con los extractos obtenidos en los trofozoítos sin tratar utilizados como controles. Los análisis estadísticos de los valores de densidad óptica de controles (blanco), trofozoítos sin tratar y de las ETQ (ver método), mostraron diferencias altamente significativas ($p=0.000001 < 0.05$, Mann-Whitney U Test, Statística V6) (Fig. 20). Estos resultados son complementarios a los realizados con el calcoflúor blanco con los que también se demostró la presencia de quitina en la superficie de las ETQ.

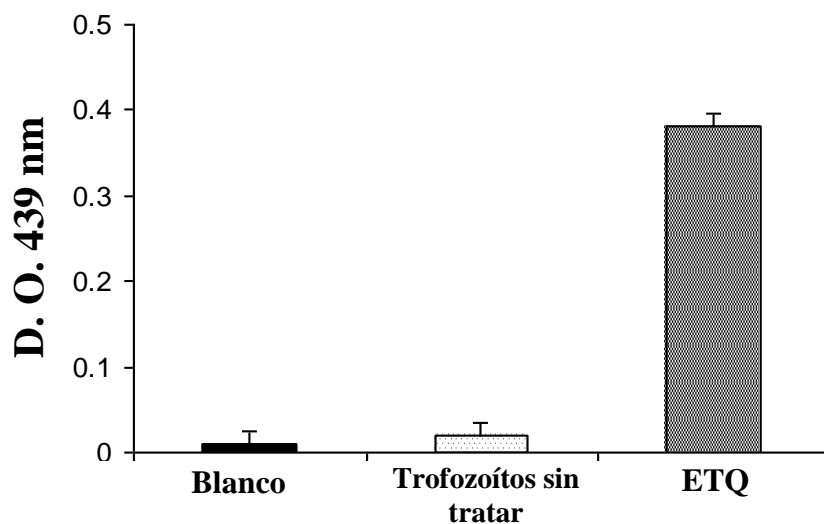


Fig. 20. Determinación de la presencia de quitina en las ETQ mediante el ensayo de unión a la aglutinina del gérmen de trigo (WGA). Control sin muestras biológicas (Blanco); extractos de trofozoítos sin tratar; ETQ; extractos de trofozoítos tratados con 4 mM de H₂O₂ + dicationes metálicos durante 6 h; ($p=0.000001 < 0.05$ Mann-Whitney U Test, Statística V6).

6. Determinación del papel de los dicaciones metálicos en la formación de ETQ

Los dos ensayos utilizados para determinar el papel de los dicaciones metálicos en la formación de las ETQ, no mostraron cambios morfológicos que sugieran la formación de una estructura tipo quiste. En ambos ensayos donde las incubaciones se realizaron con la solución de tratamiento (sin H₂O₂) y la solución stock con trazas de dicaciones metálicos, un 60% de las células presentaron un incremento en el número de vacuolas citoplasmáticas, pero con ausencia de las características previamente descritas para las ETQ (multinucleación, presencia de quitina, forma redonda, disminución en tamaño etc.) (Fig. 21). Por otra parte, las incubaciones con los detergentes SDS y Sarcosil al 0.5% durante 10 min lisaron el 100% de las células tratadas con ambas soluciones, por esta razón ya no se pudieron realizar las observaciones y análisis posteriores.



Fig. 21. Determinación del papel de los dicaciones metálicos en la formación de ETQ. A) Controles (trofozoítos sin tratamiento); B) Trofozoítos incubados con 20 µl de solución de tratamiento sin H₂O₂ durante 6 h (sólo trazas de dicaciones metálicos); C) Trofozoítos tratados con 20 µl de solución stock de trazas de dicaciones metálicos durante 6 h (ver materiales y métodos).

7. Evaluación de la expresión de la Gln6Pi

Los productos de PCR obtenidos a partir de la amplificación del gen de la Gln6Pi de *E. histolytica*, mostraron amplicones de aproximadamente 2019 pb que corresponde al peso esperado (Fig. 22, carril-1). La determinación del nivel de expresión de la Gln6Pi en trofozoítos de *E.*

histolytica se realizó mediante ensayos de RT-PCR, utilizando los oligonucleótidos específicos previamente descritos (Tabla 2). Los resultados de este ensayo mostraron una banda de aproximadamente 2019 pb similar a los amplicones obtenidos por PCR (Fig. 22, carril-2). Estos resultados nos indican que el ARNm de la Gln6Pi tiene una expresión basal en los trofozoítos que no recibieron tratamiento con el H₂O₂ más los dicaciones metálicos.

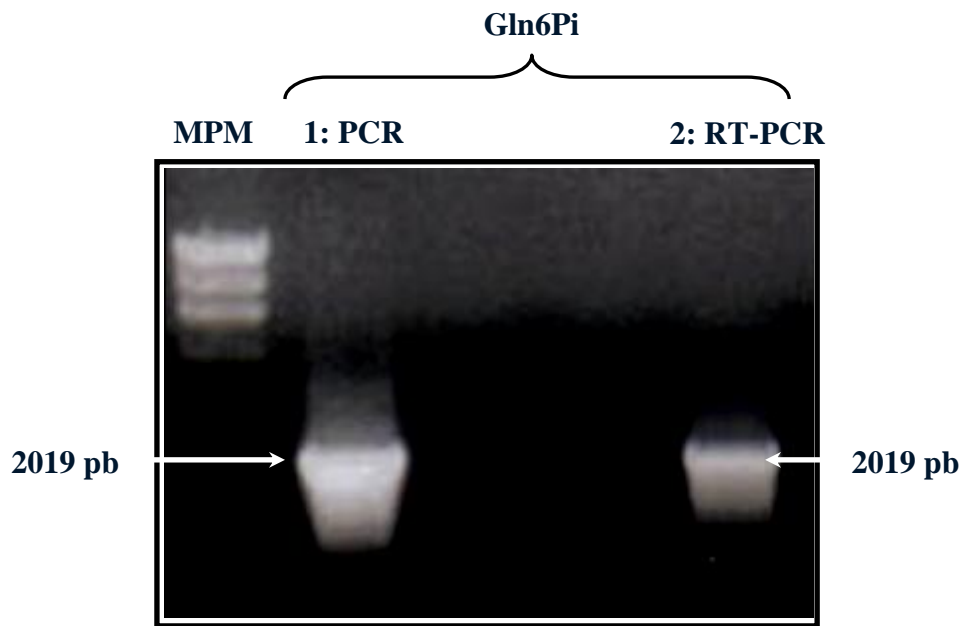


Fig. 22. Determinación de los niveles de expresión de la Gln6Pi en trofozoítos de *E. histolytica* (RT-PCR). MPM: marcadores de pesos moleculares; Carril-1: PCR Gln6Pi; Carril-2: RT-PCR Gln6Pi.

Por otra parte se realizó la evaluación de la expresión del ARNm del gen de la Gln6Pi, mediante ensayos de RT-PCR a partir de ARN total obtenido de las ETQ (trofozoítos tratados con H₂O₂ y dicaciones metálicos). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación fueron los anteriormente descritos (Tabla 2). Los resultados mostraron expresión basal en los controles (trofozoítos sin tratamiento) como previamente se había demostrado (Fig. 23-a). Interesantemente la expresión del ARNm de la Gln6Pi en las ETQ (Fig 23-c), se observa mucho más elevada respecto al mensajero presente, tanto en los controles como en los quistes de *E. histolytica* (Fig. 23).

Los análisis semicuantitativos por densitometría realizados a partir de estos resultados, mostraron un incremento del ARNm del gen de la Gln6Pi (sobre-expresión) aproximadamente de

25X en las ETQ respecto a los trofozoítos no tratados (Fig. 23-c y a). En tanto, los niveles de ARNm de los quistes de *E. histolytica* se incrementó 7X en comparación con trofozoítos no tratados (Fig. 23-b y a). Los resultados de este análisis se resumen en la Tabla 5.

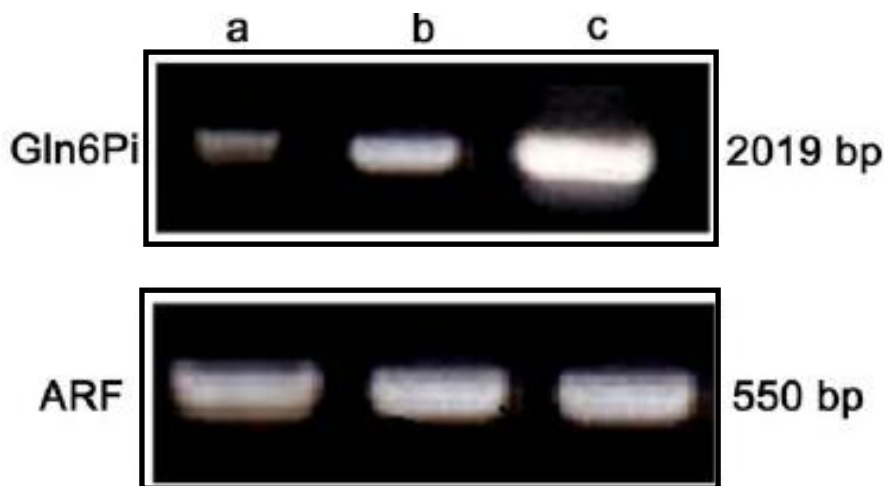


Fig 23. Evaluación de los niveles de expresión de la Gln6Pi de trofozoítos de *E. histolytica* tratados con H₂O₂ más dicaciones metálicos (ETQ). a) Trofozoítos no tratados; b) quistes maduros de *E. histolytica* obtenidos de pacientes positivos a la infección; c) trofozoítos tratados con 4 mM de H₂O₂ más trazas de dicaciones metálicos durante 6 h (ETQ). En el panel de debajo de muestra el control de carga constitutivo ARF (factor de ribosilación dependiente de ADP).

Tabla 5. Análisis densitométrico de la expresión del ARNm de la Gln6Pi de *E. histolytica* en trofozoítos tratados con 4 mM de H₂O₂ + dicaciones metálicos durante 6h, comparado con la expresión en quistes y trofozoítos no tratados.

ARNm (Gln6Pi)	Valores (densidad óptica)	Abundancia Relativa
ETQ	11.75	25X
Quistes (<i>E. histolytica</i>)	3.29	7X
Trofozoítos no tratados	0.47	1X

Este hallazgo sugiere que las ETQ podrían estar representando un estadio de conversión intermedio donde la formación de *novo* de la pared y de los polímeros de N-acetil-glucosamina, requieren de una elevada expresión de la enzima que paulatinamente decrece cuando el quiste está totalmente formado. El gen del factor de ribosilación dependiente de ADP (ARF) utilizado como control constitutivo y de carga, fue similar para las tres condiciones (trofozoítos sin tratar, ETQ y quistes). Los amplicones obtenidos presentaron un peso aproximado de 550 pb similar al peso reportado para este gen (Fig. 23, panel de abajo).

8. Ensayos de silenciamiento del gen de la Gln6Pi de *E. histolytica*

Análisis del fenotipo y ensayos de viabilidad. Para la evaluación del fenotipo los trofozoítos interferentes obtenidos a partir de la mezcla de los siARN (5, 10, 20 y 40 µg), las células fueron sometidas al tratamiento con H₂O₂ + dicaciones metálicas como se describió anteriormente (ver material y método). Previamente se realizaron tinciones con CFDA de los trofozoítos interferentes para descartar la posibilidad de que la transfección con los siARN fuera letal para las células. Estos ensayos mostraron fluorescencia en trofozoítos tratados (viabilidad), tanto en las mezclas de siARN como en los que se usaron en forma individual (Fig. 24-A, D y H). Los mejores resultados fueron obtenidos en donde se utilizó la mezcla de los interferentes a 40 µg, ya que morfológicamente la mayoría de los trofozoítos no presentaron características encontradas en las ETQ. Así mismo se observó una disminución en el índice de conversión (resistencia al Sarcosil 0.5%), inversamente proporcional a la concentración de siARN (Tabla 6). Los ensayos de viabilidad con CFDA post-tratamiento (H₂O₂ + dicaciones metálicas), mostraron fluorescencia en las células que resistieron al Sarcosil 0.5% (Fig. 24-C, G y J). La determinación de la presencia de quitina mediante la tinción con calcoflúor blanco solo se presentó en aquellas células con forma redonda (Fig. 24-B, F, I). En los ensayos de interferencia donde se utilizaron los siARN por separado los índices de conversión son muy similares a los controles, lo cual sugiere que el uso de un solo siARN es incapaz de producir silenciamiento en los trofozoítos. Morfológicamente las

células de estos tratamientos no presentan características de una ETQ, manteniendo su forma ameboide y uninucleada, no obstante, un bajo porcentaje presentó forma redonda.

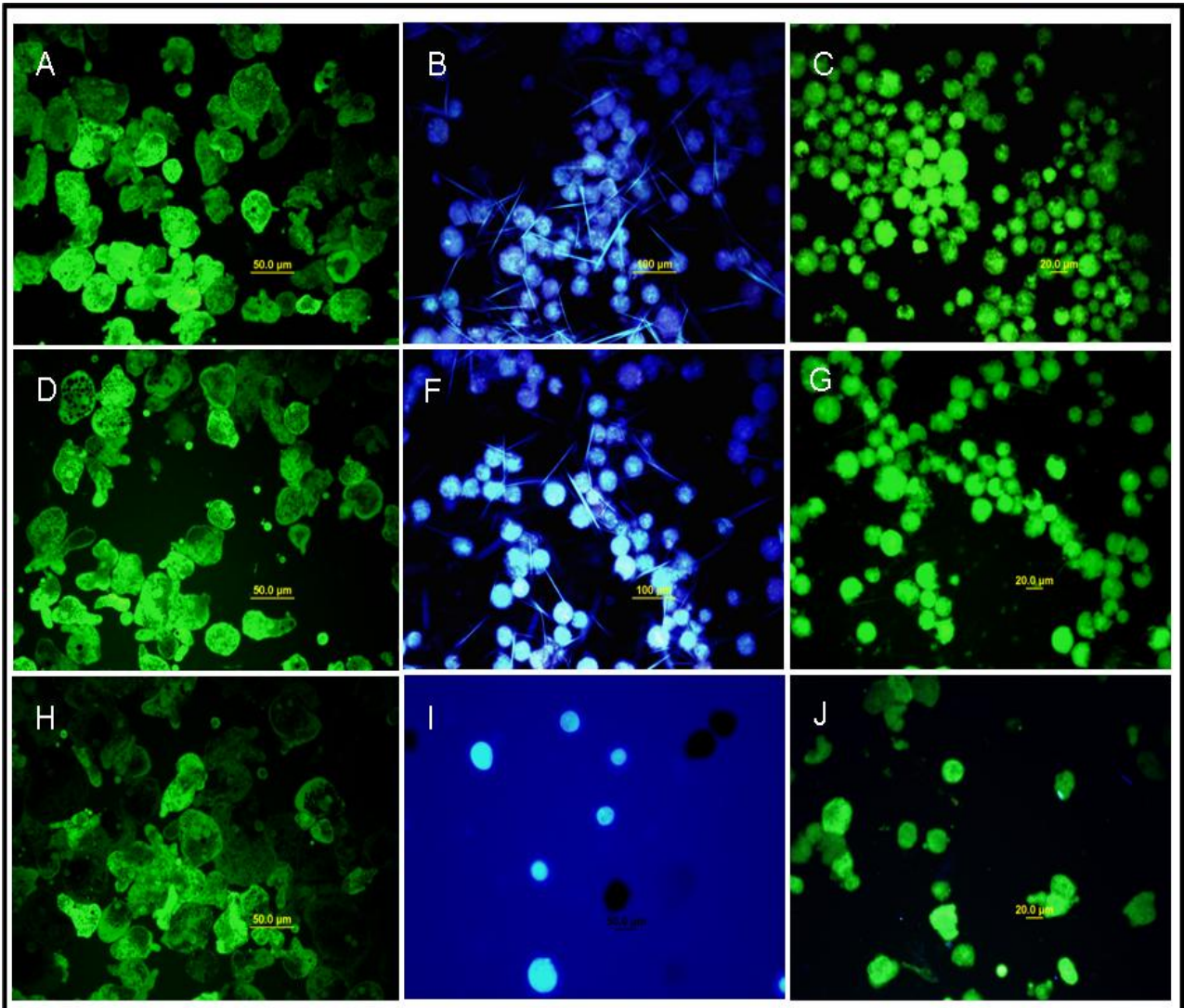


Fig. 24. Análisis del fenotipo de trofozoítos interferentes antes y después del tratamiento con H_2O_2 + dicationes metálicos. Análisis de viabilidad (CFDA) de trofozoítos interferentes antes del tratamiento: A) CTR, D) TI, H) TI-mezcla; tinción con calcoflúor blanco para la determinación de la presencia de quitina: B) CTR, F) TI, I) TI-mezcla; Análisis de viabilidad (CFDA) de trofozoítos interferentes después del tratamiento con H_2O_2 + dicationes metálicos: C) CTR, G) TI, J) TI-mezcla.

CTR= Control (trofozoítos sin tratar)

TI= Trofozoítos interferentes con un solo siARN (40 μ g)

TI-mezcla = Trofozoítos interferentes con mezcla de los dos siARN (40 μ g)

Tabla 6. Análisis del fenotipo de los trofozoítos interferentes (silenciamiento del gen de la Gln6Pi), después del tratamiento con 4 mM de H₂O₂ y dicaciones metálicos durante 6 h.

<i>[siRNA]</i> (mezcla)	<i>Viabilidad Interferentes</i> (CFDA) (% ± D. S.)	<i>Tratamiento</i> (H ₂ O ₂ +Dicaciones metálicos)	<i>Índice de conversión</i> (% ± D. S.)	<i>Viabilidad</i> (CFDA) (% ± D. S.)	<i>Tinción con Calcoflúor</i> (% ± D. S.)
5µg	95 ± 3.6	4mM/6h	27 ± 4.4	69 ± 5	95 ± 2
10µg	91 ± 1.5	4mM/6h	19 ± 5.3	65 ± 4.5	90 ± 8
20µg	90 ± 2.3	4mM/6h	9 ± 3	36 ± 1.1	65 ± 2
40µg	87 ± 3	4mM/6h	5 ± 2.1	12 ± 2.8	15 ± 4.8

8.1 Evaluación la expresión de la Gln6Pi en trofozoítos de *E. histolytica* interferentes

La evaluación de la expresión de la Gln6Pi se realizó mediante ensayos de RT-PCR y western blot. Las reacciones de RT-PCR se realizaron a partir de los trofozoítos interferentes para cada uno de los tratamientos (5, 10, 20, y 40 µg de siARN). Para cada muestra se cargaron 200 ng del producto de RT-PCR al igual que el control de carga (ARF). Los resultados mostraron una disminución en la expresión del mensajero de la Gln6Pi inversamente proporcional a la concentración de siARN. Los mejores niveles de silenciamiento lo mostraron los tratamientos donde se utilizó la mezcla de los siARN a 40 µg. En los análisis densitométricos se observó una disminución en la expresión relativa del ARNm con respecto a los controles (trofozoítos sin tratar y “scrambled-sequence”) que va desde 76% en donde se utilizó 5 µg de la mezcla de los interferentes, hasta un 16% donde se utilizaron 40 µg (Fig. 25). El nivel de expresión del ARNm del gen de la Gln6Pi donde se utilizaron los siARN por separado (Si 154-Gln6Pi y Si 229-Gln6Pi), mostró un menor nivel de silenciamiento en comparación con los ensayos donde se utilizó la mezcla de los interferentes (Fig. 26 y 27). Esta disminución podría estar directamente relacionada con el bajo índice de conversión obtenido (Tabla 6). A pesar de esta disminución el siARN (Si

154-Gln6Pi), mostró el mejor índice de silenciamiento en estos ensayos. Los análisis densitométricos mostraron un silenciamiento que va de un 85% (5 μ g) hasta un 26% (40 μ g) respecto a los controles (Fig. 26). En cambio el siARN (Si 229-Gln6Pi) mostró una disminución de la expresión del ARNm de un 96% (5 μ g) hasta un 57% en donde se utilizaron 40 μ g del interferente (Fig. 27). En todos los ensayos el control de carga (constitutivo) (ARF) mostró una expresión similar en todos los tratamientos (Fig. 25, 26 y 27).

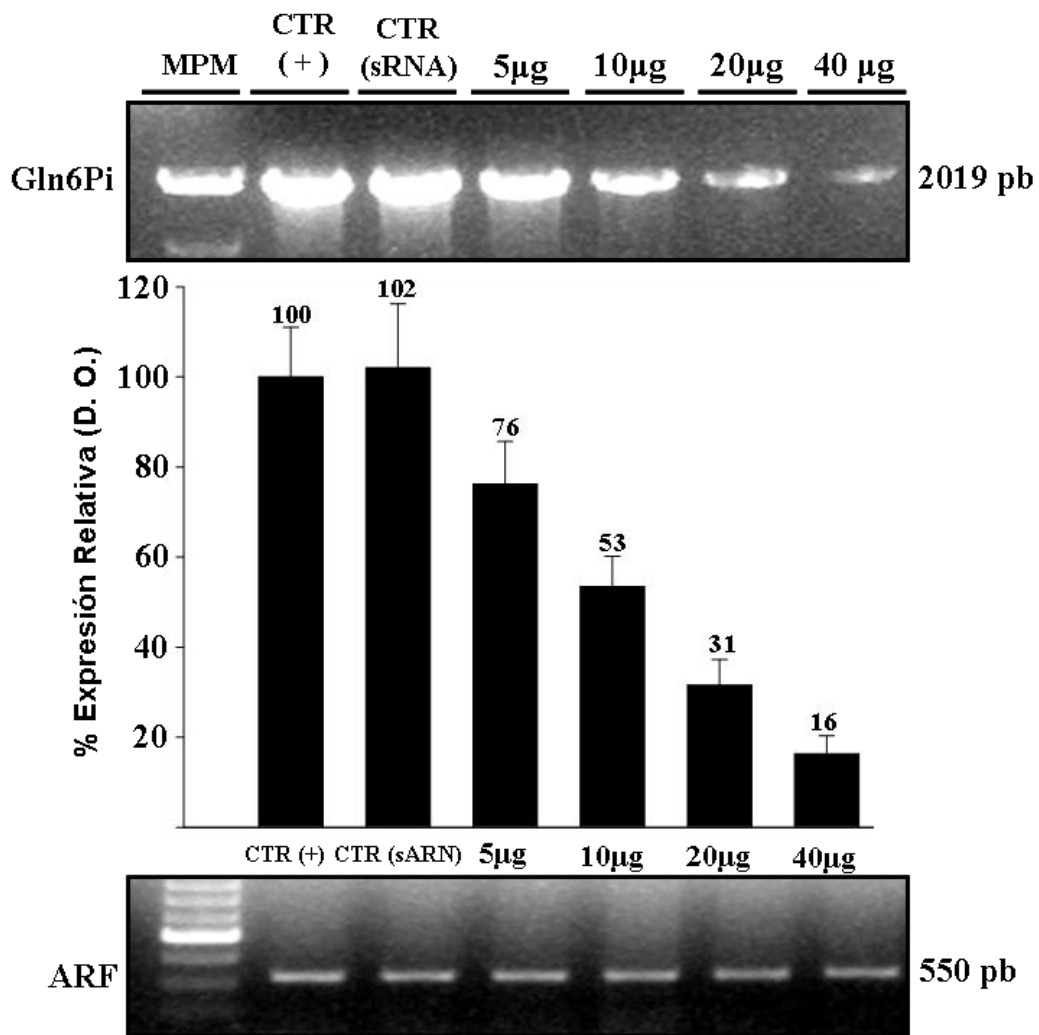


Fig. 25. Análisis de la expresión del gen de la Gln6Pi de *E. histolytica* por RT-PCR en trofozoítos transfectados con mezcla de siARN (Si 154-Gln6Pi y Si 229-Gln6Pi). Concentraciones de la mezcla de siARN (5, 10, 20 y 40 μ g). MPM: marcador de peso molecular; CTR (+): trofozoítos sin siRNA; CTR (sRNA): trofozoítos transfectados con “scrambled-sequence” (siRNA-A:sc-37007). Control de carga:

ARF (Factor de Ribosilación Dependiente de ADP). En todos los pozos se cargaron 200 ng del producto de RT-PCR.

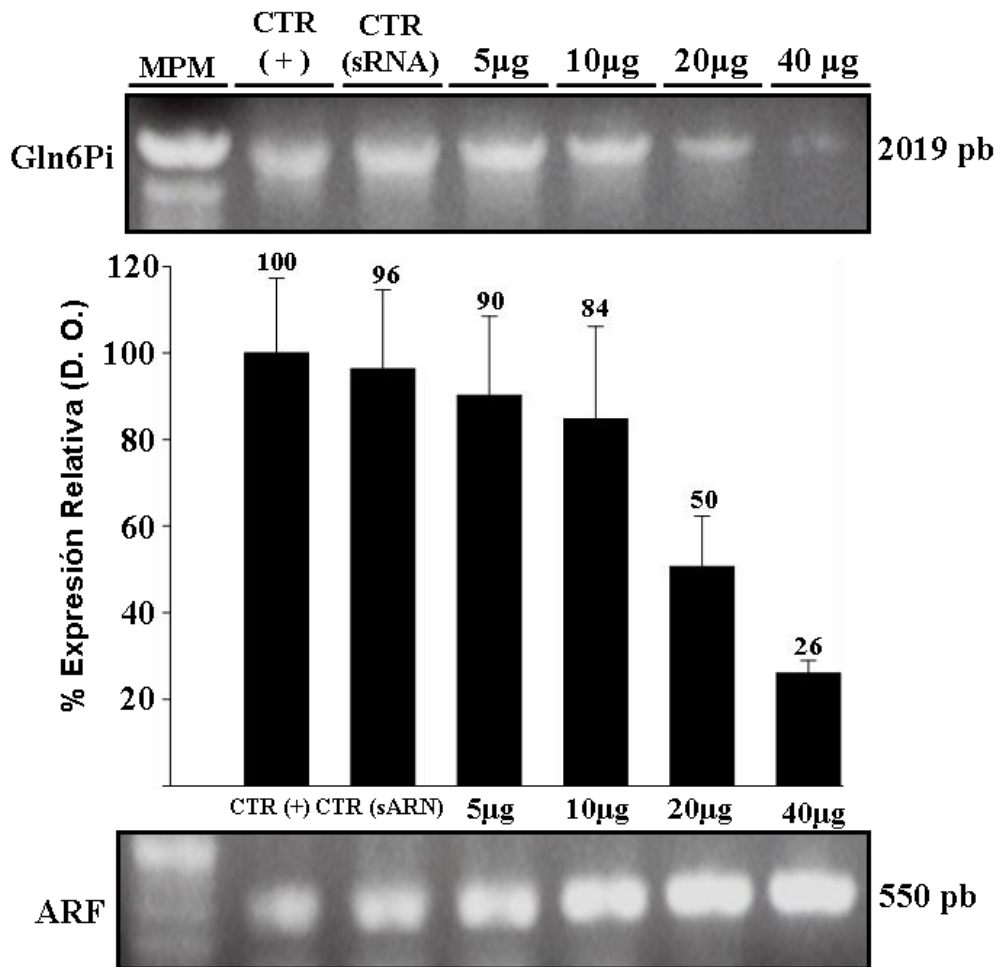


Fig. 26. Análisis de la expresión del gen de la Gln6Pi de *E. histolytica* por RT-PCR en trofozoítos transfectados con siARN (Si 154-Gln6Pi). Concentraciones del siARN (5, 10, 20 y 40 µg). MPM: marcador de peso molecular; CTR (+): trofozoítos sin siRNA; CTR (sRNA): trofozoítos transfectados con “scrambled-sequence” (siRNA-A:sc-37007). Control de carga: ARF (Factor de Ribosilación Dependiente de ADP). En todos los pozos se cargaron 200 ng del producto de RT-PCR.

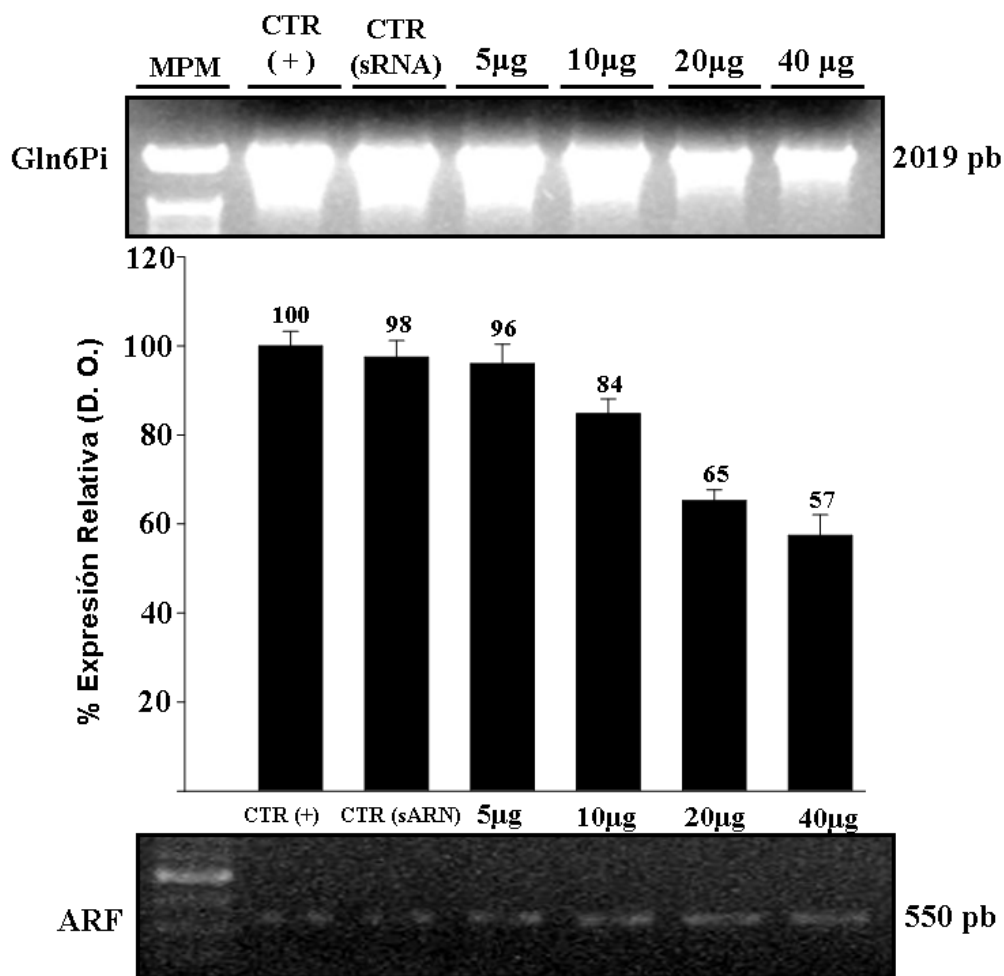


Fig. 27. Análisis de la expresión del gen de la Gln6Pi de *E. histolytica* por RT-PCR, en trofozoítos transfectados con siARN (Si 229-Gln6Pi). Concentraciones del siARN (5, 10, 20 y 40 µg). MPM: marcador de peso molecular; CTR (+): trofozoítos sin siRNA; CTR (sRNA): trofozoítos transfectados con “scrambled-sequence” (siRNA-A:sc-37007). Control de carga: ARF (Factor de Ribosilación Dependiente de ADP). En todos los pozos se cargaron 200 ng del producto de RT-PCR.

Para continuar con la evaluación de la expresión de la Gln6Pi se realizaron ensayos de western blot. Para este ensayo se corrieron 15 µg de los extractos proteicos de trofozoítos interferentes transfectados con la mezcla de siARN (5, 10, 20 y 40 µg). Los corrimientos se realizaron en geles de poliacrilamida al 10%. Los análisis realizados a partir del western blot, mostraron que la expresión relativa de la Gln6Pi disminuye inversamente proporcional a la concentración de los siARN mezclados (5, 10, 20 y 40 µg) (Fig. 28). Los análisis densitométricos

mostraron una disminución en la expresión relativa de la Gln6Pi en aquellos trofozoítos tratados con los dos interferentes (Si 154-Gln6Pi y Si 229-Gln6Pi). Esta disminución comparada con los controles (trofozoítos sin tratar y “scrambled-sequence”) va de un 57% en los ensayos donde se utilizaron 5 μg de la mezcla de los interferentes, hasta un 0.1% en donde se utilizaron 40 μg de la mezcla (Fig. 28). Estos resultados son complementarios a los obtenidos en los ensayos de RT-PCR y sugieren que la transfección de los trofozoítos de *E. histolytica* con los siARN mezclados produce un “knock-down” en la expresión del gen de la Gln6Pi tanto a nivel de ARNm, como del producto proteico.

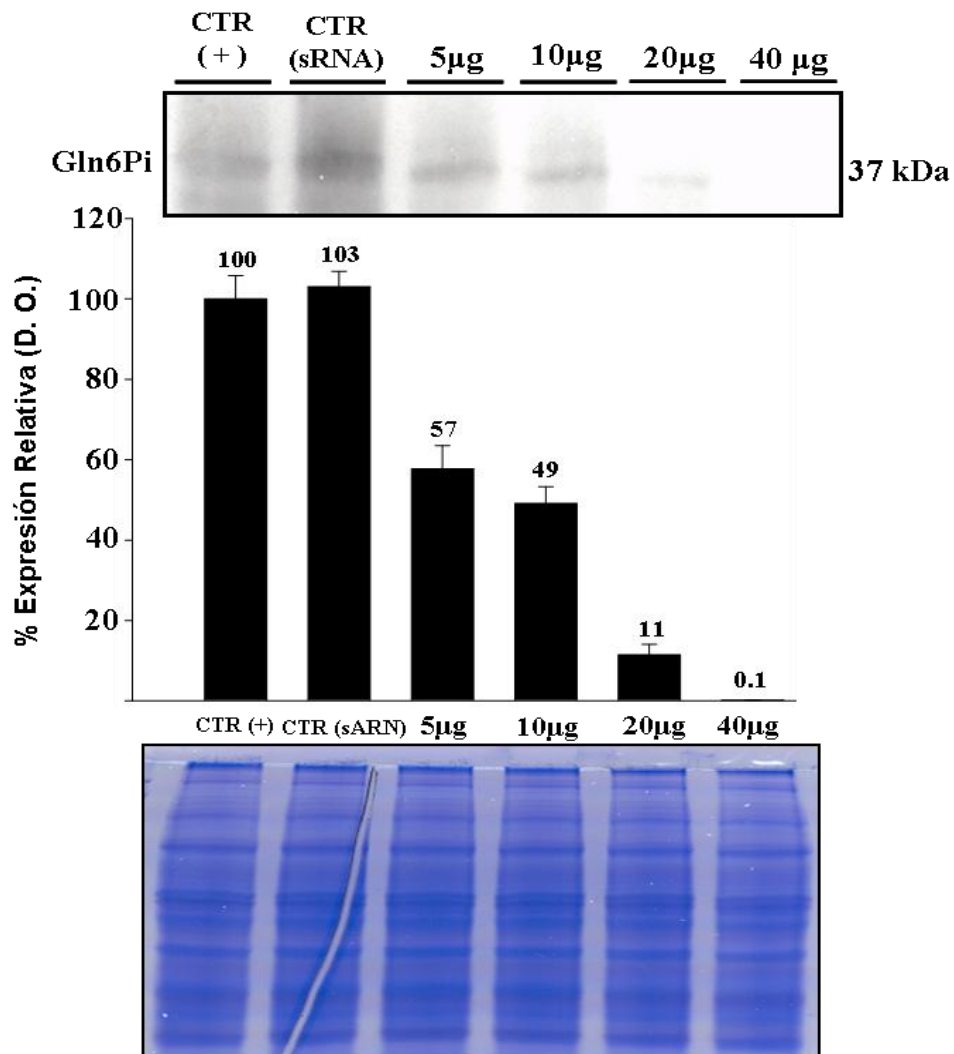


Fig. 28. Análisis de la expresión de la Gln6Pi de *E. histolytica* por western blot, en trofozoítos transfectados con mezcla de siARN (Si 154-Gln6Pi y Si 229-Gln6Pi). Concentraciones de la mezcla de siARN (5, 10, 20 y 40 μg). MPM: marcador de peso molecular; CTR (+): trofozoítos sin siRNA; CTR

(sRNA): trofozoítos transfectados con “scrambled-sequence” (siRNA-A:sc-37007). Control de carga: gel teñido con azul de Coomassie. En todos los pozos se cargaron 15 µg de proteínas totales de los diferentes tratamientos.

9. Ensayos de enquistamiento con otros generadores de estrés oxidativo (Menadiona)

Los trofozoítos tratados con menadiona a 0.5 mM y 0.8 mM incubados durante 2, 4, 6 y 24 h, mostraron algunas alteraciones morfológicas como el aumento en el tamaño y el incremento en el número de vacuolas, sin embargo, no hay presencia de características similares a las de un quiste y/o a las de una ETQ (Fig. 29). El tratamiento con los diversos detergentes (PBS más Sarcosil 0.5%, Tritón X-100 0.5% ó SDS 0.5%), lisaron el 100% de las células incubadas con 0.5 mM y 0.8 mM de menadiona. Interesantemente algunos trofozoítos presentaron fluorescencia después de haber sido teñidos con calcoflúor blanco, no obstante como ya se mencionó, en ninguno de los casos se presentaron características similares a las ETQ (tratamiento con H₂O₂ + dicationes metálicos). Por último, los trofozoítos que fueron tratados a concentraciones mayores a 1 mM mostraron una mortalidad del 100% después de 4 h post-tratamiento, lo que prueba la toxicidad de la menadiona sobre estas células.

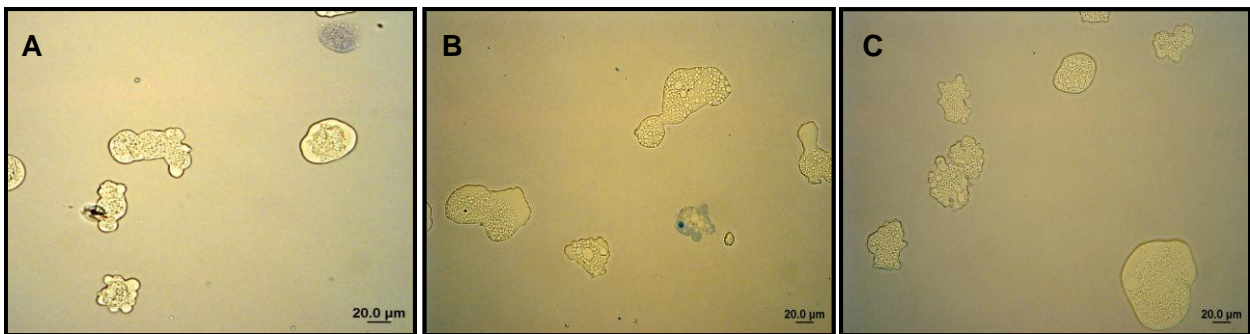


Fig. 29. Ensayo con otros generadores de estrés oxidativo (Menadiona). A) Controles (trofozoítos sin tratamiento); B) Trofozoítos tratados con 0.5 mM de menadiona durante 6 h; C) trofozoítos tratados con 0.8 mM de menadiona durante 8 h.

10. Ensayos de desenquistamiento en medio de Robinson

Las observaciones por microscopía de luz realizadas 24 h post-siembra (ETQ en medio Robinson bifásico), mostraron la presencia de trofozoítos con posibles proyecciones citoplasmáticas similares a pseudópodos (Fig. 30). Este hallazgo sugiere un posible proceso de desenquistamiento de las ETQ o en su defecto la reversibilidad del proceso de formación del quiste. Así mismo, estos resultados corroboran la viabilidad de las ETQ después del tratamiento con H_2O_2 + dicationes metálicos corroborando lo obtenido con el CFDA.

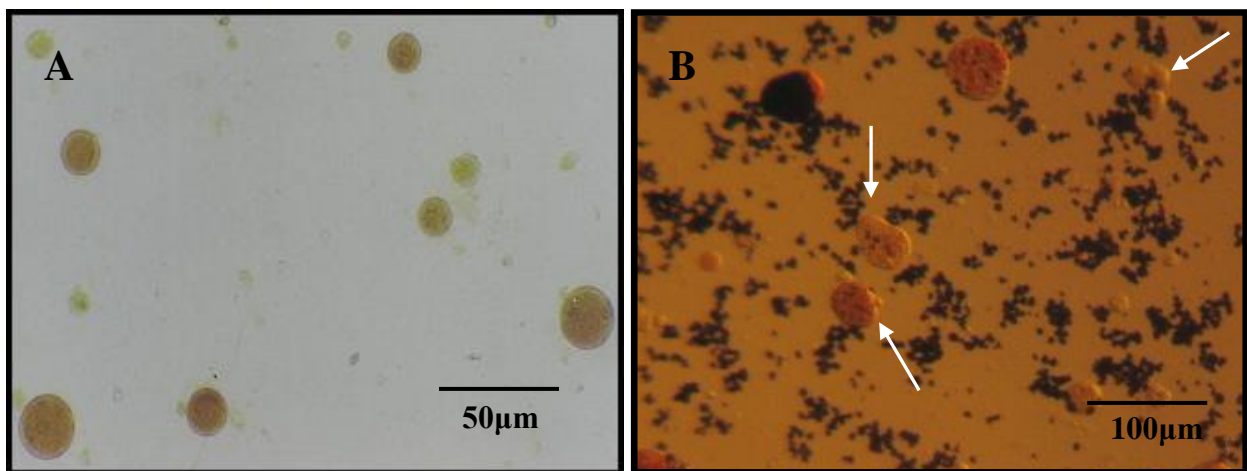


Fig. 30. A) Tinción con Lugol de ETQ tratadas 6 h con 4mM de H_2O_2 + dicationes metálicos. B) ETQ-trofozoítos en medio de cultivo Robinson bifásico 24 h post-siembra teñidos con Lugol (microscopía de luz). Las flechas indican las posibles proyecciones citoplasmáticas de los trofozoítos.

IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Actualmente no existe un método reproducible *in vitro* ni *in vivo* para la obtención de quistes maduros de *E. histolytica*. Entre los múltiples factores luminales involucrados en el proceso de enquistamiento, la exposición de los trofozoítos a diversas especies reactivas de oxígeno no ha sido estudiada. Existen algunos reportes donde se describe que la presencia de altas concentraciones de compuestos oxidantes en el lumen intestinal son producto de los múltiples procesos digestivos, la actividad de la microbiota (metabolismo bacteriano), el infiltrado de las células de la respuesta inmune (neutrófilos y macrófagos) e inclusive los propios enterocitos del epitelio intestinal que bajo ciertas condiciones son capaces de producir H₂O₂ (Nathan 1987, Jourdeuil 1997, Halliwell 2001). Desde que los trofozoítos son liberados del quiste y colonizan la mucosa activando el proceso inflamatorio, los parásitos son expuestos a una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROI's). Conforme los trofozoítos viajan a través del colon ascendente al descendente (lugar donde se lleva a cabo el enquistamiento), la tensión de oxígeno incrementa, favoreciendo así la formación de ROI's que provocan un aumento en el estrés oxidativo (Mirelman 1988, Eichinger 2001). En relación a lo anterior, en otros modelos de enquistamiento el estrés oxidativo se ha sugerido como el estímulo inicial de diferenciación (*G. lamblia*) (Luján 1997) y en otros organismos incluyendo hongos y células osteoblásticas, se ha demostrado que el H₂O₂ es capaz de inducir diferenciación celular (Belozerskaia y Szymczyk 2006, Menon 2007). Nuestros experimentos muestran que después de la adición de pequeñas cantidades de H₂O₂ en combinación con trazas de algunos dicatiónes metálicos en medios de cultivo, los trofozoítos de *E. histolytica* se transforman en estructuras redondas, multinucleadas y resistentes al tratamiento con diversos detergentes (ETQ). Los niveles máximos de conversión (30%), fueron obtenidos cuando los trofozoítos se incubaron por 6 h en presencia de 4 mM de H₂O₂ más 10⁻¹⁰ trazas de dicatiónes metálicos. Muchas de las estructuras obtenidas presentan multinucleación, aproximadamente 50% muestran de 2 a 3 núcleos. Interesantemente arriba del 5% de estas células son tetranucleadas,

rasgo característico de un quiste maduro de *E. histolytica* y que es inusual en cultivos *in vitro* de trofozoítos (Clark 2000, Mukherjee 2008). A la fecha no existen reportes en la literatura de algún tratamiento que pueda producir ETQ tetranucleadas. No obstante, nuestros resultados muestran un claro incremento en el número de células polinucleadas y un decremento en el número de células uninucleadas, sugiriendo la inducción de una e incluso dos divisiones nucleares cuando los trofozoítos son expuestos al H₂O₂. El tiempo de obtención de los cuatro núcleos correlaciona con lo reportado por Orozco y cols. que definen la división nuclear como un proceso pleuomitótico, donde cada división se lleva a cabo en aproximadamente 120 minutos en cultivos de trofozoítos sincronizados (Orozco 2004). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que algunas de las estructuras tetranucleadas provengan de una simple división nuclear a partir de una célula binucleada.

Las ETQ obtenidas poseen una cubierta externa gruesa que le confiere resistencia al tratamiento con diversos detergentes, sugiriendo la presencia de una pared rígida. Dos ensayos bioquímicos demostraron que esta pared está constituida por polímeros de N-acetil-glucosamina (quitina), mayor componente del quiste maduro de *E. histolytica* (Arroyo-Begovich 1980 y 1982). La tinción con calcoflúor blanco, colorante que posee la habilidad de unirse específicamente a los polímeros de unión β 1-4 (incluyendo la quitina), reveló intensa fluorescencia en la superficie de las ETQ y en algunos casos dentro de la célula. Esto podría indicar que la quitina es transportada activamente desde el citoplasma de la célula hasta su superficie. Por otra parte, el segundo ensayo con la WGA que también posee la propiedad de unirse específicamente a los polímeros que forman la quitina y que se ha probado se une a las paredes de los quistes de *E. histolytica* y *E. invadens* (Arroyo-Begovich 1980) resultó positivo en las ETQ. Esto corrobora los resultados previos que demuestran la presencia de quitina en las ETQ y sustenta la teoría de que el tratamiento con H₂O₂ más los dicaciones metálicos, es capaz de inducir un proceso de diferenciación del trofozoíto a una estructura de resistencia. Las formas reactivas de oxígeno en conjunción con las trazas de

dicciones metálicos utilizados como cofactores y/o activadores de procesos enzimáticos, probablemente contribuyan a la activación de algunos mecanismos de defensa del hospedero que sirvan como inductores de diferenciación del trofozoíto. Este proceso culmina con la formación de una estructura resistente que posee una pared rígida formada por quitina y que presenta características similares a las de un quiste maduro de *E. histolytica*. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que estas estructuras representen un estadio intermedio entre el trofozoíto y un quiste maduro e infectivo. Una prueba a favor de este supuesto, se muestra en las imágenes de microscopía electrónica de transmisión donde además de la multinucleación, se pueden observar ETQ con pequeños primordios de formación de cuerpos cromatoides, los cuales según algunos autores, solo se encuentran presentes en etapas tempranas y/o en quistes inmaduros. Así mismo, los resultados obtenidos en los ensayos de desenquistamiento en medio de cultivo de Robinson, donde 24 h post-incubación de ETQ (4 mM H₂O₂/ 6 h), observamos la presencia de trofozoítos. Este hallazgo sugiere un posible proceso de desenquistamiento de las ETQ o bien la reversibilidad del proceso de formación del quiste, apoyando la idea de que las ETQ representan una etapa intermedia del enquistamiento. La viabilidad de las ETQ mostró ser dependiente del tiempo de incubación con el H₂O₂ que se prueba consistentemente por la presencia de un metabolismo celular activo que resulta en la conversión de diacetato de fluoresceína a fluoresceína. Sin embargo, el tratamiento con el H₂O₂ resulta ser agresivo y mata a las células en 24 h; no obstante, las estructuras obtenidas a 6 h post-tratamiento (4 mM de H₂O₂) en donde se muestra el índice máximo de conversión se mantienen viables (Tabla 4). Un ensayo de infectividad utilizando las ETQ podría proveer información más fehaciente acerca de la viabilidad, sin embargo, actualmente no existe un modelo animal donde se pueda reproducir la infección natural de *E. histolytica*. Por su parte los ensayos realizados con otro inductor de estrés oxidativo (menadiona), mostró algunas alteraciones morfológicas en los trofozoítos como el incremento en el tamaño y número de vacuolas Sin embargo, no hay presencia de características similares a las de un quiste y/o a las de

una ETQ. Como ya se había mencionado, algunos reportes describen la presencia de altas concentraciones de componentes oxidantes en el lumen del intestino, en este sentido se ha sugerido que el estrés oxidativo es un estímulo presente en la diferenciación de *G. lamblia* (Luján 1997), no obstante, la menadiona al ser un compuesto sintético no se encuentra presente de forma natural en el intestino del humano. Esto podría sugerir que el H₂O₂ presente en el intestino del hospedero, puede ser una de las señales involucradas en el encendido de la ruta metabólica de la formación de los polímeros de N-acetil glucosamina así mismo, los dicaciones metálicos estarían actuando como cofactores enzimáticos produciendo un efecto sinérgico que induce la síntesis de quitina. Apoyando lo encontrado en muchos estudios donde se demuestra que la presencia de algunos dicaciones metálicos como el Mn²⁺, Mg²⁺ y el Co²⁺ son capaces de inducir la formación de material tipo quitina en trofozoítos de *Entamoeba sp.* (Campos-Góngora 1997 y 2000, Said-Fernández 2001). Estos reportes apoyan la idea (como ya se mencionó) de que estos dicaciones sirven como cofactores para la actividad de la Gln6Pi, las quitina sintasas y otras enzimas involucradas en el proceso de enquistamiento (González-Salazar 2000, Campos-Góngora 2004, Karr 2004). Este hallazgo resulta de suma importancia en el conocimiento del enquistamiento, sin embargo, apoyamos la idea de que este proceso naturalmente debe estar controlado por diversos factores que aún permanecen sin esclarecerse.

Nosotros demostramos que el estrés oxidativo mediado por el H₂O₂ en conjunción con algunas trazas de dicaciones metálicos, son capaces de activar la ruta metabólica de la pared del quiste en *E. histolytica*. Estudios recientes en el parásito entérico *G. lamblia*, han reportado un incremento en la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis del quiste, donde la actividad de la Gln6Pi en ambas direcciones de la reacción (aminación/deaminación) aumenta de 13 a 182 veces (Macechko 1992), sugiriendo que esta enzima participa activamente en el inicio del enquistamiento de este parásito (Macechko 1992, Van Keulen 1998, López 2002). La reciente publicación del genoma de *E. histolytica* (Loftus 2005), permitió la identificación de la ruta

biosintética de la quitina que teóricamente sucede en este parásito y que es prácticamente idéntica a la presente en *G. lamblia* (Jarroll 2001). La cascada incluye cinco enzimas donde la Gln6Pi actúa como enzima limitante en el paso inicial de la conversión de la fructuosa 6-fosfato a glucosamina 6-fosfato (Svärd 2002), sirviendo como sustrato para una serie de reacciones que culminan con la formación de los polímeros de GlnNAc que forman la quitina (Loftus 2005). Como parte de la caracterización de esta ruta en la amiba, en este estudio se realizó una estimación de los niveles de expresión de la Gln6Pi en las ETQ, revelando un incremento de 25 veces más comparado con el basal expresado en trofozoítos. Estos resultados sugieren que de manera directa o indirecta, el tratamiento con H₂O₂ más los dicaciones metálicos, es capaz de inducir la sobre-expresión de la Gln6Pi en *E. histolytica*. Para determinar el papel de la Gln6Pi en la formación de las ETQ y en la biosíntesis de la pared de quitina, se realizaron ensayos de silenciamiento mediante ARN de interferencia. Estos ensayos mostraron una correlación directamente proporcional en los índices del “knock-down”, con la pérdida de la capacidad de transformación de los trofozoítos a ETQ. Los mejores resultados se obtuvieron en aquellos experimentos donde se utilizaron los dos siARN mezclados (Si 154-Gln6Pi y Si 229-Gln6Pi), lo cual sugiere un posible efecto sinérgico, ya que cada siARN por separado, aunque producen disminución en la expresión del ARNm de la Gln6Pi, no alcanzan los índices de silenciamiento que producen de manera conjunta. La evaluación del fenotipo de los trofozoítos interferentes (mezcla de siARN), mostró una disminución en el índice de conversión (estructuras que presentan resistencia al Sarcosil 0.5%) y excepto por la forma redonda, los trofozoítos en su mayoría carecen de características similares a las ETQ. Este resultado es consistente con lo reportado por Jarroll y Svärd que proponen a la Gln6Pi como una enzima clave en el proceso del enquistamiento, ya sea por catalizar la primera reacción en la ruta metabólica de la quitina (Jarroll 2001), o bien por ser la enzima limitante en biosíntesis de este polímero (Svärd 2003). En relación, nuestros resultados sugieren que la participación de la Gln6Pi, es crucial en la formación de la pared rígida de las ETQ, demostrando que la regulación de la

expresión de esta enzima podría ser un blanco perfecto para la inhibición del proceso de enquistamiento.

Por otra parte, sabemos que la quitina es uno de los biopolímeros más importantes en la naturaleza ya que ocupa el segundo lugar en abundancia por debajo de la celulosa. Forma parte esencial en las paredes de algunas bacterias, hongos y exoesqueleto de artrópodos como los crustáceos e insectos, así mismo, está presente en las vainas de las microfilarias y huevos de algunos nemátodos y como se mencionó anteriormente, en protozoarios es primordial en la estructura de los quistes (Spindler 1990, Lee 2009). Por tal motivo, el estudio del metabolismo y de las propiedades inmunogénicas de la quitina ha cobrado suma importancia. Actualmente sabemos que la síntesis de la quitina no ocurre en vertebrados, sin embargo, recientemente se ha demostrado la existencia de un grupo de genes de enzimas quitinolíticas presentes en mamíferos (Lee 2009). Recientemente el estudio de la regulación de las enzimas claves del metabolismo y la síntesis de la quitina, ha sido un campo que muchos grupos han retomado en la búsqueda de nuevos blancos para la quimioterapia contra parásitos, así como la generación de nuevos fungicidas e insecticidas (Spindler 1990, Merzendorfer 2003). Al respecto, existe una gran variedad de compuestos que han sido utilizados para bloquear el metabolismo de la quitina, como las polioxinas, inhibidores competitivos de la quitina-sintasa y las nikomicinas análogos del sustrato UDP-N-GlcNAc (Munro 2001). Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la regulación han sido un campo poco estudiado, razón por la cual, el conocimiento de los procesos regulatorios a diferentes niveles resulta de suma importancia para la comprensión de este proceso. Otros estudios se han centrado en evaluar los efectos inmunológicos de la quitina *in vivo* e *in vitro*, demostrando su capacidad para activar macrófagos y otras células del sistema inmune. Esta activación se lleva a cabo por la interacción con diferentes receptores de membrana como el receptor de manosa, receptor tipo toll-2 (TLR-2), receptor de lectina tipo C (Dectina-1) y receptor

de leucotrieno B4 (BLT1). Además se evaluó la capacidad de la quitina y sus derivados (como el quitosano) de modular la inflamación alérgica adaptativa tipo 2 (Lee 2009).

Este trabajo se centro en el diseño de un ensayo reproducible que permite la obtención de estructuras que presentan características similares a las de un quiste maduro de *E. histolytica*. Se demuestra que dentro de los estímulos involucrados en la señalización, activación y regulación del proceso de enquistamiento, el estrés oxidativo particularmente el H₂O₂, juega un papel trascendental como molécula co-estimuladora y activadora de la vía de señalización que culmina con la síntesis de la quitina. Así mismo, esta vía esta regulada por la sobre-expresión de la Gln6Pi y el silenciamiento del gen de esta enzima, resulta en la pérdida de la capacidad de producir quitina y por tanto de sintetizar una pared rígida resistente. El avance en el conocimiento de los procesos biológicos involucrados en la diferenciación de un parásito a su forma infectiva, abre la posibilidad del desarrollo de nuevos fármacos y blancos de vacunación.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Díaz, H., et al.** (2010). *In vitro induction of Entamoeba histolytica cyst-like structures from trophozoites*. PLoS Negl. Trop. Dis. 16: e607.
- Aguilar-Díaz, H., et al.** (2011). *Cyst and encystment in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies?*. Trends Parasitol. 27(10): 450-458.
- Alcántara-Vázquez, A.** (2008). *Fisiopatología de la amibiasis*. En *Amibiasis en el siglo XXI*. 1ª edición. D.F., Mexico: Editorial IDISA, 78-86p.
- Anaya-Velázquez, F.** (2008). *Entamoeba histolytica vs Entamoeba dispar*. En *Amibiasis en el siglo XXI*. 1ª edición. D.F., Mexico: Editorial IDISA, 29-38p.
- Anbar, M., et al.** (2005). *Involvement of a short interspersed element in epigenetic transcriptional silencing of the amoebapore gene in Entamoeba histolytica*. Eukar. Cell. 4(11): 1775-1784.
- Argüello-García, R., et al.** (2002). *Sequential exposure and assembly of cyst wall laments on the surface of encysting Giardia duodenalis*. Parasitology. 125: 209–219.
- Argüello-García, R., et al.** (2009). *Encystation commitment in Giardia duodenalis: a long and winding road*. Parasite. 16:247–258.
- Arroyo-Begovich, A., et al.** (1980). *Identification of the structural component in the cyst wall of Entamoeba invadens*. J. Parasitol. 66: 735–741.
- Arroyo-Begovich, A., et al.** (1980). *Staining of cysts of Entamoeba invadens, Entamoeba histolytica and Entamoeba coli with wheat germ agglutinin labelled with colloidal gold*. Arch. Invest. Med. (Mex). 11(Suppl): 25-30.
- Arroyo-Begovich, A., y Cárabez-Trejo, A.** (1982). *Location on chitin in the cyst wall of Entamoeba invadens with colloidal gold tracers*. J. Parasitol. 68: 253-258.
- Averner, M. y Fulton, C.** (1966). *Carbon dioxide : Signal for Excystment of Neogleria gruberi*. J. Gen. Microbial. 42: 245-255.

- Avron, B., et al.** (1986). *Encystation of Entamoeba invadens IP-1 is induced by lowering the osmotic pressure and depletion of nutrients from the medium.* J. Protozool. 33: 522–525.
- Bailey, G. B. y Rengypian, S.** (1980). *Osmotic stress as a factor controlling encystation of Entamoeba invadens.* Arch. Invest. Med. (Mex.). 11: 11–16.
- Band, R. N. y Cirrito, H. J.** (1979). *Growth response of axenic Entamoeba histolytica to hydrogen, carbon dioxide, and oxygen.* Protozool. 26 (2): 282-286.
- Barrón-González, M. P., et al.** (2008). *Entamoeba histolytica: cyst-like structures in vitro induction.* Exp. Parasitol. 118: 600–603.
- Barrón-González, M. P., et al.** (2005). *Entamoeba invadens: in vitro axenic encystation with a serum substitute.* Exp. Parasitol. 110: 318–321.
- Bartel, D. P.** (2004). *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.* Cell. 116(2): 281-97.
- Bazán-Tejeda, M. L., et al.** (2007). *Protein kinase C isoforms from Giardia duodenalis: identification and functional characterization of a beta-like molecule during encystment.* Arch. Microbiol. 187: 55–66.
- Belozerskaia, T. A. y Gessler, N. N.** (2006). *Oxidative stress and cell differentiation in Neurospora crassa.* Mikrobiologiya. 75: 497-501.
- Bernander, R., et al.** (2001). *Genome ploidy in different stages of the Giardia lamblia life cycle.* Cell Microbiol. 3(1):55-62.
- Bhattacharya, S., et al.** (1989). *Circular DNA of Entamoeba histolytica encodes ribosomal RNA.* J. Protozool. 36:455-458.
- Bingam, A. K. y Meyer, E. A.** (1979). *Giardia excystation may be induced in vitro in acidic solutions.* Nature. 277: 301–302.
- Birkeland, S. R., et al.** (2010). *Transcriptome analyses of the Giardia lamblia life cycle.* Mol. Biochem. Parasitol. 174: 62–65.

- Blanton, W. E. y Villemez, C. L.** (1978). *Molecular size and chain length distribution in Acanthamoeba cellulose*. J. Protozool. 25: 264–267.
- Boorsma, A., et al.** (2004). *Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 15: 413–427.
- Bracha, R., et al.** (2006). *Transcriptional Silencing of Multiple Genes in Trophozoites of Entamoeba histolytica*. PLoS Pathogens. 2(5): e48.
- Bruchhaus, I. y Tannich, E.** (1994). *Induction of the iron-containing superoxide dismutase in Entamoeba histolytica by a superoxide anion-generating system or by iron chelation*. Mol. Biochem. Parasitol. 67: 281-288.
- Bruchhaus, I., et al.** (1993). *Unusual gene organization in the protozoan parasite Entamoeba histolytica*. DNA Cell Biol. 12: 925-933.
- Bulik, D. A., et al.** (2003). *Chitin synthesis in Saccharomyces cerevisiae in response to complementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress*. Eukaryot Cell. 2: 886–900.
- Byers, T. J., et al.** (1980). *Rapid growth of Acanthamoeba in defined media; induction of encystment by glucose-acetate starvation*. J. Protozool. 27: 216–219.
- Caballero-Salcedo, A., et al.** (1994). *Seroepidemiology of amebiasis in México*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50: 412-419.
- Campos-Góngora, E., et al.** (2004). *Characterization of chitin synthetases from Entamoeba*. Protist. 155: 323–330.
- Campos-Góngora, E., et al.** (2000). *Mg⁺², Mn⁺² and Co⁺² ions enhance the formation of Entamoeba histolytica cyst like structures resistant to sodium dodecyl sulfate*. Arch. Med. Res. 31: 162–168.
- Campos-Góngora, E., et al.** (1997). *Stimulation of Entamoeba histolytica cyst wall polysaccharide synthesis by three divalent cations*. Arch. Med. Res. 28 (Special): 141-142.

- Carranza-Rosales, P., et al.** (2000). *Sequential changes occurring on the surface of Entamoeba invadens during encystation observed by scanning electron microscopy*. Arch. Med. Res. S4: 200–201.
- Cavalier-Smith, T.** (1998). *A revised six-kingdom system of life*. En *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. Inglaterra: Cambridge University Press, 73: 203-266p.
- Chatterjee, A., et al.** (2009). *Evidence for a ‘wattle and daub’ model of the cyst wall of Entamoeba*. PLoS Pathog. 5: e1000498.
- Chatterjee, A., et al.** (2010). *Giardia Cyst wall protein 1 is a lectin that binds to curled fibrils of the GalNAc homopolymer*. PLoS Pathog. 6: e1001059.
- Chávez-Munguía, B., et al.** (2003). *Ultrastructural study of Entamoeba invadens encystation and excystation*. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 35: 235–243.
- Chávez-Munguía, B., et al.** (2005). *Acanthamoeba castellanii encystation and excystation*. J. Eukaryot. Microbiol. 52: 153–158.
- Chávez-Munguía, B., et al.** (2007). *Ultrastructure of cyst differentiation in parasitic protozoa*. Parasitol. Res. 100: 1169–1175.
- Chayen, A., et al.** (1985). *Changes in cell surface proteins and glycoproteins during encystation of Entamoeba invadens*. Mol. Biochem. Parasitol. 15: 83–93.
- Chen, J., et al.** (1997). *The detoxicating enzymes of Entamoeba histolytica and their detoxifying roles*. Arch. Med. Res. 28 Special: 93.
- Chiu, P. W., et al.** (2010). *A novel family of cyst proteins with epidermal growth factor repeats in Giardia lamblia*. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e677.
- Clark, C. G., et al.** (2000). *Entamoeba histolytica: an overview of the biology of the organism*. En: *Amebiasis. Series on Tropical Medicine*. Londres, Inglaterra: Imperial College Press, 1-45p.
- Coppi, A. y Eichinger, D.** (1999). *Regulation of Entamoeba invadens encystation and gene expression with galactose and Nacetylglucosamine*. Mol. Biochem. Parasitol. 102: 67–77.

- Coppi, A., et al.** (2002). *The enteric parasite Entamoeba uses an autocrine catecholamine system during differentiation into the infectious cyst stage.* J. Biol. Chem. 277: 8083–8090.
- Das, S. y Gillin, F. D.** (1991). *Chitin synthase in encysting Entamoeba invadens.* Biochem. J. 280: 641–647.
- Dauids, B. J., et al.** (2006). *A new family of giardial cysteine-rich non-VSP protein genes and a novel cyst protein.* PLoS ONE. 1: e44.
- De Moraes, J. y Alfieri, S. C.** (2008). *Growth, encystment and survival of Acanthamoeba castellanii grazing on different bacteria.* FEMS Microbiol. Ecol. 66: 221–229.
- Descoteaux, S., et al.** (1995). *Increase in mRNA of multiple Eh pgp genes encoding P-glycoprotein homologues in emetine-resistant Entamoeba histolytica parasites.* Gene. 164(1):179-184.
- Dudley, R., et al.** (2009). *Carbohydrate analysis of Acanthamoeba castellanii.* Exp. Parasitol. 122: 338–343.
- Ehrenkauf, G. M., et al.** (2009). *A developmentally regulated Myb domain protein regulates expression of a subset of stage specific genes in Entamoeba histolytica.* Cell Microbiol. 11: 898–910.
- Eichinger, D. (b).** (2001). *A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of Entamoeba.* J. Eukariot Microbiol. 48 (1): 17-21p.
- Eichinger, D. (a).** (2001). *Encystation in parasitic protozoa.* Current Opinion in Microbiology. 4: 421-426p.
- Eichinger, D.** (1997). *Encystation of entamoeba parasites.* Bioessays. 19(7): 633-639.
- Ellis, J. G., et al.** (2003). *Potential involvement of extracellular signalregulated kinase 1 and 2 in encystation of a primitive eukaryote, Giardia lamblia. Stage-specific activation and intracellular localization.* J. Biol. Chem. 278: 1936–1945.

- Flores, B. M., et al.** (1996). *Surface localization, regulation, and biologic properties of the 96-kDa alcohol/aldehyde dehydrogenase (EhADH2) of pathogenic Entamoeba histolytica*. J. Inf. Dis. 173: 226-231.
- Frisardi, M., et al.** (2000). The most abundant glycoprotein of amebic cyst walls (Jacob) is a lectin with five Cys-rich, chitin-binding domains. Infect. Immun. 68: 4217–4224.
- Gerwig, G. J., et al.** (2002). *The Giardia intestinalis filamentous cyst wall contains a novel beta (1-3)-N-acetyl-D-galactosamine polymer: a structural and conformational study*. Glycobiology. 12: 499–505.
- Ghosh, S. K., et al.** (1999). *Chitinase secretion by encysting Entamoeba invadens and transfected Entamoeba histolytica trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus*. Infect. Immun. 67: 3073–3081.
- Gilchrist, C. A., et al.** (1995). *Transient expression of luciferase in Entamoeba histolytica driven by the ferredoxin gene 5' and 3' regions*. Mol. Biochem. Parasitol. 74(1): 1-10.
- González-Salazar, F., et al.** (2000). *Identification of seven chemical factors that favor high-quality Entamoeba histolytica cyst-like structure formation under axenic conditions*. Arch. Med. Res. 31(Suppl): 192–193.
- Gottig, N., et al.** (2006). *Active and passive mechanisms drive secretory granule biogenesis during differentiation of the intestinal parasite Giardia lamblia*. J. Biol. Chem. 281: 18156–18166.
- Halliwell, B., et al.** (2001). *The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action?*. Free Radic. Res. 33: 819-830.
- Hirukawa, Y., et al.** (1998). *Structure and expression of a cyst specific protein of Acanthamoeba castellanii*. Biochim. Biophys. Acta. 1398: 47–56.
- Huang, C. N., et al.** (1986). *Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining*. Protoplasma. 135 (2-3): 80-87.

- Huber M., et al.** (1989). *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Mol. Biochem. Parasitol.* 32:455-496.
- Hwang, H. W., et al.** (2007). A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science.* 315(5808): 97-100.
- Jarroll, E. L., et al.** (2001). Regulation of carbohydrate metabolism during *Giardia* encystment. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48: 22–26.
- Jarroll, E. L., et al.** (2001). Regulation of carbohydrate metabolism during *Giardia* encystment. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48: 22-26.
- Jourd'heuil, D., et al.** (1997). Oxidants, transcription factors, and intestinal inflammation. *J. Clin. Gastroenterol.* 25 Suppl 1: S61-72.
- Karr, C. D., et al.** (2004). Cyst wall synthase: *N*-acetylgalactosaminyl transferase activity is induced to form the novel *N*-acetylgalactosamine polysaccharide in the *Giardia* cyst wall. *Microbiology.* 150: 1237–1243.
- Kaul, D., et al.** (2001). Receptor-Ck regulates *Giardia* encystation process. *Mol. Cell Biochem.* 225: 167–169.
- Köhler M., et al.** (2008). *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. *Parasitol. Res.* 02: 1069–1072.
- Konrad, C., et al.** (2010). Selective condensation drives partitioning and sequential secretion of cyst wall proteins in differentiating *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog.* 6 : e1000835.
- Lagorce, A., et al.** (2002). Involvement of *GFA1*, which encodes glutaminefructose- 6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 269: 1697–1707.
- Lanfredi-Rangel, A., et al.** (2003). Structure of the biogenesis of *Giardia lamblia* encystation secretory vesicles. *J. Struct. Biol.* 143: 153–163.

- Lauwaet, T., et al.** (2007). *Encystation of Giardia lamblia: a model for other parasites*. *Curr. Opin in Microbiol.* 10: 554–559.
- Lee, C. G.** (2009). *Chitinases and Chitinase-like Proteins in Allergic Inflammation and Tissue Remodeling*. *Yonsei. Med. J.* 50(1): 22-30.
- Lee, C. G.** (2009). *Chitin, chitinases and chitinase-like proteins in allergic inflammation and tissue remodeling*. *Yonsei Med. J.* 50 (1): 22-30.
- Lee, Y. S., et al.** (2004). *Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways*. *Cell.* 117(1): 69-81.
- Loftus, B., et al.** (2005). *The genome of the protist parasite Entamoeba histolytica*. *Nature.* 24: 865–868.
- López, A. B., et al.** (2002). *Giardia intestinalis glucosamine 6-phosphate isomerase: the key enzyme to encystment appears to be controlled by ubiquitin attachment*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49: 134–136.
- Lucero, H. A., et al.** (2002). *A nonradioactive, high throughput assay for chitin synthase activity*. *Anal Biochem.* 305: 97–105.
- Luján, H. D. y Touz, M. C.** (2003). *Protein trafficking in Giardia lamblia*. *Cell Microbiol.* 5 : 427–434.
- Lujan, H. D., et al.** (1995). *Identification of a novel Giardia lamblia cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall*. *J. Biol. Chem.* 270: 29307–29313.
- Luján, H. D., et al.** (1997). *Mechanisms of Giardia lamblia differentiation into cyst*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 294–304.
- Macechko, P. T., et al.** (1992). *Galactosamine-synthesizing enzymes are induced when Giardia encyst*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56: 301-309.

- Makioka, A., et al.** (2000). *Effect of cytochalasin D on the growth, encystation, and multinucleation of Entamoeba invadens*. Parasitol. Res. 86: 599-602.
- Makioka, A., et al.** (2001). *Inhibition of encystation of Entamoeba invadens by wortmannin*. Parasitol. Res. 87: 371-375.
- Makioka, A., et al.** (2002). *Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of Entamoeba histolytica and Entamoeba invadens*. Parasitol. Res. 88: 454-459.
- Manning, P., et al.** (1992). *Carbohydrate and amino acid analyses of Giardia muris cysts*. J. Protozool. 39, 290–296.
- Manning-Cela, R. y Meza, I.** (1997). *Up-regulation of actin mRNA and reorganization of the cytoskeleton in Entamoeba histolytica trophozoites*. J. Euk. Microbiol. 44(1): 18-24.
- Marti, M., y Hehl, A. B.** (2003). *Encystation-specific vesicles in Giardia: a primordial Golgi or just another secretory compartment*. Trends Parasitol. 19: 440–446.
- Martínez-Palomo, A.** (1987). *The pathogenesis of amoebiasis*. Parasitol. Today. 3(4): 111-118.
- Mc. Connachie, E. W.** (1955). *Studies on Entamoeba invadens Rodhain, 1934, in vitro and its relationship to some other species of Entamoeba*. Parasitology: 45: 452p.
- Menon, J. y Rozman, R.** (2007). *Oxidative stress, tissue remodeling and regression during amphibian metamorphosis*. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 145: 625-631.
- Merz, R. A., et al.** (1999). *Biochemistry of chitin synthase*. En *Chitin and chitinases*. Exs. 87: 9-37.
- Merzendorfer, H., y Zimoch, L.** (2003). *Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases*. J. Exp. Biol. 206: 4393-4412.
- Mirelman, D.** (1987). *Ameba-bacterium relationship in amebiasis*. Microbiol. Rev. 51(2): 272-84.
- Mirelman, D., y Avron, B.** (1988). *Cyst formation in Entamoeba*. En *Amebiasis: Human infection by Entamoeba histolytica*. New York, USA: Wiley Medical Publication, 768-781p.

- Morf, L., et al.** (2010). *The transcriptional response to encystation stimuli in Giardia lamblia is restricted to a small set of genes.* Eukaryot. Cell. 9: 1566–1576.
- Mowatt, M. R., et al.** (1995). *Developmentally regulated expression of a Giardia lamblia cyst wall protein gene.* Mol. Microbiol. 15: 955–963.
- Mukherjee, C., et al.** (2008). *Entamoeba Shows Reversible Variation in Ploidy under Different Growth Conditions and between Life Cycle Phases.* PloS Negl. Trop. Dis. 2: e281.
- Munro, C. A., Gow, N. A.** (2001). *Chitin synthesis in human pathogenic fungi.* Med. Mycol. 39(1): 41-53.
- Nakada-Tsukui, K., et al.** (2005). *A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica.* Mol. Biol. Cell. 16: 5294-5303.
- Naqvi1, A. R., et al.** (2009). *The Fascinating World of RNA Interference.* Inter. J. of Biol. Scien. 5(2): 97-117.
- Natarajan, K. y Datta, A.** (1993). *Molecular cloning and analysis of the NAG1 cDNA coding for glucosamine-6-phosphate deaminase from Candida albicans.* J. Biol. Chem. 268: 9206–9214.
- Nathan, C. F.** (1987). *Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes.* J. Clin. Invest. 80: 1550-1560.
- Neff, R. J. y Benton, W. F.** (1962). *Localization of cellulose in the cysts of Acanthamoeba sp.* J. Protozool. 9: 11.
- Neff, R. J. y Neff, R. H.** (1969). *The biochemistry of amoebic encystment.* Sym. Soc. Exp. Biol. 23: 51–81.
- Okada, M., et al.** (2005). *Proteomic análisis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica.* Eukaryot Cell. 4: 827-831.
- Orozco, E., et al.** (1988). *Entamoeba histolytica: cell cycle and nuclear division.* Exp. Parasitol. 67(1): 85-95

- Paget, T. A., et al.** (1998). *Metabolic changes in Giardia intestinalis during differentiation*. J. Parasitol. 84: 222–226.
- Pan, Y. J., et al.** (2009). *A novel WRKY-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in Giardia lamblia*. J. Biol. Chem. 284: 17975–17988.
- Poxleitner, M. K., et al.** (2008). *Evidence for karyogamy and exchange of genetic material in the binucleated intestinal parasite Giardia intestinalis*. Science. 319: 1530–1533.
- Purdy, J. E., et al.** (1996). *Upstream regulatory elements controlling expression of the Entamoeba histolytica lectin*. Mol. Biochem. Parasitol. 78(1-2): 91-103.
- Purdy, J. E., et al.** (1994). *Transient transfection of the enteric parasite Entamoeba histolytica and expression of firefly luciferase*. Proc. Natl. Acad. Sci. (15): 7099-7103.
- Ram, A. F. J., et al.** (2004). *The cell wall stress response in Aspergillus niger involves increased expression of the glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (gfaA) and increased deposition of chitin in the cell wall*. Microbiology. 150: 3315–3326.
- Ramakrishnan, G., y Petri, W. A.** (2000). *Pathogenesis and Molecular Biology*. En *Amebiasis, Series on Tropical Medicine: Science and Practice. Vol.2*. Londres, Inglaterra: Imperial College Press, 90-112p.
- Ramos-Martínez, E., et al.** (2009). *Entamoeba histolytica: Oxygen resistance and virulence*. Inter. J. Parasitol. 39: 693–702.
- Ravdin, J. I.** (2000). *Amebiasis, Series on Tropical Medicine: Science and Practice. Vol.2*. Londres, Inglaterra: Imperial College Press, 186p.
- Ravdin, J. I.** (1988). *Amebiasis: Human infection by Entamoeba histolytica*. Nueva York, USA: Wiley Medical Publication, 838p.
- Reed, S. L.** (2000). *Clinical manifestations and diagnosis of amebiasis*. En *Amebiasis, Series on Tropical Medicine: Science and Practice. Vol.2*. Londres, Inglaterra: Imperial College Press, 113-126p.

- Reiner, D. S., et al.** (1990). *Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, Giardia lamblia*. Eur. J. Cell Biol. 53: 142–153.
- Robert, L.** (2008). *Sarcodinos ó amibas de importancia médica*. En *Amibiasis en el siglo XXI*. 1ª edición. D.F., Mexico: Editorial IDISA, 16-28p.
- Robinson, G. L.** (1968). *Laboratory Cultivation of Some Human Parasitic Amoebae*. J. Gen. Microbiol. 53: 69-79.
- Rodríguez, M. A., et al.** (1989). *Entamoeba histolytica: molecules involved in the target cell-parasite relationship*. Mol. Biochem. Parasitol. 37: 87-100.
- Romero-Cabello, R.** (2008). *Aspectos históricos de la amibiasis*. En *Amibiasis en el siglo XXI*. 1ª edición. D.F., Mexico: Editorial IDISA, 11-28p.
- Said-Fernández, S.** (1990). *Virulence factors of Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Med. (Mex). 21(3):253-262.
- Said-Fernández, S., et al.** (2001). *Mg⁺², Mn⁺² and Co⁺² stimulate Entamoeba histolytica to produce chitin-like material*. J. Parasitol. 84: 919–923.
- Saito-Nakano, Y., et al.** (2004). *Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica*. J. Biol. Chem. 279: 49497-49507.
- Schaenman, J. M., et al.** (1998). *An upstream regulatory element containing two nine basepair repeats regulates expression of the Entamoeba histolytica hgl5 lectin gene*. Mol. Biochem. Parasitol. 94(2): 309-313.
- Schupp, D. G., et al.** (1988). *Production of viable Giardia cysts in vitro: determination by fluorogenic dye staining, excystation, and animal infectivity in the mouse and Mongolian gerbil*. Gastroenterol. 95: 1–10.
- Schuster, F. L., et al.** (2002). *Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas*. Clin. Microbiol. Rev. 15: 342–354.

- Sehgal D., et al.** (1994). *Nucleotide sequence organisation and analysis of the nuclear ribosomal DNA circle of the protozoan parasite Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67(2): 205-214.
- Sener, K., et al.** (2004). *Amino sugar phosphate levels in Giardia change during cyst wall formation*. *Microbiology.* 150: 1225–1230.
- Singh, U. y Rogers, J. B.** (1998). *The novel core promoter element GAAC in the hgl5 gene of Entamoeba histolytica is able to direct a transcription start site independent of TATA or initiator regions*. *J. Biol. Chem.* 273(34): 21663-21668.
- Slawomir, M., et al.** (2006). *Enzymes of UDP-GlcNAc biosynthesis in yeast*. *Yeast.* 23: 1–14.
- Smith, A. L., y Smith, H. V.** (1989). *A comparison of fluorescein diacetate and propidium iodide staining and in vitro excystation for determining Giardia intestinalis cyst viability*. *Parasitol.* 3: 329-31.
- Solís, C. F., et al.** (2009). *Use of Bacterially Expressed dsRNA to Downregulate Entamoeba histolytica Gene Expression*. *PLoS One.* 4 (12): e8424.
- Solís, C. F., y Guillén, N.** (2008). *Silencing genes by RNA interference in the protozoan parasite Entamoeba histolytica*. *Methods Mol. Biol.* 442 (II):113-28.
- Spindler, K. D., et al.** (1990). *Chitin metabolism: a target for drugs against parasites*. *M. Parasitol. Res.* 76(4): 283-8.
- Stanley, S. L.** (2003). *Amoebiasis*. *Lancet.* 231: 1025-1034p.
- Steimle, A. P., et al.** (1997). *Purification and characterization of encystment induced glucosamine 6-phosphate isomerase in Giardia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 84: 149–153.
- Stuart, L. M. y Ezekowitz, R. A.** (2005). *Phagocytosis: elegant complexity*. *Immunity.* 22: 539-550.
- Sun, C. H., et al.** (2003). *Mining the Giardia lamblia genome for new cyst wall proteins*. *J. Biol. Chem.* 278: 21701–21708.

- Svärd, S. G., et al.** (2003). *Giardia lamblia: a model organism for eukaryotic cell differentiation*. FEMS Microbiol Lett. Review. 218(1): 3-7.
- Szymczyk, K., et al.** (2006). *Involvement of hydrogen peroxide in the differentiation and apoptosis of preosteoclastic cells exposed to arsenite*. Biochem. Pharmacol. 72: 761-769.
- Tay-Zavala, J.** (2008). *Morfología y biología de Entamoeba histolytica*. En *Amibiasis en el siglo XXI*. 1ª edición. D.F., Mexico: Editorial IDISA, 57-63p.
- Thiriat, L., et al.** (1998). *Determination of Giardia cyst viability in environmental and faecal samples by immunofluorescence, fluorogenic dye staining and differential interference contrast microscopy*. Lett. Appl. Microbiol. 26(4):237-42.
- Tomari, Y., et al.** (2004). *RISC Assembly Defects in the Drosophila RNAi Mutant armitage*. Cell. 116(6): 831-841.
- Tomlinson, G. y Jones, E. A.** (1962). *Isolation of cellulose from the cyst wall of a soil amoeba*. Biochem. Biophys. Acta. 63: 194–200.
- Touz, M. C., et al.** (2002). *The activity of a developmentally regulated cysteine proteinase is required for cyst wall formation in the primitive eukaryote Giardia lamblia*. J. Biol. Chem. 277: 8474–8481.
- Touz, M. C., et al.** (2002). *Membrane-associated dipeptidyl peptidase IV is involved in encystation-specific gene expression during Giardia differentiation*. Biochem. J. 364: 703–710.
- Van-Dellen, K., et al.** (2002). *Entamoeba histolytica lectins contain unique 6-Cys or 8-Cys chitin-binding domains*. Infect. Immun. 70: 3259–3263.
- Van-Keulen, H., et al.** (1998). *Cloning of two putative Giardia lamblia glucosamine-6-phosphate isomerase genes only one which is transcriptionally activated during encystment*. J. Eukaryot. Microbiol. 45: 637-642.
- Vázquez, L., et al.** (1984). *Induction of encystation of Entamoeba invadens by removal of glucose from the culture medium*. J. Parasitol. 70: 629–633.

- Vincent, F., et al.** (2005). *Structure and Kinetics of a Monomeric Glucosamine 6-Phosphate Deaminase*. J. Biol. Chem. 280 (20): 19649-19655.
- Vines, R. R., et al.** (1998). *Regulation of adherence and virulence by the Entamoeba histolytica lectin cytoplasmic domain, which contains a beta-2 integrin motif*. Mol. Biol. Cell. 9: 2069–2079.
- Walsh, J. A.** (1986). *Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality*. Rev. Infect. Dis. 8: 228-238.
- Wang, Y. T., et al.** (2010). *A novel pax-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in Giardia lamblia*. J. Biol. Chem. 285: 32213–32226.
- Ward, W., et al.** (1997). *A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of Giardia*. Cell. 89: 437–444.
- Worgall, T. S., et al.** (2004). *Sterol and fatty acid regulatory pathways in a Giardia lamblia derived promoter: evidence for SREBP as an ancient transcription factor*. J. Lipid Res. 45: 981–988.
- World Health Organization.** (1997). *Amoebiasis, an expert consultation*. Wkly. Epidemiol. Rec. 72: 97-100.
- Ximénez, C.** (2000). **Parasitosis intestinal en México**. Cuadernos Fundación Salud. 34.

XIII. PUBLICACIONES OBTENIDAS

Anexo I

Aguilar-Díaz, H., Díaz-Gallardo, M., Laclette, J. P., Carrero, J. C. (2010). *In vitro induction of Entamoeba histolytica cyst-like structures from trophozoites*. PLoS Negl. Trop. Dis. 16: e607.

Anexo II

Aguilar-Díaz, H., Carrero, J. C., Argüello-García, R., Laclette, J. P., Morales-Montor, J. (2011). *Cyst and encystment in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies?*. Trends Parasitol. 27(10): 450-458.

Anexo III

Meneses-Ruiz, D. M., Laclette, J. P., Aguilar-Díaz, H., Hernández-Ruiz, J., Luz-Madrigal, A., Sampieri, A., Vaca L. nd Carrero, J. C. (2011). *Mucosal Delivery of ACNPV Baculovirus Driving Expression of the Gal-Lectin LC3 Fragment Confers Protection against Amoebic Liver Abscess in Hamster*. Int. J. Biol. Sci. 7(9):1345-1356.