

75



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

EXPRESION DEL GEN *Ehr6B* DE *Entamoeba histolytica*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

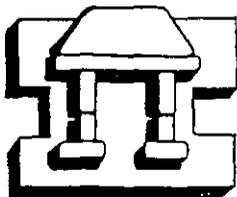
B I O L O G O

P R E S E N T A :

ISRAEL LOPEZ REYES

288086

TUTOR: DR. MARIO ALBERTO RODRIGUEZ RODRIGUEZ
Profesor Investigador del Departamento de Patología Experimental
del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.
(CINVESTAV-IPN)



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO

200



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.

DEDICO ESTA TESIS A

**MIS PADRES**

Alicia Reyes Macías

José Benito López Ávila

Por la educación, el apoyo y el amor que me han brindado  
y principalmente por su confianza y los valores inculcados en mí.

**MIS HERMANOS**

José Luis, Sabina, Benito, Roberto, Raúl, Angélica María y Judith (mi  
flaca)  
**(y todos mis queridos sobrinos)**

Por su paciencia confianza y amistad, esto también es parte de ellos.

**Todos mis compañeros y amigos**

Tía Martha, Sra. Bertha Ayala, Alfonso Flota, Amalia Hernández, César Escobedo,  
Arturo Macías, Víctor y Omar, y a los "cuates del barrio"

María, Pancho, Saúl, Gerardo, Fede, a los "inflásticos" de la ENEP-I y a mis  
profesores de la Universidad.

Compañeros y amigos del Laboratorio 2 (Pat. Exp-CINVESTAV) Mario, Tomás,  
Juan Pedro, Laurence, César, Lupita, Rima, Xochitl, Rosy, Esther, Dulce, Ceci,  
Máximo, Alfredo, Ramón, Lalo, Maty, Francisco, Guille, David, Leo, Rocío, Doña  
Ale, Sandy, Alberto, Chalio, Caro, Chelo, Memo, Marisol, Karina, Claudia, Laura,  
Adriana, Eduardo.

Y al honorable Dr. J.M. Cano.

Con quienes he convivido en diferentes tiempos, pero siempre estarán en mi  
memoria.

Agradezco especialmente a

**Mario**

Por su apoyo y comprensión, le agradezco la oportunidad que me dio de ser su estudiante y su amigo

**Dra. Esther Orozco Orozco**

Por su apoyo y confianza, y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, apoyandome económicamente durante la realización de este trabajo a través de los recursos a proyectos científicos para investigadores Nivel III del Sistema Nacional de Investigadores.

**Por su gran apoyo técnico:**

**Sra. Alejandrina Reyes Vivar (CINVESTAV-IPN)**

**Sr. Alberto García Miguel (CINVESTAV-IPN)**

**Sr. Alfredo Padilla Barberi (CICATA-IPN)**

**A mi compañera y mi amor**

**MARÍA DEL SOCORRO**

Por su cariño, apoyo, compañerismo y paciencia, y porque ha sido uno de los más importantes estímulos en mi vida, con admiración y respeto.

**A sus familiares**

Doña Juana, Don Arcadio, Juan Manuel Charcas  
y a todas sus hermanas y sobrinos.

## ÍNDICE

TABLAS.	i
LISTA DE FIGURAS.	ii
RESUMEN.	1
INTRODUCCIÓN.	2
_ Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> .	4
_ Bases Biológicas del mecanismo agresor de <i>E. histolytica</i> .	7
• Adhesión.	7
* Adhesina de 112 kDa de <i>E. histolytica</i> .	8
• Citólisis dependiente de contacto.	9
• Fagocitosis.	10
TRANSPORTE INTRACELULAR.	12
PEQUEÑAS GTPasas EN LA REGULACIÓN DEL TRANSPORTE INTRACELULAR.	16
RAB.	16
3	
CICLO FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS Rab.	18
ANTECEDENTES.	22
JUSTIFICACIÓN.	26
OBJETIVO GENERAL.	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	27
MATERIAL Y MÉTODOS.	28
_ 1. Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .	28

_2. Obtención del DNA.	28
_3. Diseño de los oligonucleótidos iniciadores (primers) y PCR.	29
_4. Extracción del RNA Total.	30
_5. Ensayos de hibridación (Northern-Blot).	30
_6. Reacción de secuenciación.	32
_7. Reacción de Primer Extension.	33
_8. Geles de secuenciación.	34
_9. Extracción de proteínas totales.	35
-10. Análisis de las proteínas en SDS-PAGE.	35
_11. Western Blot.	36
_12. Obtención de eritrocitos.	37
_13. Interacción trofozoitos-eritrocitos.	37
RESULTADOS.	38
DISCUSIÓN.	46
CONCLUSIONES.	49
BIBLIOGRAFÍA.	50
APÉNDICE.	61

## TABLAS

i

Tabla 1.	Resumen de la localización, propiedades funcionales y componentes interactuantes de Ypt1, Sec4 y proteínas Rab en levaduras y células de mamífero.	15
Tabla 2.	Mutaciones Rab que afectan el ciclo GTP-GDP de las proteínas.	21

## LISTA DE FIGURAS

ii

- Figura 1. Micrografía electrónica de barrido de un trofozoíto de *E. histolytica* de un cultivo axénico sobre una monocapa de células en cultivo. 3
- Figura 2. Ciclo de vida de *E. histolytica*. 5,6
- Figura 3. Representación esquemática del fragmento de DNA de *Eh112* y péptidos EhCP112, cisteína proteinasa; EhADH112, adhesina. 9
- Figura 4. Secuencia de eventos involucrados en la fagocitosis de *E. histolytica*. 12
- Figura 5. Distribución de las GTPasas (Sar1, ARF1 y Rabs) a lo largo de los compartimentos de las vías endo y exocíticas. 14
- Figura 6. Estructura de las Rab GTPasas. Plegamiento tridimensional del dominio GTPasa de Ras. 17
- Figura 7. Estructura lineal de las Rab GTPasas. 18
- Figura 8. Ciclo de GTPasa de las proteínas Rab. 19
- Figura 9. Inmunolocalización de EhRabB durante la fagocitosis de eritrocitos humanos. 24
- Figura 10. Organización genómica de los genes *EhrabB* y de la adhesina de 112 kDa (*Ehadh112* y *Ehcp112*) y mapa físico del gen *EhrabB*. 25
- Figura 11. Amplificación por PCR de un fragmento de aproximadamente 800 pb. 39

Figura 12. Northern-Blot del gen <i>EhrabB</i> .	40
Figura 13. Sitios de inicio de la transcripción del gen <i>EhrabB</i> .	42
Figura 14. Ensayos Western-Blot con anticuerpos contra EhRabB.	43
Figura 15. Ensayos de Western-Blot en la interacción trofozoítos-eritrocitos.	45
Figura 16. Organización genómica y sitios de inicio de la transcripción de los genes <i>EhrabB</i> , <i>Ehcp112</i> y <i>Ehadh112</i> .	47

## RESUMEN

En este trabajo se analizó la expresión del gen *EhrabB* de *Entamoeba histolytica*. El gen *EhrabB* codifica un polipéptido de 192 aa (EhRabB) con 40-42% de identidad a proteínas Rab, involucradas en la regulación y ensamblaje de vesículas en las vías endo y exocíticas de las células eucariontes. *EhrabB* se localizó en un plásmido recombinante a 332 pb río arriba del codón de inicio del gen que codifica para la subunidad con actividad de proteinasa de la adhesina de 112 kDa (*Ehcp112*), aunque transcrito por la cadena complementaria.

Para confirmar que *EhrabB* y *Ehcp112* están adyacentes en el genoma de *E. histolytica*, en este trabajo se realizó la amplificación por PCR de un fragmento de DNA del tamaño esperado (~800 pb) utilizando como molde DNA genómico de *E. histolytica* e iniciadores complementarios a secuencias internas de los genes de *EhrabB* y *Ehcp112*.

Con el fin de determinar si *EhrabB* es un gen activo, se realizaron experimentos tipo Northern y Western blot para detectar el mRNA y la proteína codificados por este gen, respectivamente. Una sonda de *EhrabB* identificó dos transcritos de 0.6 y 0.97 kb en ensayos de Northern blot. El menor de los transcritos tiene la talla esperada de la secuencia del gen y tuvo su sitio de inicio de la transcripción a -72 b del codón de inicio de la traducción (ATG). El otro transcrito tiene varios sitios de inicio de la transcripción el más pequeño a -260 b del ATG. Anticuerpos contra la proteína EhRabB detectaron en extractos de proteínas totales de *E. histolytica* un par de bandas de aproximadamente 19 y 21 kDa, que se expresaron de manera diferencial durante cinéticas de fagocitosis de eritrocitos.

Estos resultados sugieren que *EhrabB* es un gen activo y que la expresión de la proteína EhRabB está influenciada por la presencia de la célula blanco. Debido a su organización genética también se sugiere que *EhrabB* tiene una función relacionada con la de la adhesina de 112 kDa, probablemente en la fagocitosis de la célula blanco, como ha sido sugerido por Rodríguez y col (2000).

## EXPRESIÓN DEL GEN *EhrabB* DE *Entamoeba histolytica*.

### INTRODUCCIÓN

La amibiasis es definida como la infección causada por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica*, (Schaudin, 1903) el cual pertenece al Subreino Protozoa, Subphylum Sarcodina, Superclase Rhizopoda, Clase Lobosea, Subclase Gymnamoebia, Orden Amoebida, Suborden Tubulina, Familia Entamoebidae (Levine y col, 1980).

*E. histolytica* normalmente reside en el intestino grueso, pero ocasionalmente penetra la mucosa intestinal y puede diseminarse a otros órganos debido a factores aún desconocidos. La amibiasis es responsable de más de 100,000 muertes cada año a nivel mundial, situándose en segundo lugar en mortalidad debido a protozoarios parásitos, sólo después de la Malaria (WHO, 1997). En los países en vías de desarrollo, las deficientes condiciones de sanidad e higiene debidas al bajo nivel socioeconómico permiten la infección y la propagación de una variedad de parásitos intestinales. México es uno de los países en el mundo en el que la amibiasis se presenta con mayor incidencia y se encuentra entre las diez primeras causas de muerte (Walsh, 1988). Si bien el conocimiento de la amibiasis se inició hace apenas poco más de una centuria, los estragos que causa la amiba en el ser humano, ya eran bien conocidos desde hace varios siglos por los mexicanos; sobre todo por los habitantes de la capital del país (Martínez-Palomo, 1987).

*E. histolytica* presenta una fase infectiva llamada quiste y una forma invasiva, el trofozoíto (Fig. 1). Este parásito se diferencia de los procariontes por tener núcleo organizado, genoma complejo y superficie constituida por una sola membrana plasmática. Si bien estas últimas son características de los eucariontes, las amibas se distinguen también de éstos por su organización citoplásmica rudimentaria y división nuclear sin cromosomas evidentes (Martínez-Palomo, 1987). Así pues *E. histolytica* puede ser considerado como un eucarionte rudimentario.

Anteriormente se pensaba que las amibas carecían de un citoesqueleto estructurado, y de organelos en su citoplasma. Sin embargo, se han encontrado recientes evidencias sobre la actividad enzimática de la dol-p-man-transferasa típica del retículo endoplásmico (Luna-Arias, comunicación personal). Ghosh y col, 1999 encontraron por microscopía confocal

quitinasa retenida en un sistema membranal semejante al retículo endoplásmico y al complejo de Golgi, por otro lado, este complejo ha sido identificado también mediante microscopía de transmisión electrónica empleando tiamino-pirofosfatasa (Mazzuco y col, 1997). Además de que se ha detectado DNA citoplásmico de trofozoítos vivos en una estructura que Orozco y col, (1997) llamaron EhKO, utilizando naranja de acridina y por hibridación *in situ* de trofozoítos con una sonda rDNA. Por otro lado Mai y col, (1999) y Tovar y col, (1999) han reportado un organelo análogo a mitocondria, basandose en la presencia de una proteína de origen mitocondrial como la chaperonina 60, en trofozoítos vivos de *E. histolytica*.

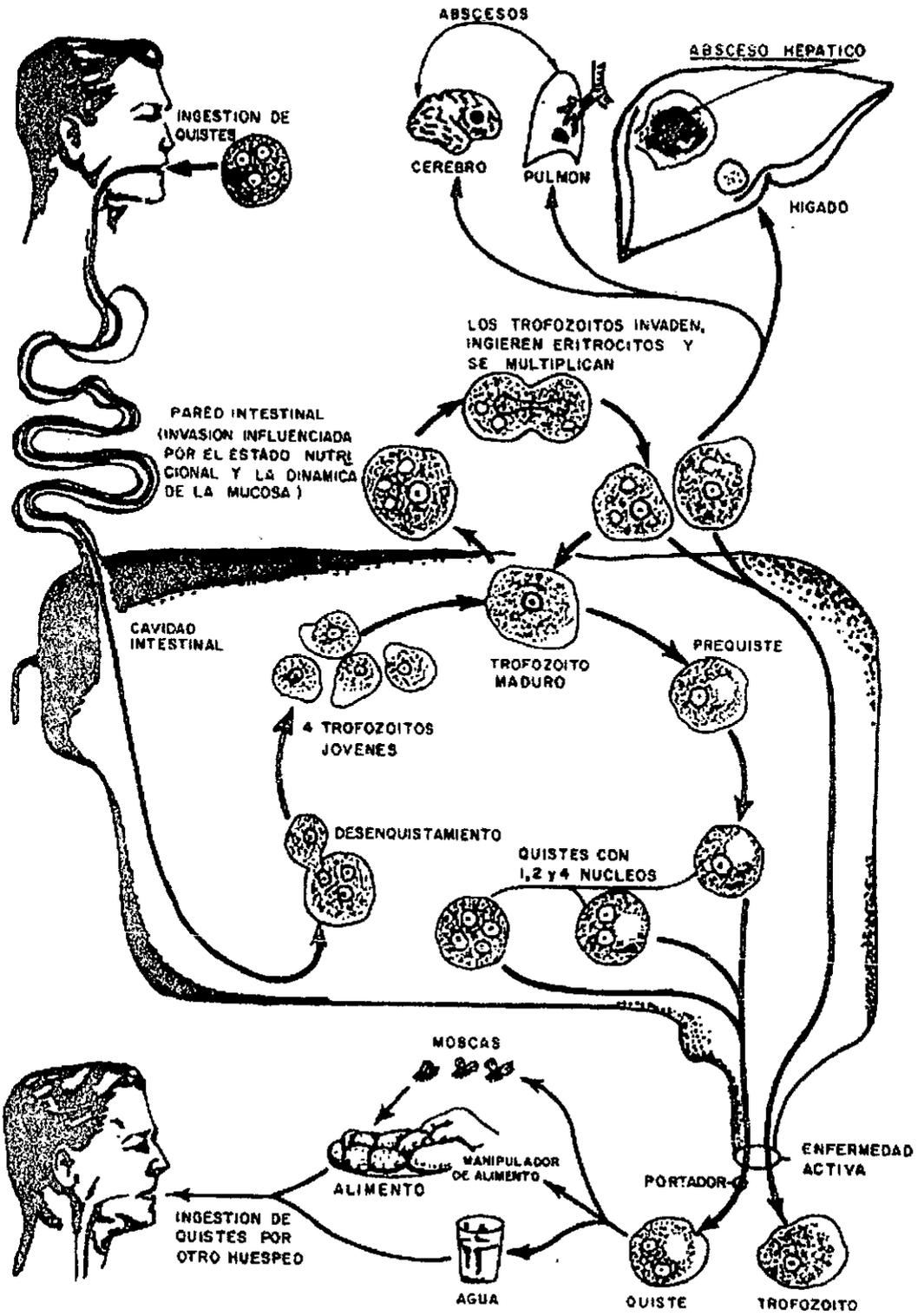


Fig. 1. Micrografía electrónica de barrido de un trofozoíto de *E. histolytica* de un cultivo axénico sobre una monocapa de células en cultivo. (Tomado de Martínez-Palomo, 1982).

## CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *E. histolytica* (Fig. 2) empieza con el quiste como forma infectiva, éste puede sobrevivir fuera del huésped por semanas o meses (Noble y Noble, 1976). La ingestión de quistes es seguida por el desenquistamiento en el aparato digestivo (Fig. 2). De cada quiste emergen cuatro trofozoítos (Martínez-Palomo, 1982). Posteriormente, los trofozoítos se dividen por fisión binaria, se adhieren a la mucosa intestinal y pueden vivir como comensales, o pueden producir ulceración en la mucosa (Fig. 2). Los trofozoítos se dividen una o varias veces y después se enquistan en el mismo huésped. El enquistamiento es un proceso activo; una vez iniciado, el protozooario sufre dos divisiones nucleares para formar un total de cuatro núcleos. Durante estas divisiones ocurre glucólisis anaerobia y síntesis de DNA (Barker y Swales, 1972). Se cree que los quistes no pueden pasar a la fase trofozoítica en el mismo huésped sino que tienen que ser expulsados con las heces para empezar un nuevo ciclo (Martínez-Palomo, 1982).

Fig. 2. **Ciclo de vida de *E. histolytica***. Los quistes maduros contaminan agua y alimentos, al ser ingeridos por el hombre, se desenquistan para dar origen a los trofozoítos que se multiplican para producir más trofozoítos, los cuales pueden enquistarse y ser expulsados con las heces, o bien pueden invadir la mucosa intestinal y atravesarla para invadir otros órganos. (Tomado de García-Rivera, 1987).



## BASES BIOLÓGICAS DEL MECANISMO AGRESOR DE *E. histolytica*

El estudio de las propiedades biológicas de los trofozoítos amibianos ha permitido distinguir cuatro etapas en el mecanismo agresor de *E. histolytica* sobre la célula blanco: adhesión, citólisis dependiente de contacto, fagocitosis y degradación intracelular (Orozco y col, 1982; Martínez-Palomo, 1986; Pérez-Tamayo, 1986; Ravdin, 1986).

### ADHESIÓN

Los trofozoítos de *E. histolytica* se adhieren a monocapas de células epiteliales en cultivo y también a superficies inertes como plástico y vidrio. La adhesión de los trofozoítos a substratos inertes es mediada por mecanismos inespecíficos, mientras que la adhesión a células epiteliales, requiere de un mecanismo específico donde se involucran moléculas de la superficie del parásito (adhesinas) y moléculas en la superficie de la célula blanco (receptores) (Martínez-Palomo, 1986).

Para la identificación de las moléculas de los trofozoítos de *E. histolytica* que participan directamente en la relación huésped-parásito se han realizado estudios de inhibición de la adhesión de trofozoítos a su célula blanco, mediante el uso de azúcares y anticuerpos específicos. Estos estudios demostraron que si se inhibe la unión también se inhibe el proceso patogénico sobre las células blanco, sugiriendo que el contacto inicial entre el trofozoíto y éstas células es mediado por interacciones específicas, y que la adhesión es necesaria para que ocurra la fagocitosis y la citólisis (Ravdin y col, 1985a; Cano-Mancera y López-Revilla, 1987; Arroyo y Orozco, 1987).

Las primeras evidencias de que la adhesión de los trofozoítos a la célula blanco está mediada por receptores específicos se obtuvieron a partir de experimentos de adhesión, utilizando eritrocitos de diferentes especies, las cuales mostraron una preferencia para unir los eritrocitos de hámster y de humano (Olguín, 1984). En este parásito se han descrito dos proteínas con actividad de lectina que se identificaron por la capacidad de los extractos amibianos para aglutinar células blanco. Una de ellas es inhibida por oligosacáridos de N-acetil-glucosamina (Kobiler y Mirelman, 1980), y tiene un peso molecular de 220 kDa (Rosales-Encinas y col, 1987). La otra lectina se inhibe por galactosa y N-acetil-

galactosamina, aglutina eritrocitos humanos y células de la línea CHO (Ravdin y Guerrant, 1981), tiene un peso molecular de 260 kDa y está formada por dos subunidades, una de 170 kDa y otra de 35 kDa (Orozco y col, 1988).

Otras proteínas que participan en la adhesión de los trofozoítos a su célula blanco son: la adhesina de 112 kDa (Arroyo y Orozco, 1987; Rodríguez y col, 1989), la proteína rica en serinas de *E. histolytica* (SREHP) de 52 kDa (Stanley y col, 1990) y las proteínas de 90, 70, 50 y 24 kDa identificadas por ensayos de ligando (Rodríguez y col, 1989).

#### ADHESINA DE 112 kDa DE *E. histolytica*

La adhesina de 112 kDa se identificó empleando anticuerpos monoclonales inhibidores de la adhesión y células mutantes deficientes en adhesión (Arroyo y Orozco, 1987). A través de estudios de microscopía electrónica e inmunofluorescencia indirecta se observó que ésta adhesina se localiza uniformemente en la superficie de los trofozoítos amibianos y en la membrana de algunas vacuolas (García-Rivera y col, 1999). Esta proteína se une específicamente a la superficie de eritrocitos humanos, reafirmando el papel que desempeña esta molécula en la interacción de los trofozoítos con la célula blanco (Rodríguez y col, 1989). Además, esta adhesina es muy inmunogénica, ya que es una de las principales proteínas reconocidas por sueros de pacientes con absceso hepático amibiano (Arroyo y Orozco, 1987). La adhesina además de mediar el contacto inicial entre el trofozoíto y los receptores de la célula blanco, podría participar en la invasión de los tejidos, puesto que la proteína purificada presenta una actividad proteolítica significativa en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina (García-Rivera y col, 1999).

La adhesina está formada por dos proteínas de 49 y 78 kDa codificadas por genes adyacentes (Fig. 3). El primer gen (*Ehcp112*) codifica para una proteína de 49 kDa con identidad a cisteína-proteinasas, mientras que el segundo (*Ehadh112*) codifica para un polipéptido de 78 kDa que contiene el epítipo reconocido por los anticuerpos monoclonales anti-adhesina. La organización de los genes que codifican para las subunidades de la adhesina sugiere una co-regulación de sus expresiones (García-Rivera, y col 1999).

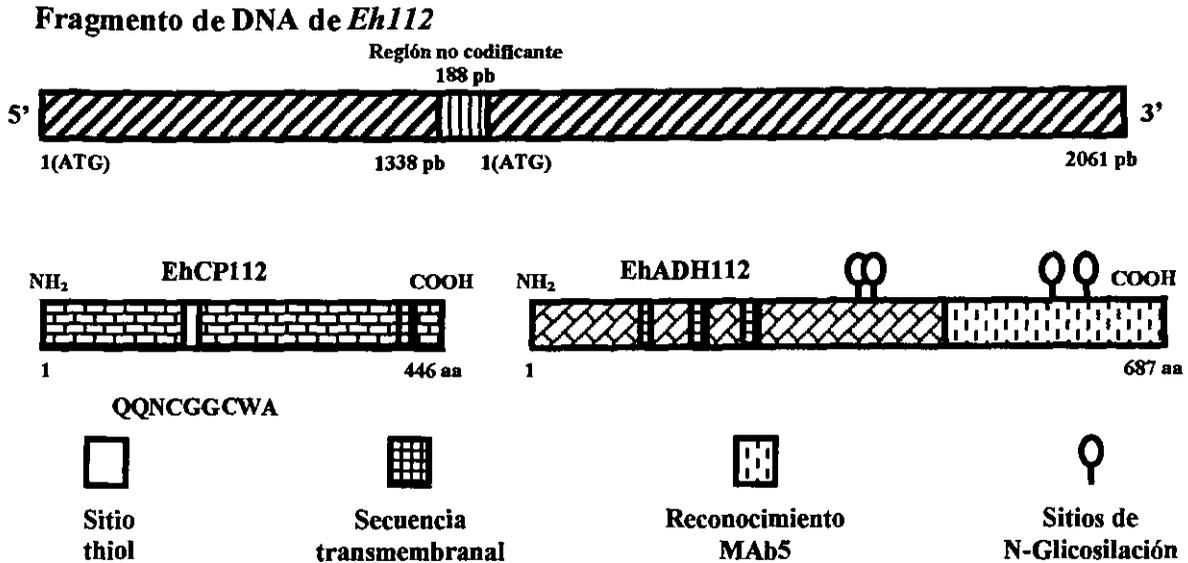


Fig. 3. Representación esquemática del fragmento de DNA de *Eh112* y péptidos. EhCP112, cisteína proteinasa; EhADH112, adhesina. (Tomado de García-Rivera y col, 1999).

### CITÓLISIS DEPENDIENTE DE CONTACTO

El efecto citoletal de los trofozoítos sobre la célula blanco fue demostrado por estudios microcinematográficos (Ravdin y col, 1980; Ravdin y Guerrant, 1981). Hasta el momento se desconoce el mecanismo exacto por medio del cual los trofozoítos amibianos lisan a la célula blanco, pero se sabe que la temperatura es un factor importante para que se efectúe ya que a 37°C se observa el óptimo de dicho mecanismo (Ravdin y Guerrant, 1981).

Los microfilamentos amibianos son necesarios para que los trofozoítos puedan lisan a la célula blanco, ya que las citocalasinas B y D, drogas que interfieren en su formación, inhiben el efecto citoletal amibiano (Ravdin y Guerrant, 1981). El flujo transmembranal de calcio también interviene en la actividad lítica de los trofozoítos amibianos, ya que agentes quelantes de calcio como el EDTA y el EGTA, inhiben el efecto citolítico del parásito sobre células blanco (Ravdin y col, 1982; Ravdin y col, 1985b).

La lisis de la célula blanco puede estar mediada, entre otros factores, por la actividad de cisteína proteinasas, ya que se ha observado que su secreción es un factor importante para determinar el grado de agresividad de los trofozoítos; además, también se ha demostrado que monocapas de fibroblastos son destruidas por las cisteína proteinasas purificadas de *E. histolytica* (Keene y col, 1990).

Otros factores que participan en el mecanismo de agresión dependiente del contacto de *E. histolytica* con sus células blanco son los lisosomas de superficie (Eaton y col, 1969), la colagenasa (Muñoz y col, 1982) y la proteína formadora de poros (Lynch y col, 1982; Young y col, 1982).

## FAGOCITOSIS

Una vez que se ha llevado a cabo la citólisis dependiente de contacto, las amibas patógenas ingieren a las células lisadas, aunque los trofozoítos también pueden ingerirlas vivas (Martínez-Palomo, 1986). Hay reportes en los que se menciona que las cepas patógenas ingieren mayor número de eritrocitos con respecto a los trofozoítos de cepas no patógenas (Trissl y col, 1978). Orozco y col, (1983 y 1985) y Rodríguez y Orozco (1986) aislaron clonas amibianas deficientes en fagocitosis a partir de trofozoítos altamente virulentos. Los trofozoítos amibianos se alimentaron con bacterias de *E. coli* Tim previamente cultivadas en un medio suplementado con bromodesoxiuridina (BrdU). Posteriormente, los trofozoítos se irradiaron con luz U V, la cual rompe el DNA en los sitios donde se incorpora la BrdU. Con este tratamiento, las amibas con mayor poder fagocítico murieron a la hora de dividirse, mientras que las que fagocitaron en menor grado sobrevivieron (Orozco y col, 1983 y 1985; Rodríguez y Orozco, 1986). Con esta estrategia se obtuvieron varias clonas, las cuales muestran una notable reducción en la velocidad de fagocitosis, en el efecto citopático y en la formación de abscesos hepáticos en animales de experimentación.

La fagocitosis en *E. histolytica* puede ser de dos tipos: a) Uno no específico, por medio del cual, los trofozoítos ingieren partículas como almidón, látex, hierro, etc., y el contacto inicial puede estar mediado por fuerzas electrostáticas (Martínez-Palomo, 1986), y b) un mecanismo altamente específico, en donde intervienen moléculas de superficie llamadas

adhesinas, que participan en el reconocimiento y unión de los trofozoítos a la célula blanco (Arroyo y Orozco, 1987). La especificidad de este mecanismo se ha comprobado en repetidas ocasiones al observarse diferentes afinidades de los trofozoítos amibianos hacia eritrocitos de diferentes especies de mamíferos y de bacterias (Ravdin y Guerrant, 1981; Bracha y col, 1982; Olguin, 1984). García-Rivera y col. (1982) demostraron al utilizar mutantes en adhesión que la disminución en esta función interfiere disminuyendo la fagocitosis de los trofozoítos amibianos.

Orozco y col. (1988) propusieron un modelo sobre la fagocitosis en *E. histolytica* (Fig. 4). Este modelo propone que los trofozoítos son atraídos quimiotácticamente hacia la célula blanco (Bailey, 1982) (Fig. 4-A). Posteriormente, se realiza la unión de los trofozoítos a la superficie de la célula blanco, en ella intervienen las adhesinas localizadas en la superficie amibiana y receptores específicos de la célula blanco (Smith, 1977; Orozco y col, 1982) (Fig. 4-B). Una vez que se lleva a cabo la unión, existe una redistribución de las células blanco en la superficie de los trofozoítos (Trissl y col, 1977; Calderón y col, 1980) (Fig. 4-C), y ocurre un desencadenamiento de señales intracelulares que permiten la secreción de enzimas, entre ellas proteinasas, que producen la lisis de la célula blanco (McLaughlin y Aley, 1985) (Fig. 4-D). Más tarde, ocurre la emisión de pseudópodos por el trofozoíto, con el objeto de envolver a la célula blanco (Fig. 4-E), permitiendo así la internalización de la vacuola fagocítica (Fig. 4-F) para su posterior fusión con el lisosoma, dando lugar a la formación del fagosoma (Chapman-Andresen, 1977) (Fig. 4-G). Finalmente, ocurre la acción de las enzimas digestivas amibianas sobre el material fagocitado y la exocitosis de material no digerido (Fig. 4-H). Así, las actividades de proteinasas son muy importantes para la lisis dependiente de contacto y en la digestión de las células fagocitadas.

En la fagocitosis también intervienen componentes del citoesqueleto (Godbold y Mann, 1998; Voigt y col, 1998), o reguladores de la estructuración del mismo (Voigt y col 1999; Ghosh y Samuelson, 1977), proteinasas (Ankri y col, 1998) y probablemente moléculas que regulan la endocitosis. Sin embargo de estas últimas se conoce poco en *E. histolytica*.

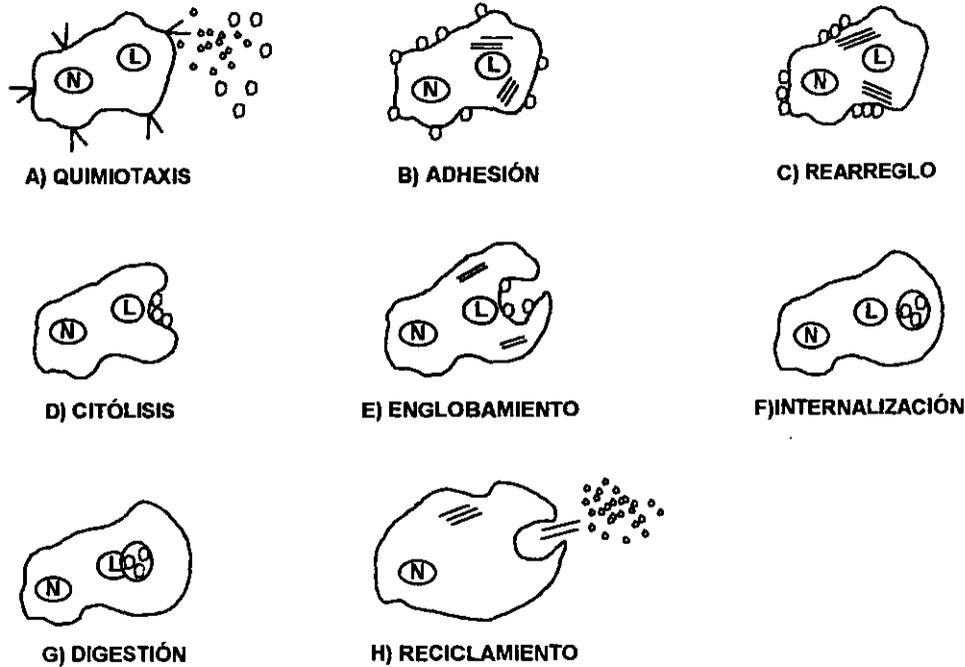


Fig. 4. **Secuencia de eventos involucrados en la fagocitosis de *E. histolytica*.** (A) Atracción quimiotáctica de los trofozoítos hacia la célula blanco; (B) Contacto específico entre células blanco y trofozoítos, mediado por adhesinas; (C) Redistribución de las células blanco hasta formar parches en sitios específicos sobre la superficie de los trofozoítos; (D) Recubrimiento de células blanco por pseudópodos (secreción de enzimas líticas); (E) Fusión de la membrana plasmática y formación del fagosoma; (F) Internalización de la envoltura membranal que contiene a la célula blanco (vesículas de fusión); (G) Acción de las enzimas digestivas amibianas sobre el material fagocitado; (H) Reciclamiento de receptores. N= núcleo; L= vesículas tipo fago-lisosoma. (Modificado de Orozco y col, 1988).

#### TRANSPORTE INTRACELULAR

Los eventos de endo y exocitosis juegan un papel importante en la patogenicidad de *E. histolytica*; sin embargo, poco se conoce acerca de las moléculas que regulan el transporte intracelular en este parásito. En las células eucariontas existe una elaborada red de membrana de los organelos, con distintas composiciones de lípidos y proteínas. Las

características únicas de los organelos son mantenidas a pesar del continuo transporte de membrana intercompartimental y los componentes solubles.

En estos organismos el transporte intracelular se lleva a cabo mediante el uso de vesículas acarreadoras. Existen dos tipos de vesículas: a) unas cubiertas con clatrina, que median el transporte de la superficie celular a través de la vía endocítica, así como también el exporte de proteínas de la red trans-Golgi a compartimentos vacuolares o lisosomales; y b) las no cubiertas con clatrina, que contienen un espectro de proteínas de cubierta que funcionalmente son iguales a la clatrina, son responsables del tráfico entre compartimentos de la vía secretoria temprana y posiblemente del tráfico del TGN (Trans Golgi Net-por sus siglas en Inglés ) a la superficie celular (Olikkonen y Stenmark, 1997).

Dos clases de proteínas han sido identificadas como esenciales en la generación y fusión de vesículas: (a) proteínas integrales de membrana necesarias para el ensamblaje vesicular y la fusión (SNAREs, por sus siglas en Inglés Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptor,-hipótesis del transporte vesicular)(Hay y Scheller, 1997); y (b) Proteínas Rab/YPT/Sec4, pequeñas GTPasas (21-25 kDa) de la superfamilia Ras, las cuales están en asociación reversible con membranas específicas (Novick y Zerial, 1997). Las proteínas Rab regulan el apareamiento de SNAREs mediante ciclos de unión a GTP e hidrólisis del mismo (Novick y Zerial, 1997; Simons y Zerial, 1993).

El concepto de las GTPasas como reguladoras del transporte vesicular se estableció con base en la identificación de las mutantes *sec4*, originalmente aisladas de un tamizaje para mutantes termosensibles de *S. cerevisiae* deficientes en secreción de proteínas (Novick y col, 1980). Estas mutantes muestran un bloqueo dependiente de temperatura en el transporte del aparato de Golgi a membrana plasmática, y la secuenciación del gen *SEC4* reveló que codifica para una proteína con 32 % de identidad para Ras (Salminen y Novick, 1987). Sec4p se ubica en tres conjuntos: un pequeño conjunto citoplásmico, otro asociado con vesículas secretoras y otro más asociado con la membrana plasmática (Goud y col, 1988). A temperatura restrictiva, una gran cantidad de vesículas secretoras se acumuló en 8 mutantes *sec4* (Salminen y Novick, 1987). Esto, junto con la localización intracelular de Sec4p y sus requerimientos para la secreción, indicaron un papel central para Sec4p en el ensamblaje o fusión de vesículas secretoras con la membrana plasmática. El hallazgo de

que una mutante de Sec4p deficiente en su actividad de GTPasa exhibió una pérdida de función del fenotipo (Walworth y col, 1992), proporcionó la pista de que se requiere un ciclo de GTPasa funcional para la actividad biológica de Sec4p; conclusiones similares se han hecho posteriormente, para varios otros miembros de la subfamilia Rab GTPasa.

Existen tres familias importantes de GTPasas involucradas en el tráfico vesicular: la primera se conoce con el nombre de Sar1p la cual controla el transporte entre el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi (en levaduras); ARF (Factor de ribosilación ADP) que controlan el ensamble y/o formación de la cubierta de clatrina en vesículas entre el complejo de Golgi; y Rab/YPT, necesarias para la formación y/o consumo de vesículas (Schmid, 1993).

La variedad y distribución de las proteínas Rab/YTP en las células (Fig. 5) sugieren que tienen papeles específicos (Tabla 1), pero todas comparten una función común, la unión e hidrólisis de GTP (tri-fosfato de guanidina). La unión con GDP (di-fosfato de guanidina), es la forma inactiva y la interacción con GTP es una forma activa. (Zerial y Stenmark, 1993).

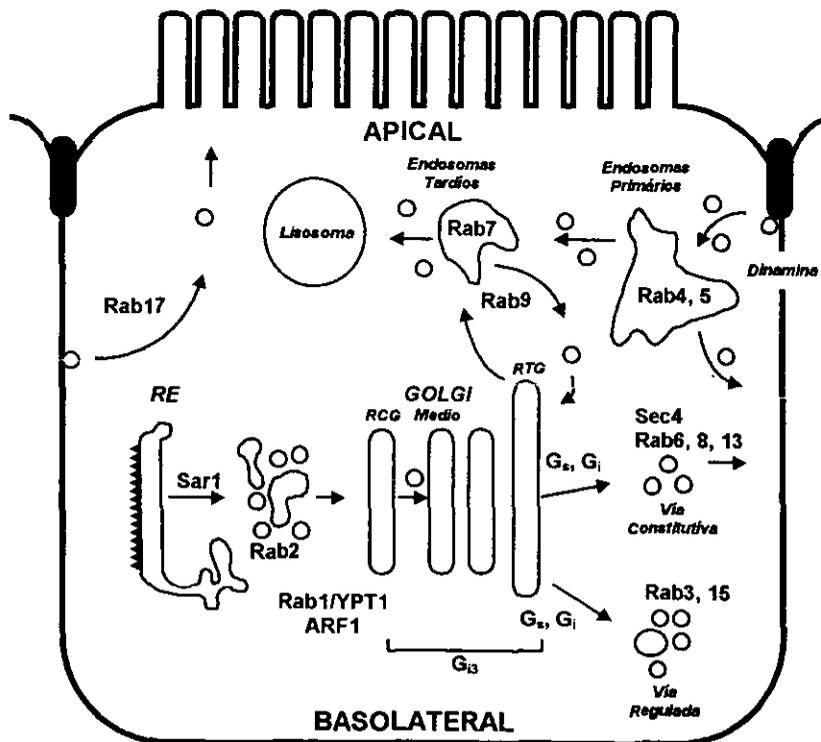


Fig. 5. Distribución de las GTPasas (Sar1, ARF1 y Rabs) a lo largo de los compartimentos de las vías endo y exocíticas. (Tomado de Olkkonen y Stenmark, 1997).

Tabla 1. Resumen de la localización, propiedades funcionales y componentes interactuantes de Ypt1, Sec4 y proteínas Rab en levaduras y células de mamífero. (Modificado de Olkkonen y Stenmark, 1997).

PROTEÍNA	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN	REFERENCIAS
Ypt1 (Levadura) =Rab1	RE-Golgi	Fusión de vesículas post-R.E. con el Golgi.	Bacon y col, 1989
Sec4 (Levadura)	Vesículas secretoras-Membrana plasmática	Fusión de vesículas post-Golgi con membrana plasmática	Walworth y col, 1989
Rab1a	R-E-Golgi, C.I Cis, Golgi-R.E.	Transporte RE-Golgi en levaduras y células de mamífero	Touchot y col, 1987 Zahraoui y col, 1989
Rab1b	RE-Golgi	Transporte RE-cis-Golgi y cis-Golgi medio	Plutner y col, 1991
Rab2	RE-Golgi, Compartimento intermedio	Transporte del Golgi al R:E?	Touchot y col, 1987 Chavrier y col, 1990
Rab3a	Vesículas sinápticas, gránulos cromafínicos	Ensamblaje y fusión en eventos secretorios, actividad GTPasa requerida para la fusión	Fischer Von Mollard y col, 1990
Rab4a	Endosomas primarios	Vía de reciclaje endosomas primarios-membrana plasmática	Daro y col, 1996
Rab5a	Membrana plasmática, vesículas cubiertas con clatrina, endosomas primarios	Transporte membrana plasmática-endosomas primarios y fusión homotípica entre endosomas primarios	Fischer Von Mollard y col, 1994
Rab6	Golgi medio-RTG	Transporte intra-Golgi	Haubruck y col, 1987 Karniguan y col, 1993 Antony y col, 1992
Ypt7 (Levadura)	No determinada	Transporte de los endosomas a vacuolas, fusión homotípica de las vacuolas	Haubruck y col, 1987 Touchot y col, 1987
Rab7	Endosomas tardíos	Transporte endosomas tardíos a lisosomales	Chavrier y col, 1990
Rab8	Post-Golgi basolateral, vesículas secretoras	Transporte Golgi-membrana plasmática	Huber y col, 1993
Rab9	Endosomas tardíos, RTG	Transporte de endosomas tardíos a la RTG	Pfeffer, 1994 Riederer y col, 1994
Rab17	Túbulos densos apicales, membrana plasmática basolateral	No determinada	Lutcke y col, 1993

## PEQUEÑAS GTPasas EN LA REGULACIÓN DEL TRANSPORTE INTRACELULAR

Las GTPasas de la subfamilia Rab GTPasa pertenecen a la superfamilia de pequeñas Ras GTPasas (21-25 kDa) que consiste de tres principales subfamilias, las proteínas Ras, Rho y Rab, así como los pequeños grupos ARF, Sar y Ran. El grado de identidad de los aminoácidos entre los miembros de las diferentes subfamilias es de aproximadamente 30 % (Valencia y col, 1991; Sander y Valencia, 1995). El más alto grado de secuencia conservada se observa en regiones que están directamente involucradas en la unión del nucleótido guanina y en la hidrólisis de GTP.

### RAB

Los modelos estructurales para las Rab GTPasas están basados en las estructuras cristalinas determinadas para Ras (Pai y col, 1989, 1990; Milburn y col, 1990), el factor de alargamiento TU (Jurnak, 1985; LaCour y col, 1985; Berchtold y col, 1993) y del factor de transducción  $\alpha$  (Noel y col, 1993). Estos estudios revelan un alto pliegue conservado del dominio de unión a GTP (Fig. 6), en donde los elementos de unión a los nucleótidos están localizados en cinco asas, conectando cadenas beta y alfa hélice. La estructura consiste de dos subdominios (Fig. 7): El N-terminal tiene cuatro cadenas beta y dos alfa hélice y contiene las asas con los motivos de unión a  $Mg^{2+}$  PM1, PM2, y PM3 así como el motivo de unión a la base guanina G1 (Fig. 7). El subdominio C-terminal consiste de dos cadenas beta, dos alfa hélice, y asas conteniendo las regiones de unión a base guanina G2 y G3 (Fig. 7). La estructura conservada del dominio de unión a GTP ha sido utilizada como la base para el modelaje molecular de otros miembros de la superfamilia Ras.

Un dominio de secuencia claramente diferenciable entre los miembros de la superfamilia Ras es la llamada región efectora, localizada en el asa 2, y el inicio de la cadena beta 2', alrededor de la secuencia conservada PM2 (Fig. 7). En el grupo Rab la secuencia consenso TIG(I/V/A)(D/E)F(K/G/L) se establece aquí. La estructura es llamada región efectora en analogía con el segmento correspondiente en las proteínas Ras, en donde éste media la interacción con otras proteínas, activando funciones en la señalización de Ras (Marshall, 1993, 1995; Marshall, 1996). En el caso de la subfamilia Rab, el papel de la región efectora

en la interacción con otras moléculas no está completamente caracterizado; sin embargo, está claro que esta secuencia es altamente sensible a alteraciones de la secuencia de aminoácidos.

Las partes más divergentes de las secuencias aminoacídicas de Rab son las regiones N y C-terminal. La C-terminal de todos los miembros de la subfamilia lleva una cisteína que contiene una modificación hidrofóbica (geranil-geranilo) (Fig. 7), la cual es un absoluto prerrequisito para la asociación membranal de las proteínas. La región C-terminal hipervariable contiene la información para la localización correcta de las proteínas Rab en sus sitios específicos dentro de la célula, como se muestra en Rab2, Rab5a y Rab7 (Chavrier y col, 1991), así como el Ypt1p y Sec4p (Brennwald y Novick, 1993).

La subfamilia Rab muestra en promedio una región variable N-terminal más grande que la de otras proteínas relacionadas con Ras. La gran extensión de la región N-terminal se establece en Rab3c, donde existen 31 aminoácidos antes de la lisina conservada en la posición -5 de el dominio PM1 (Matsui y col., 1988).

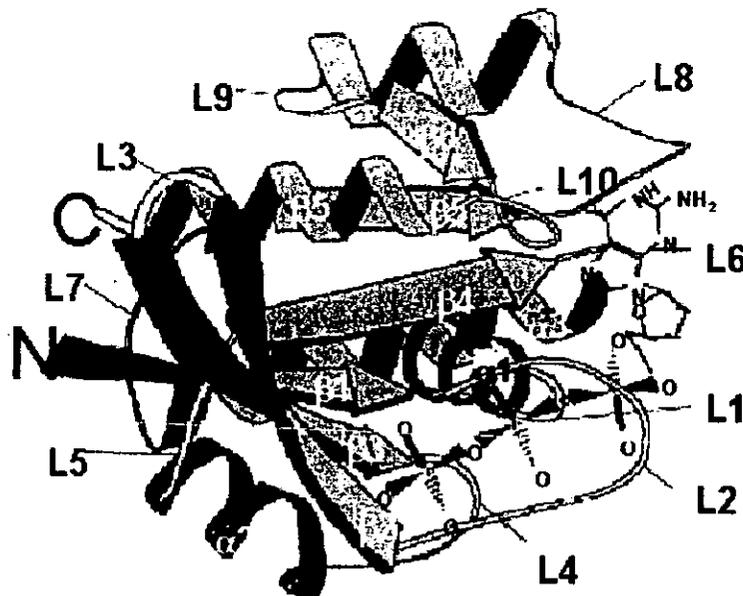
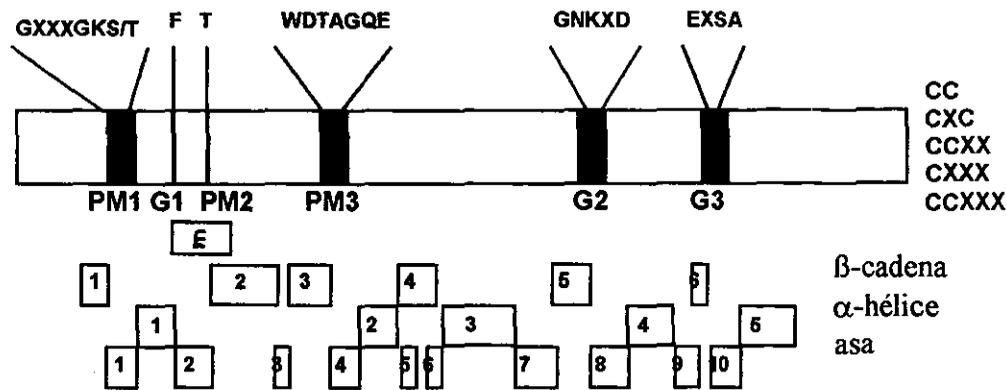


Fig. 6. Estructura de las Rab GTPasas. Plegamiento tridimensional del dominio GTPasa de Ras con una molécula GTP unida, el cual ha sido utilizado como un cuadro en el modelaje molecular de estructuras Rab (Modificado de Olkkonen y Stenmark, 1997).



**Fig. 7. Estructura lineal de las Rab GTPasas.** Los motivos conservados involucrados en la unión del nucleótido e hidrólisis están indicados en negro. PM1, PM2 y PM3 representan los motivos de unión a  $Mg^{2+}$  y G1, G2 y G3 los motivos de unión a la base G. Los residuos de aminoácidos altamente conservados (en código de una letra) en estos motivos se muestran arriba del diagrama. La caja marcada con E denota la región “efectora”. Las cinco señales alternativas de isoprenilación C-terminal están indicadas a la derecha: C, cisteína; X, cualquier aminoácido (Tomado de Olkkonen y Stenmark, 1997).

#### CICLO FUNCIONAL DE LAS PROTEINAS Rab

Bourne (1988) desarrolló un modelo (Fig. 8) en el cual las Rab-GTPasas, por un principio funcional análogo para que la síntesis proteica por el factor de alargamiento TU, pueden actuar como “switches” moleculares, mediando el transporte vectorial de vesículas entre dos compartimentos de membrana. En este esquema la GTPasa se uniría a una proteína hipotética de reconocimiento sobre vesículas que brotan de una membrana donadora, y este complejo a su vez habría de reconocer un acoplamiento proteico sobre la membrana específica aceptora, seguido por la hidrólisis del GTP, la fusión de membranas, y el reciclamiento del GDP (Fig. 8). El modelo tiene una considerable vida larga y forma el centro de los esquemas que describen el ciclo funcional de las GTPasas, aunque esta secuencia detallada de eventos no puede asumirse como un paradigma general para la función de las GTPasas.

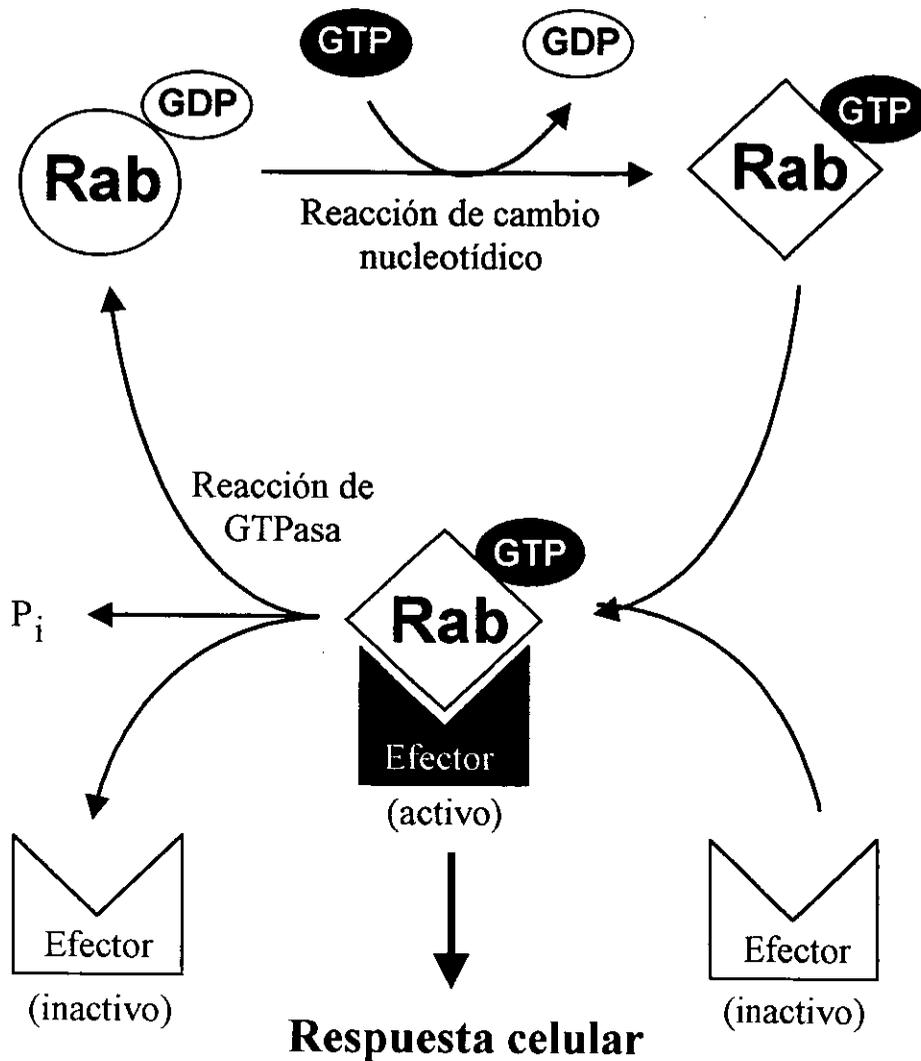


Fig. 8. Ciclo de GTPasa de las proteínas Rab. Después del cambio de una forma GDP por una GTP, la proteína sufre un cambio conformacional. La forma GTP produce ligaduras y activa moléculas efectoras específicas, lo cual induce una respuesta celular (fusión de membrana). El efector se separa después de la hidrólisis de GTP, y la proteína Rab regresa a su conformación GDP "inactiva". Por esa alternancia entre las conformaciones GDP y GTP, Rab en consecuencia actúa como un "switch molecular" regulando el transporte intracelular (Tomado de Olkkonen y Stenmark, 1997).

De acuerdo con el modelo descrito anteriormente, cada evento de fusión de membrana en las células eucariontas requiere una GTPasa específica, necesitando de un alto número de diferentes GTPasas con localizaciones distintas sobre los compartimentos intracelulares de membrana. Las primeras GTPasas con estas funciones en *S. cerevisiae* y mamíferos, fueron identificadas por los grupos de Gallwitz y Tavitian (Haubruck y col, 1987; Touchot y col, 1987). Además, la hipótesis de Bourne (1988) fue sostenida por los primeros estudios sobre la distribución de las Rab GTPasas de mamífero, los cuales demostraron localizaciones específicas de estas proteínas a lo largo de las rutas de transporte endocíticas y biosintéticas (Chavrier y col, 1990a; Goud y col, 1990). Desde entonces, los trabajos de clonación han revelado una familia grande de Rab GTPasas en células de mamífero, que consiste hasta el momento de más de 40 miembros. Durante los años de 1990's hemos visto la identificación y la caracterización básica de un considerable número de proteínas Rab en gran variedad de organismos (Olkkonen y Stenmark, 1997). Las proteínas Rab caracterizadas son ampliamente utilizadas como marcadores subcelulares en estudios morfológicos y bioquímicos. Asumiendo que una o más Rab GTPasas están involucradas en cada evento de fusión específica de membrana, la caracterización minuciosa de un considerable número de estas proteínas puede ayudar para formar un cuadro más comprensible de la organización de las rutas de transporte intracelular. Sin embargo, la tarea más importante hasta el momento es el elucidar la(s) función(es) precisa(s) de las Rab GTPasas en la comunicación de las membranas biológicas.

Una de las pruebas clave para la función de Rab ha sido la mutagénesis de residuos esenciales en aminoácidos específicos para la unión del nucleótido guanina o la hidrólisis de GTP por las proteínas (Tabla 2). Los efectos de la expresión de las proteínas mutantes han sido determinados morfológicamente y/o bioquímicamente. El cambio de aminoácidos a mutagenizar se basa en la caracterización completa de mutaciones descritas en otras GTPasas principalmente las oncoproteínas Ras. Mutaciones equivalentes a la mutación Q61L (en la secuencia motivo conservada PM3) disminuyen la actividad de GTPasa de 10 hasta 100 veces, lo cual estabiliza la unión GTP, por lo que se activa la proteína (Der y col, 1986; Adari y col, 1988; Stenmark y col, 1994; Hoffenberg y col, 1995).

Otros tipos de mutaciones comunmente usados son los correspondientes a la mutación Ras transformante N116I en el dominio G2 la cual reduce la afinidad de las proteínas por los nucleótidos de guanina (Walter y col, 1986; Hoffenberg y col, 1995; Jones y col, 1995). Los efectos de esta mutación en la subfamilia Rab fueron primeramente estudiados por Schmitt y col. (1986), quien mutagenizó el Ypt1p de *S. cerevisiae*, esencial para un fenotipo letal dominante. Walworth y col. (1989) generando una mutación similar en Sec4p, establecieron que el alelo mutante induce un defecto secretor dominante. La proteína mutante se identifica por presentar un tipo muy rápido de cambio del nucleótido, por lo que una mayor proporción de la proteína está asociada con GTP. Esto explicaría la transformación activa de la proteína Ras mutante; en el caso de las Rabs el ciclo GTPasa normal podría bloquearse, conduciendo a la unión no productiva y al secuestro de las moléculas efectoras (Hoffenberg y col, 1995).

Tabla 2. Mutaciones Rab que afectan el ciclo GTP/GDP de las proteínas (Tomado de Olkkonen y Stenmark, 1997).

Mutación correspondiente	Ras	Propiedades bioquímicas	Fenotipo Ras	Fenotipo Rab
S17N		Unión preferencial de GDP	Inhibitorio	Inhibitorio
Q61I		Actividad GTPasa reducida	Fuertemente activado	Estimulante sobre el ensamblaje de vesículas, efecto sobre fusiones varias entre las Rabs
N116I		Baja afinidad por GTP/GDP	Débilmente activado	Inhibitorio
D119N		Baja afinidad por GTP/GDP, alta afinidad por XTP/XDP	ND	Inhibitorio en la ausencia de XTP
--				

ND, No determinado.

XTP/XDP, Xantosin 5'-tri/difosfato.

## ANTECEDENTES

Como ya se mencionó, en eucariontes superiores las proteínas Rab regulan el tráfico vesicular y la variedad de estas proteínas correlaciona con la diversidad de las rutas de transporte en los diferentes tipos celulares.

Una característica remarcable de *E. histolytica*, es su alta actividad endo y exocítica incluyendo la velocidad de fagocitosis y la secreción de proteasas, ambas funciones relacionadas con la patogenicidad del parásito (Orozco y col, 1983; Rodríguez y Orozco, 1986; Muñoz y col, 1991; McKerrow y col, 1993). Sin embargo, organelos y moléculas involucradas en las vías endocítica y exocítica están pobremente definidas en los trofozoítos.

Por microscopía electrónica de transmisión, los trofozoítos de *E. histolytica* no muestran los típicos organelos de eucariontes como las mitocondrias, retículo endoplásmico o complejo de Golgi (Rosenbaum y Wittner, 1970; Feria-Velasco y Treviño, 1972; Serrano y col, 1977). Tienen un gran número de vesículas citoplásmicas de diferente tamaño y forma y algunas de estas podrían realizar ciertas funciones del retículo endoplásmico y del complejo Golgi (Mazzuco y col, 1997; Ghosh y col, 1999).

Genes que codifican para ARF, SRP54, ERD2 y proteínas Rab, los cuales están involucrados en el transporte intracelular en eucariontes superiores, han sido clonados de trofozoítos (Ghosh y col, 1999; Ramos y col, 1997; Sánchez-López y col, 1998; Tanaka y col, 1997; Temesvari y col, 1999), sugiriendo que los trofozoítos de *E. histolytica* tienen una maquinaria de transporte similar a la de eucariontes superiores, pero tienen un retículo endoplásmico y un aparato de Golgi estructuralmente primitivos.

La elevada actividad endocítica y exocítica exhibida por los trofozoítos de *E. histolytica* podría estar regulada por proteínas relacionadas con miembros de la familia Rab, entre otras. De hecho, proteínas similares a Rab7 y Rab11 enriquecidas en los compartimentos endosomales de *E. histolytica*, y la proteína RabA, con función desconocida han sido recientemente reportadas (Temesvari y col, 1999). Estas y otras proteínas Rab pueden estar asociadas con el transporte de otras moléculas ya descritas en *E. histolytica*, tales como la proteína de superficie de membrana de 112kDa involucrada en la adhesión y el efecto citopático sobre las células blanco.

Recientemente, Rodríguez y col (2000) identificaron un gen que codifica para una proteína involucrada en el transporte celular de *E. histolytica*. Este gen (*EhrabB*) se encontró codificado en la cadena complementaria (Fig. 10) a 332 pb del gen que codifica para la subunidad con actividad de proteasa de la adhesina de 112 kDa (*Ehcp112*). El gen estructural, al que llamaron *EhrabB*, consta de 576 pb y codifica para una proteína de 192 aminoácidos con 40-42% de identidad a pequeñas GTPasas de la familia Rab. La proteína (EhRabB) recombinante une específicamente GTP/GDP, y utilizando anticuerpos específicos y microscopía confocal, EhRabB fue localizada en pequeñas vesículas citoplásmicas que se translocan a la membrana plasmática en los primeros minutos de la fagocitosis (Fig. 9), sugiriendo que esta proteína puede estar regulando ciertas etapas de la fagocitosis y que su expresión pudiera ser regulada por la presencia o contacto con la célula blanco.

El estudio de la expresión de esta proteína probablemente involucrada en la regulación de la fagocitosis, uno de los eventos de patogenicidad de *E. histolytica*, ayudaría a comprender los mecanismos moleculares que regulan la virulencia de este parásito.

La organización genómica de los genes *EhrabB*, *Ehcp112* y *Ehadh112* (Fig. 10), su vecindad y sus opuestos marcos de lectura abiertos, sugieren como una hipótesis de trabajo, que su expresión puede ser co-regulada, y que las funciones de EhCP112 y EhRabB pudieran estar relacionadas. EhCP112 es una cisteína proteinasa la cual es secretada (García-Rivera, resultados no publicados), mientras que la proteína EhADH112 está involucrada en la adhesión y fagocitosis de las células blanco. Ambas proteínas son traslocadas de la membrana plasmática a vacuolas fagocíticas durante la fagocitosis (García-Rivera y col, 1999). EhRabB podría participar en el transporte de éstas y otras moléculas.

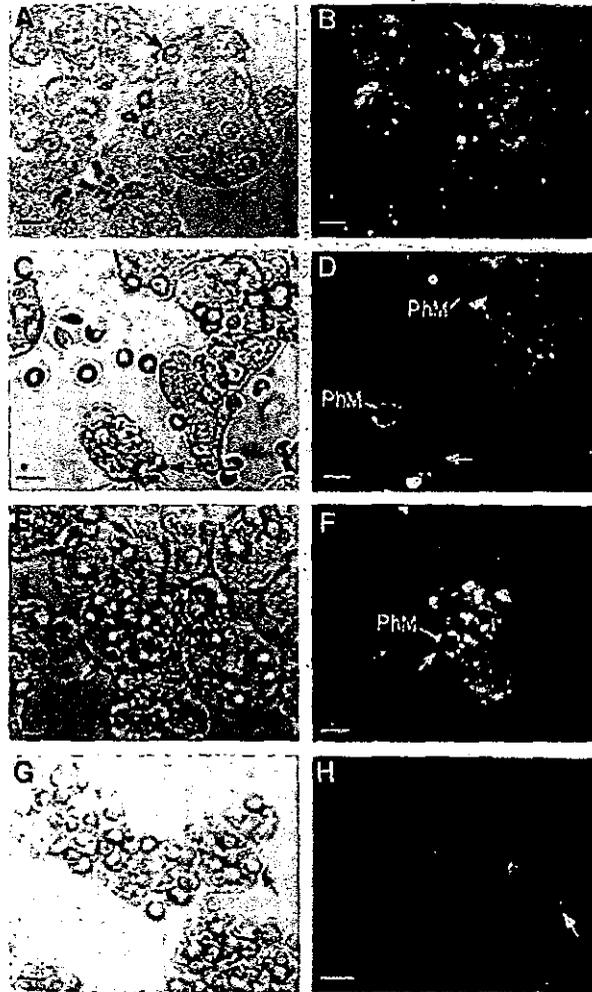


Fig. 9. **Inmunolocalización de EhRabB durante la fagocitosis de eritrocitos.** Trofozoítos incubados con eritrocitos humanos durante diferentes tiempos. Posteriormente las muestras fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anticuerpos contra el péptido RabB y con un anticuerpo secundario fluoresceinado. Las muestras fueron observadas por microscopía confocal. (A, C, E, G) contraste de fases; (B, D, F, H) inmunofluorescencia. (A, B) 30 seg; (C, D) 2 min; (E, F) 5 min; (G, H) 10 minutos de fagocitosis. Flechas indican algunos eritrocitos. PhM, bocas fagocíticas. Barras, 10  $\mu$ m (Tomado de Rodríguez y col, 2000).

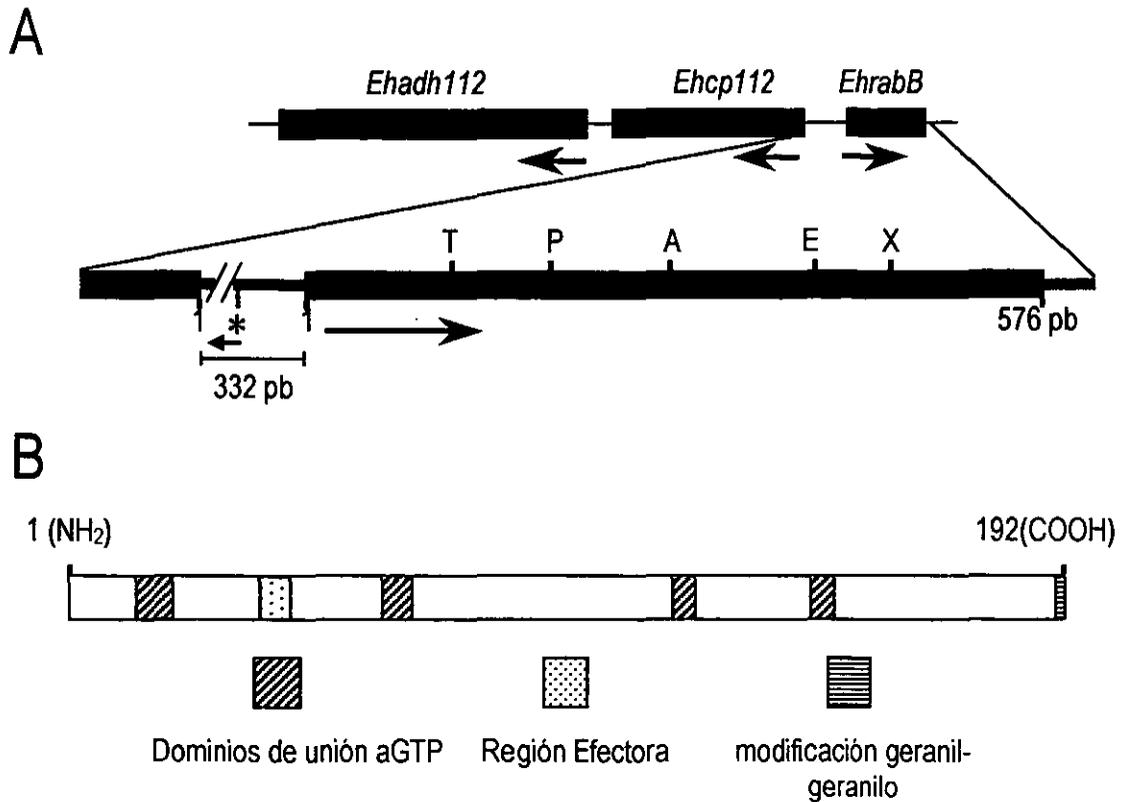


Fig. 10. (A). Organización genómica de los genes *EhrabB* y de la adhesina de 112 kDa (*Ehadh112* y *Ehcp112*) y mapa físico del gen *EhrabB*. ■ Regiones codificantes de los genes; — regiones no codificantes; → sentido de la transcripción; \* sitio de inicio de la transcripción de *Ehcp112*. (B). Mapa de la proteína EhRabB. Las diferentes regiones marcadas representan los dominios de unión a GTP, la región efectora y el dominio de modificación por geranyl-geranilo de acuerdo a la secuencia aminoacídica (Tomado de Rodríguez y col, 2000).

## JUSTIFICACIÓN

El gen *EhrabB* fue identificado en una clona genómica que contiene los genes que codifican las subunidades de la adhesina de 112 kDa. La organización de los genes en esta clona sugiere la posibilidad de una regulación coordinada entre el gen *EhrabB* y los genes de la adhesina, implicando que *EhrabB* pudiera participar como un regulador de procesos endocíticos relacionados con la virulencia amibiana, como ha sido propuesto por Rodríguez y col (2000). Sin embargo, es necesario determinar que la organización de los genes *EhrabB* y *Ehcp112* es similar a la encontrada en la clona y que ésta no es resultado de un artefacto creado durante la construcción del banco genómico de la que fue aislada. Además, es necesario determinar si *EhrabB* es un gen activo y si, como lo sugiere su organización genómica, su expresión está relacionada con la presencia de la célula blanco.

Con base en los antecedentes planteados en este trabajo nos proponemos los siguientes objetivos:

### **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la expresión del gen *EhrabB* en los trofozoítos de *E. histolytica*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Verificar la organización de los genes *EhrabB* y *Ehcp112* en el DNA de *E. histolytica*.
2. Analizar la expresión del RNAm de *EhrabB* en los trofozoítos amibianos.
3. Identificar el sitio de inicio de la transcripción del gen *EhrabB*.
4. Analizar la expresión de la proteína EhRabB en los trofozoítos amibianos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. CULTIVO DE TROFOZOÍTOS DE *E. histolytica*

Los trofozoítos se cultivaron axénicamente a 37°C en medio TYI-S-33 (Diamond y col, 1978) (ver apéndice), suplementado con 15% de suero bovino (HyClone Laboratories, USA) inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 min, 3% de mezcla de vitaminas de Diamond (KC Biological, USA), 40 UI de penicilina/ml y 57 µg/ml de estreptomina (Lakeside). Para cosechar los parásitos en fase logarítmica de crecimiento ( $1 \times 10^6$  trofozoítos/ml) los cultivos se incubaron a 4°C para desprenderlos de las paredes del tubo. Entonces, las células se centrifugaron a 400 X g por 7 min. Las pastillas celulares se lavaron con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS 1X, ver apéndice) a 4°C y las células se cuantificaron con cámara de Neubauer.

### 2. OBTENCIÓN DEL DNA.

La obtención del DNA genómico de *E. histolytica* se realizó mediante la utilización de gradientes de Cloruro de Cesio en presencia de Bromuro de Etidio (BrEt) (Ausubel y col, 1994). Para esto, una pastilla de aproximadamente 76 millones de trofozoítos se secó lo más posible y se pasó rápidamente a nitrógeno líquido para congelarla, después se almacenó a -70°C durante por lo menos 2 horas. La muestra se sacó y antes de que se descongelara se le agregó 200 µl de Sarcosyl al 20% y 200 µl de Proteinasa K (20 mg/ml). La pastilla se resuspendió y se incubó a 55°C durante 2 horas. Después, se agregó a la muestra CsCl hasta un índice de refracción (n), = 1.3838 (aprox. 1.4 g de CsCl/5ml de suspensión celular), se adicionaron 75 µl de BrEt (10 mg/ml) y se mezcló suavemente. La muestra se cargó en un gradiente formado en un tubo para rotor 50 Ti (Beckman), este gradiente se formó de la siguiente manera: en la parte del fondo del tubo se pusieron 4 ml de solución de CsCl n= 1.4190, seguidos por la solución de la muestra CsCl n= 1.3838 y 4 ml de la solución CsCl n= 1.3640, la parte superior del tubo se llenó con aceite mineral. La mezcla se centrifugó a 183,000 X g durante 18 horas a 20°C, al finalizar la corrida la banda de DNA se localizó con un transiluminador de luz U V (UVP, U.S.A). Esta banda de DNA

se recolectó en un tubo de 15 ml, se calculó el volumen obtenido y el BrEt se eliminó extrayéndolo con isopropanol volumen a volumen, después de esto la muestra se dializó con TE (Tris 10mM, EDTA 1 mM) pH 8 estéril, durante toda la noche. Al término el DNA se precipitó adicionando 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 3 volúmenes de etanol absoluto dejándose 10 minutos en nitrógeno líquido, para después centrifugar a 12,000 X g, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en 400 µl de agua estéril y el DNA se cuantificó espectrofotométricamente a 260/280 nm, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -20°C. La integridad del DNA se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1% en solución de TBE 1X (ver apéndice), para ello se mezclaron 50 ng de DNA con 1 µl de solución amortiguadora de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30% en agua bidestilada ) y se depositaron en un pozo. El corrimiento se llevó a cabo a 100 voltios durante 20 min aproximadamente. Para detectar el DNA, los geles se sumergieron en una solución de BrEt (0.5 µg/ml) durante dos minutos, se lavaron con agua destilada y el DNA se visualizó con la ayuda de un transiluminador de luz U V (UVP, U.S.A).

### 3. DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES (PRIMERS) Y PCR.

Para verificar la organización de los genes *EhrabB* y *Ehcp112*, se realizó la amplificación de un fragmento de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la amplificación se utilizó como iniciadores oligonucleótidos localizados en la secuencia 82-64 pb (5'-GGT CAC AAT ACT GAC GAA-3') del sitio de inicio de la traducción (ATG) del gen *EhrabB* (RabPE2) (Rodríguez y col, 2000), y en la secuencia 368-351 pb (5'-CCA TGG AAT GAA GTA CC-3') del primer ATG del gen *Ehcp112* (G13) (García-Rivera y col, 1999).

Para la PCR se utilizaron, 30 ng de DNA genómico de *E histolytica*, 200 ng de cada uno de los nucleótidos iniciadores (RabPE2 y G13), 20 mM de cada dNTP ( dATP, dCTP, dTTP y dGTP), solución amortiguadora 10X (Gibco, BRL), 50 mM de cloruro de magnesio, 1 U de la enzima Taq DNA polimerasa (Gibco, BRL) y agua bidestilada en un volumen de reacción de 30 µl. Como control positivo se utilizaron 30 ng de DNA del plásmido pG1 el cual contiene gran parte del gen de la adhesina de 112kDa y el gen

*EhrabB* completo (García-Rivera y col, 1999; Rodríguez y col, 2000) y para el control negativo no se agregó DNA. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp Perkin Elmer PCR System 9600 utilizando el siguiente programa: una desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, 30 ciclos a 94°C por 1 min, 45°C por 1 min y 72°C por 1 min, finalmente se realizó una extensión adicional a 72°C por 7 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1%.

#### 4. EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL

Para aislar el RNA, los trofozoítos se cosecharon y cuantificaron como se mencionó anteriormente. Para la lisis celular se utilizó 1 ml de la solución Trizol (Gibco, BRL) por cada  $1 \times 10^7$  células. Después de adicionar el Trizol, la mezcla se homogenizó por inversión, las muestras se transfirieron a tubos eppendorf 1.5 ml nuevos y estériles y se incubaron 5 min a temperatura ambiente, pasado este tiempo se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo, se agitó suavemente con vórtex durante 15 seg, las muestras se incubaron 3 min a temperatura ambiente, se centrifugaron a 15,300 X g a 4°C durante 15 min y la fase acuosa se transfirió a otro tubo nuevo y estéril. A esta fase se agregaron 500  $\mu$ l de isopropanol y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, después se centrifugó a 15,300 X g a 4°C, durante 10 min, las pastillas se lavaron 3 veces con etanol al 75%, y se dejaron secar unos 10 min. El RNA se resuspendió en 45  $\mu$ l de agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC) (ver apéndice). La cantidad de RNA obtenida se cuantificó espectrofotométricamente a 260 /280 nm. El RNA se precipitó con 1/10 del volumen de acetato de Sodio 3M, pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, se hicieron alícuotas y el RNA se almacenó a -70°C. La integridad del RNA se verificó mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa-formaldehído al 1.2 % (ver más adelante).

#### 5. ENSAYOS DE HIBRIDACIÓN (NORTHERN-BLOT).

El RNA total se separó en geles desnaturalizantes de acuerdo a como lo describen Lehrach y col (1977) con algunas modificaciones. El gel (al 1.2 %) se preparó de la siguiente manera: 0.6 g de agarosa se fundieron en 43.5 ml de agua-DEPC, se dejó enfriar a

60°C unos 20 min, y se le adicionaron 5 ml de solución amortiguadora de MOPS 10X (ácido morfolino propano-sulfónico) (ver apéndice), 1.5 ml de formaldehído al 37 %, se agitó un momento para homogenizar, se vertió de inmediato sobre el molde de una cámara de electroforesis EASY-CAST (Owl Scientific, Inc.) y se dejó solidificar. Las muestras de RNA de 10 µg se mezclaron con 5 µl buffer regulador de corrida MOPS 10X, 8.75 µl de formaldehído al 37%, 25 µl de formamida y agua DEPC cbp un volúmen final de 50 µl. Las muestras se incubaron a 65°C por 15 min y se enfriaron en hielo, se les adicionaron 5 µl de amortiguador de muestra y 2 µl de BrEt (0.5 µg/ml) y se cargaron en el gel de agarosa al 1.2 % con formaldehído, el gel se corrió aproximadamente 2 h a 60 voltios. El gel de electroforesis de RNA se tiñó durante 3 min en BrEt (10 mg/ml), se enjuagó dos veces con suficiente solución SSC 10X (ver apéndice) (en agua DEPC) se irradió con luz UV un entrecruzador (Stratalinker-Stratagene), y registró la imagen en el equipo Gel-Doc (Bio-Rad). Posteriormente, el RNA se transfirió a filtros de nylon durante toda la noche bajo condiciones estándar (Sambrook y col, 1989) utilizando como acarreador SSC 10X. El RNA se fijó a los filtros de nylon por irradiación con luz ultravioleta durante 2 min en un entrecruzador (UV-Stralinker, Stratagene).

El marcaje de la sonda de *EhrabB* (el gen completo) se realizó por la técnica de "Random primer" (Sambrook y col, 1989) utilizando el Kit Rad prime DNA Labeling System (Gibco, BRL). Para ello 25 ng de la sonda disueltos en 23 µl de agua estéril se desnaturalizaron mediante la incubación a 94°C durante 5 minutos, se sacó de inmediato y se pasó unos instantes en hielo, después se adicionaron 20 µl de solución amortiguadora 2.5X (Random Primers Solution), 1µl de cada desoxinucleótido dCTP, dGTP y dTTP a 0.5 mM c/u, más 3 µl de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP, se mezcló brevemente y se adicionó 1µl del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, para un volúmen final de 50 µl. Esta mezcla se incubó a 37°C durante por lo menos 15 minutos, posteriormente se adicionaron 5µl de solución de paro, y los nucleótidos no incorporados se eliminaron por medio de una columna de Sephadex G-50, equilibrada con solución amortiguadora TEN (ver apéndice). Los 55 µl de reacción se diluyeron en 145 µl de agua o T E (ver apéndice) para tener un volúmen de 200 µl que se agregaron a la columna para después centrifugar a 3,000 X g durante 2 min y así recolectar en un tubo eppendorf (al fondo de la columna) la sonda marcada. Nuevamente se

lavó la columna con 200 µl más de agua para tratar de recuperar lo más posible de esta. La actividad específica de la sonda, se determinó directamente en un contador de centelleo tomando 1 µl de sonda y agregandolo a 5 ml de líquido de centelleo (ver apéndice).

La hibridación se realizó de acuerdo al método descrito por Sánchez y col. (1994). La prehibridación del filtro de nylon se realizó a 42°C durante por lo menos dos horas en: SSC 6 X, SDS (sodio dodecilsulfato) 1%, formamida desionizada 50%, solución de Denhardt 5 X (ficoll 0.1%; polivinilpirrolidona 0.1%; albúmina 0.1%), DNA (desnaturalizado) 100µg/ml de esperma de salmón (ver apéndice), y agua bidestilada estéril. La hibridación se realizó a 42°C durante toda la noche (18 h, por lo menos) en la solución anterior adicionada con  $1.5 \times 10^6$  cpm/ml de la sonda de DNA marcada. Después de la hibridación los filtros se lavaron 4 veces a 42°C en SSC 1 X (NaCl 0.3 M, citrato de sodio 0.03 M). Finalmente, los filtros se expusieron a una placa de rayos X (X-OMAT, Kodak) por 9 días a -70°C en presencia de una pantalla intensificadora.

## 6. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN.

Para ubicar el (los) sitio (s) de inicio de la transcripción del gen *EhrabB* se realizó tanto una reacción de secuenciación como una reacción de "Primer Extension".

La primera de estas reacciones se realizó siguiendo el método de secuenciación de DNA con didesoxinucleótidos terminadores de cadena (Sanger y col, 1977) utilizando el kit Sequenase Versión 2.0 (USB, USA). La mezcla de reacción consistió en DNA del plásmido pG1 (5 µg/6µl), 200 ng (2 µl) del oligonucleótido Rab PE2 (5'-GGT CAC AAT ACT GAC GAA-3') localizado a 64 nucleótidos río abajo del codón de inicio de la traducción del gen *EhrabB*, 1 µl de NaOH 1 M, 1 µl dimetilsulfóxido (DMSO) y 1 µl de agua, para un volumen de 11 µl que primeramente se incubó a 68°C durante 10 min, se centrifugó 10 seg y se adicionaron 4 µl de solución TDMN (ver apéndice), para mantener la mezcla 10 min a temperatura ambiente, a esos 15 µl se les adicionó 1 µl de DMSO, 1.5 µl de Ditiotretitol (DTT) 0.1 M, 1 µl de [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] dATP, 3.5 µl de LMN (Labeling Mix Nuc dGTP for labeled dATP/dil 1:5 del stock, Gibco, BRL) y 2 µl de una dilución 1:7 de la enzima Sequenase versión 2.0 T7 DNA polimerasa (13U/µl) (Gibco, BRL) en amortiguador para diluir la enzima (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, DTT 5 mM, BSA 0.5 mg/ml), para un volumen final de

24  $\mu\text{l}$  los cuales se mantuvieron 3 min a temperatura ambiente y posteriormente se dividieron en cuatro tubos a los cuales se agregaron 3.5 $\mu\text{l}$  de uno de los cuatro dNTPs terminadores (ddA, ddC, ddG y ddT) y se incubaron a 42°C durante 2 min, al término de este tiempo se detuvo la reacción de polimerización adicionando 4  $\mu\text{l}$  de la solución de paro (ver apéndice) pasando de inmediato a hielo. Por último se almacenó a -20°C hasta su análisis.

## 7. REACCIÓN DE PRIMER EXTENSION

Antes de realizar la reacción de extensión del iniciador (Primer Extension) se realizó el marcaje del oligonucleótido Rab PE2 (desfosforilado), preparando una mezcla con 800 ng del oligo (4  $\mu\text{l}$  de un stock a 200 ng/ $\mu\text{l}$ ), 3  $\mu\text{l}$  de la solución 5 X Forward Reaction Buffer (Gibco, BRL), 3  $\mu\text{l}$  de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dATP, 1  $\mu\text{l}$  de la enzima Polinucleótido Cinasas T4 (Gibco, BRL) y 4  $\mu\text{l}$  de agua para un volumen final de 15  $\mu\text{l}$ , los cuales se incubaron a 37°C durante 30-60 min. La reacción se detuvo calentando las muestras a 65°C durante 10 min, y se eliminaron los nucleótidos no incorporados por medio de una columna de Sephadex G-25, equilibrado con buffer T E, para ello, los 15  $\mu\text{l}$  se diluyeron en 85  $\mu\text{l}$  de agua o T E para un volumen de 100  $\mu\text{l}$  que se agregaron a la columna para después centrifugar a 3,000 X g durante 2 min y recolectar en un tubo eppendorf (al fondo de la columna) el oligo marcado, nuevamente se lavó la columna con 100  $\mu\text{l}$  más de agua para tratar de recuperar lo más posible del oligo (centrifugando igualmente a 3,000 X g durante 2 min), este tubo se recuperó de la columna y se determinó la actividad específica del oligo ya fosforilado, directamente en un contador de centelleo tomando 1  $\mu\text{l}$  del oligo y agregándolo a 5 ml de líquido de centelleo.

Para la reacción de Primer Extension se preparó una mezcla con 40  $\mu\text{g}$  de RNA total de *E. histolytica* en 4  $\mu\text{l}$ , 2  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora (10 X Reverse transcriptase), 4  $\mu\text{l}$  de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2  $\mu\text{l}$  de una mezcla de desoxinucleótidos 10 mM, 0.5  $\mu\text{l}$  de RNasin 40 U/ $\mu\text{l}$  y 6.9  $\mu\text{l}$  del oligo de 18 pb Rab-PE2 marcado con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dATP, (1.25 X 10<sup>6</sup> cpm), en un volumen final de 19.4  $\mu\text{l}$ , los cuales se incubaron a 47°C durante 25 min, posteriormente se incubó a temperatura ambiente 10 min, se adicionaron 12 U de la enzima Superscript II -

Reverse Transcriptase, y se incubó a 42°C durante 30 min. Pasado este tiempo se adicionó 1 µl de EDTA 0.5 M pH 8.0, 10 µg de RNasa A para digerir el RNA, se mezcló bien y se incubó a 37°C durante 50 min, se adicionaron 15 µl de Acetato de Sodio 3 M pH 5.2, se realizó una extracción con 200 µl de fenol-Tris pH 8: cloroformo: alcohol isoamílico (en relación 25:24:1) y se adicionaron 150 µl de agua, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 11,000 X g a 4°C durante 15 min, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, y se agregaron 300 µl de Etanol absoluto, se centrifugó a 11,000 X g a 4°C durante 30 min, el precipitado se lavó con Etanol al 70% y se centrifugó 2 veces a 11,000 X g 4°C durante 5 min, la pastilla se dejó secar unos 15 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 4 µl de TE ó agua y 4 µl de solución de muestra para DNA, y las muestras se almacenaron a -20°C. Finalmente, las muestras tanto de la reacción de secuenciación como la reacción de Primer Extension se analizaron en geles de secuenciación.

## 8. GELES DE SECUENCIACIÓN.

Los productos de las reacciones de secuenciación y Primer Extension se separaron bajo condiciones desnaturalizantes en geles de poli(acrilamida-urea) al 6 % (Ausubel y col, 1994). Los geles se prepararon en cámaras de electroforesis para secuenciación (modelo S2, BRL) utilizando cristales templados de 5 mm de grosor y utilizando separadores de 0.5 mm de grosor. Para preparar los geles se utilizaron 40 ml de una solución que contenía: acrilamida 5.7 %, N'N'-bis-acrilamida 0.3 %, urea 8 M, persulfato de amonio (PSA) 0.1 % y TEMED, la solución de acrilamida se colocó en el molde del gel y se dejó polimerizando toda la noche. Al día siguiente, se colocó el peine con "dientes de tiburón" sobre el gel para formar los pozos. El gel se recorrió a 2,000 voltios durante 30 min en TBE 0.5 X.

Para cargar el gel, las muestras se calentaron 2 min a 75°C, se depositaron 5 µl por pozo de cada muestra de la reacción de secuencia y 4 µl de la reacción de Primer Extension y el gel se corrió a 2,000 voltios (30 mA), 50°C durante 2-4 h, hasta que el colorante azul de bromofenol recorrió el 75 % de la longitud del gel (corrida corta). Posteriormente, el gel se desmontó de la cámara y se colocó sobre un filtro de papel 3MM (Whatman) y se secó en un secador por calor (80°C) y vacío durante 40-60 min. Finalmente el gel se expuso a una placa de rayos X (X-OMAT, Kodak) durante 3 días a -70°C.

## 9. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.

Para la extracción de proteínas amibianas totales, después de cosechar trofozoítos crecidos en fase logarítmica, se lavaron dos veces con solución salina (PBS 1X) y se cuantificaron. Las células se volvieron a centrifugar (400 X g) y se resuspendieron en una solución amortiguadora (solución A) que contenía HEPES 10mM, pH 7.9; MgCl<sub>2</sub> 1.5mM; KCl 10mM; Ditio-treitol (DTT) 0.5 mM y PMSF 0.5 mM (Fluoruro fenil-metil-sulfonil), agregando de esta 8 veces el volúmen de la pastilla, para posteriormente adicionar 20.5µl por cada 200µl de solución A de un cocktail de inhibidores de proteasas que contiene: PMSF 0.5mM; Benzamidina 2 mM; Aprotinina 5 µg/ml; Pepstatina A 5µg/ml; Leupeptina 5 µg/ml y E-64 10 µg/ml (concentraciones finales), 30 µl de EDTA 30 µM y 10 µl de TLCK (1-Cloro-3-Tosilamido-7-Amino-L-2-Heptanon, C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S.HCl). Entonces, las amibas se lisaron por sonicación, mediante tres ciclos de 20 seg. separados por un intervalo de 10 seg, después se centrifugó a 400 X g, 7 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se prepararon alícuotas a las cuales se les agregó 1 volúmen de buffer de carga 2X SDS para desnaturalizar las proteínas (50 mM Tris.Cl (pH 6.8); 100mM DTT; 2% SDS; 0.1% Azul de bromofenol y 10% Glicerol), excepto a una alícuota, la cual se utilizó para la cuantificación de proteínas por el método colorimétrico de Bradford (1976), y todas estas se almacenaron a -70°C.

## 10. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS EN SDS-PAGE

La separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se realizó de la siguiente manera: El gel separador se preparó con acrilamida al 11%, Bis-acrilamida 0.9%, Tris-HCl 0.375 M pH 8.8 y SDS al 0.1%. El gel polimerizó al agregar 0.05% de persulfato de amonio (PAS) y 0.003% de TEMED. El gel concentrador se preparó con acrilamida al 5%, Bis-acrilamida 0.36%, Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS al 0.1%, persulfato de amonio 0.05% y TEMED 0.005%. Como amortiguador de corrida se usó una solución Tris 0.25 M, Glicina 1.92 M, 0.1% de SDS y la electroforesis de 30 µg de proteína se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 110 voltios (25 miliamperios) durante

1 h y 20 min. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie al 0.05% en metanol al 5% y ácido acético al 10% durante 20 min, y se destiñeron con una solución de metanol al 5% y ácido acético al 7% hasta visualizar las bandas proteicas.

## 11. WESTERN-BLOT.

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (supported nitrocellulose-1, Gibco, BRL), montando un dispositivo en el cual se armó una especie de "sandwich", poniendo sobre la base que da al polo negativo una fibra, papel whatman sobre esta, después el gel y encima de este la membrana de nitrocelulosa, de nuevo papel whatman y sobre estos otra fibra dando a la base que da al polo positivo, este dispositivo se armó sumergido en buffer de transferencia frío (20% Metanol; 10% Tris-glicina), con este mismo buffer se llenó la cámara de transferencia (Bio-Rad) y se corrió entre 250 y 300 mA en cuarto frío o a 4°C, durante 30 min. Para verificar la transferencia de las proteínas, se hizo la tinción de la membrana con rojo Ponceau S (ver apéndice) por 3 min, se lavó lo suficiente para retirar el colorante y posteriormente se realizó el ensayo de Western-blot.

Primeramente la membrana de nitrocelulosa se bloqueó durante toda la noche a 4°C con PBS-Tween 20-0.05%-Leche 5%.(ver apéndice). La membrana se lavó dos veces con PBS-Tween 20-0.05%, se incubó con anticuerpos contra EhRabB (Rodríguez y col, 2000) diluido 1:600 en PBS-Tween 20-0.05%-Leche 5% por 2 hrs a 37°C, 3 hrs a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en agitación constante. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces con PBS-Tween 20-0.05%- y se incubó con el segundo anticuerpo (IgG anticonejo-acoplado a peroxidasa) diluido 1:2000 en PBS-Tween 20-0.05%-Leche 5% por 2 hrs a 37°C, 3 hrs a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en agitación constante. Entonces, se lavó dos veces con 20 mM PBS frío (ver apéndice), se lavó una vez (5 min) con 50 mM PB (ver apéndice) y se dejó secar la membrana por unos instantes, se cubrió con una solución preparada con el reactivo ECL plus (Amersham farmacia biotech, USA) se dejó secar de 5-10 min. y se expuso ante placas de autorradiografía para detectar la señal de quimioluminiscencia. Como control se utilizó esta misma membrana después de

bloquearla y realizarle todas las condiciones anteriores, pero utilizando anticuerpos contra actina (1:2000) y como segundo anticuerpo un anticuerpo anti-IgGs de ratón diluido 1:2000.

## 12. OBTENCIÓN DE ERITROCITOS

Los eritrocitos se obtuvieron por punción venosa en un volumen aproximado de 7 ml de sangre humana a los cuales se les agregó 3 ml de solución Alsever (ver apéndice) como anticoagulante. Las muestras se centrifugaron a 1000 X g durante 8 min, la pastilla se lavó 4 veces con 5 ml de Alsever, centrifugando a 1000 X g durante 8 minutos cada vez. A un sexto del volumen total de eritocitos que se obtuvo, se agregó un volumen igual de Alsever y se guardaron a 4°C (estos eritrocitos se utilizaron para elaborar la muestra control de eritrocitos solos). Las muestras restantes se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % durante 30 min a 37°C, resuspendiendo aproximadamente cada 5 min. Posteriormente los eritrocitos se lavaron 4 veces con PBS, y se ajustaron a  $1 \times 10^8$  eritrocitos/ml en medio TYI sin suero.

## 13. INTERACCIÓN TROFOZOÍTOS-ERITROCITOS

Los parásitos se ajustaron a  $1 \times 10^6$ /ml en medio TYI sin suero. Posteriormente se incubaron con eritrocitos fijados (1:100) a 37°C durante 5, 10, 30, y 60 minutos. Así mismo las muestras control de eritrocitos solos y amibas solas se incubaron de igual manera. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 400 X g durante 5 min, se retiró el sobrenadante, y las muestras se procesaron para la extracción de proteínas totales y Western blot como se describió.

## RESULTADOS

AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DE APROXIMADAMENTE 800pb PARA VERIFICAR LA ORGANIZACIÓN DE LOS GENES *EhrabB* Y *Ehcp112* DENTRO DEL GENOMA DE *E. histolytica*.

Por secuenciación de una clona aislada de un banco genómico de *E. histolytica*, fue identificado un marco de lectura abierto (ORF open reading frame, en Inglés) de 576 pb correspondiente a *EhrabB*, a 332 pb río arriba del gen *Ehcp112* (García-Rivera y col 1999), pero en la cadena complementaria. *EhrabB* codifica para una posible proteína de 192 aa (EhRabB) con 27-42 % de identidad con proteínas de la familia Rab (Rodríguez y col, 2000). Para verificar la organización de los genes *EhrabB* y *Ehcp112* en el genoma de *E. histolytica* y descartar algún artefacto durante la construcción del banco genómico, se realizaron ensayos de PCR utilizando oligonucleótidos iniciadores presentes en ambos genes. En estos experimentos se logró la amplificación de un producto de aproximadamente 800 pb (Fig. 11) el tamaño esperado según la distancia entre los dos iniciadores. Este resultado indica que la organización de los genes detectada en la clona genómica está presente en el genoma de *E. histolytica*.

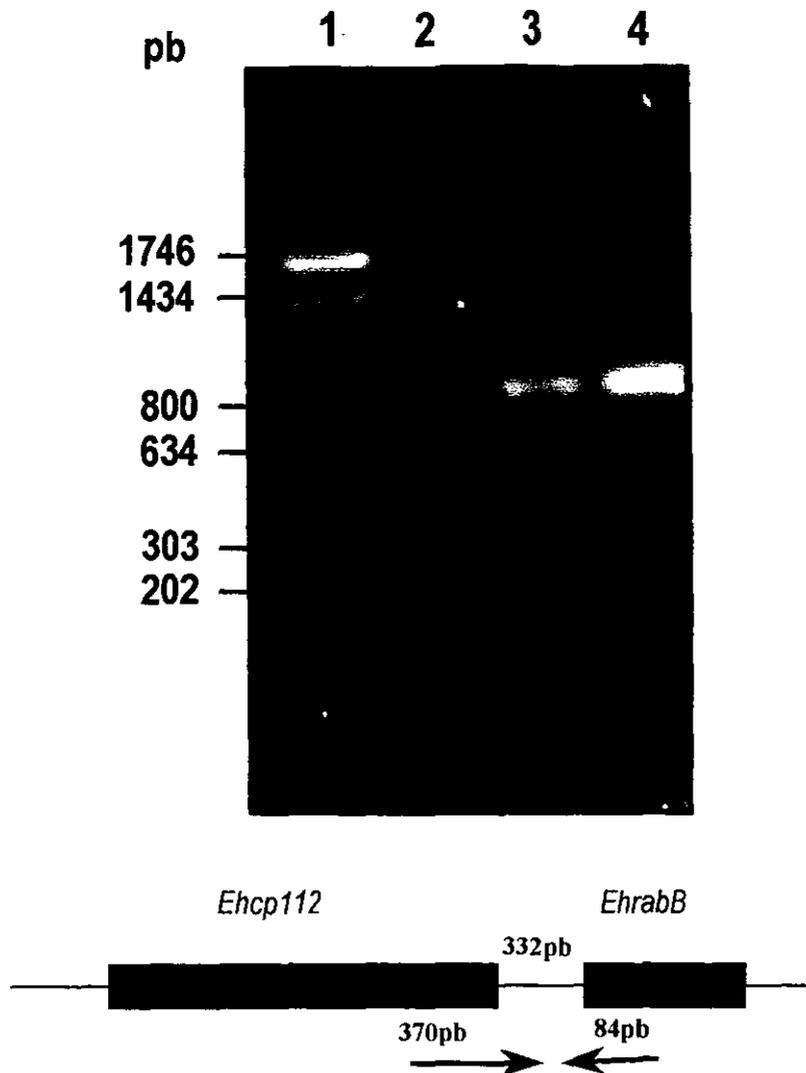


Fig.11. Amplificación por PCR de un fragmento de aproximadamente 800 pb. Utilizando iniciadores localizados en los genes *EhrabB* y *Ehcp112* y DNA ambiental como molde se realizó una PCR. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1% en TBE 1X, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 800 pb. Carril 1: Marcador de tamaño molecular (Bio-Rad). Carril 2: Control de reacción sin DNA molde. Carril 3: Fragmento amplificado utilizando DNA ambiental como molde. Carril 4: Fragmento amplificado utilizando DNA del plásmido pG1 como molde (control positivo). En la parte inferior se muestra un esquema donde se representa la localización de los iniciadores usados en la PCR (ver página 29).

### *EhrabB* CODIFICA DOS TRANSCRITOS.

Para determinar si el gen *EhrabB* se expresa en los trofozoítos amibianos, se realizaron experimentos tipo Northern. En estos ensayos la sonda *EhrabB* hibridó con transcritos de 0.6 y 0.97 kb (Fig.12). La banda pequeña tiene la talla esperada de acuerdo con la secuencia del gen. La presencia de la banda de mayor tamaño puede deberse a reacción cruzada de la sonda con otros RNAs relacionados con *EhrabB*. Alternativamente, las dos bandas podrían ser transcritos de *EhrabB* con diferente longitud en sus regiones sin traducir, como ha sido reportado para el gen humano *Rab11a* (Gromov, y col. 1998). La banda de 0.97 kb pudiera ser asimismo un transcrito de una segunda copia del gen. La presencia de estos transcritos indican que el gen *EhrabB* se expresa en los trofozoítos amibianos.

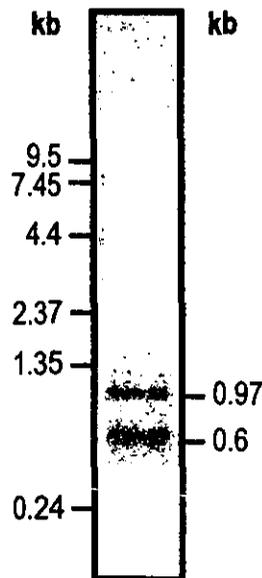


Fig. 12. Northern blot del gen *EhrabB*. El RNA total de *E. histolytica* fue fraccionado mediante electroforesis en gel de agarosa-formaldehído y transferido a membrana de nylon. Esta última fue hibridada con el gen *EhrabB* marcado con [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP. Los lavados finales se hicieron con SSC 0.1X a 65°C. Los marcadores de tamaño molecular (Gibco, BRL. USA) son indicados a la izquierda.

### SITIOS DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *EhrabB*

Experimentos de Primer Extension con RNA total fueron utilizados para identificar el sitio de inicio de la transcripción del gen *EhrabB*. En la Fig. 13 se puede observar que existen varios sitios de inicio de la transcripción. La longitud de los productos fue determinada por comparación con la secuencia del DNA correspondiente en antisentido obtenida con el mismo iniciador (Rab PE2). El producto de menor tamaño inició a -72 b del codón de inicio ATG, otros transcritos presentaron regiones 5' no traducidos de 260 bases o más. Estos resultados sugieren que los dos transcritos detectados en los ensayos tipo Northern corresponden a RNAs con diferente longitud en la región 5' no traducida, el transcrito de 600 bases puede ser el que tiene 72 bases en su región 5' no traducida, mientras que los otros pudieran estar agrupados en la banda de 0.97 kilobases detectada en los ensayos tipo Northern.

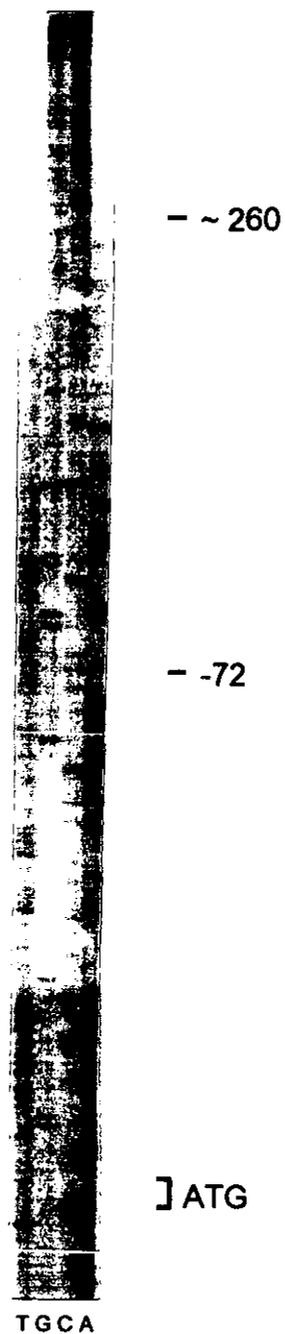


Fig. 13. Sitios de inicio de la transcripción del gen *EhrabB*. Los productos de Primer Extension fueron analizados en un gel donde se comparó con la secuencia obtenida con el mismo iniciador. El carril a la derecha muestra los productos del Primer Extension . A la derecha se indican los sitios de inicio de la transcripción y su distancia del codón de inicio de la traducción (ATG).

## ANTICUERPOS CONTRA LA PROTEÍNA EhRabB RECONOCEN DOS BANDAS EN EXTRACTOS DE *E. histolytica*.

La presencia de la proteína EhRabB en los extractos de trofozoítos fue evidenciada por anticuerpos específicos. Rodríguez y col (2000) alinearon la proteína EhRabB con otras proteínas Rab, entonces seleccionaron la secuencia más divergente (14 aa: EEVSLEKEPTESKG), la cual constituye el péptido RabB situado en el extremo carboxilo terminal de EhRabB. Este péptido fue sintetizado y usado para inmunizar conejos. En experimentos Western blot, los anticuerpos de conejo contra el péptido RabB detectaron un par de bandas de aproximadamente 19 y 21 kDa sobre proteínas totales de *E. histolytica* (Fig. 14). Estos productos pueden corresponder a las proteínas EhRabB sin modificar y modificadas con la adición del grupo geranil-geranilo, respectivamente.

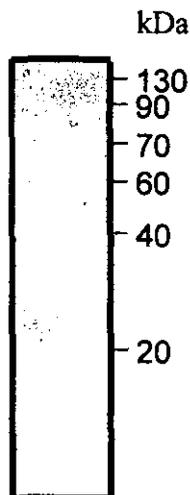


Fig. 14. Ensayos Western blot con anticuerpos contra EhRabB. Anticuerpos de conejo específicos contra el péptido EEVSLEKEPTESKG localizado en el extremo carboxilo terminal de EhRabB (177-190 aa) fueron utilizados para reconocer la proteína EhRabB nativa. A la derecha se indican los pesos moleculares de marcadores comerciales.

## LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA EhRabB SE REGULA POR EL CONTACTO CON LA CÉLULA BLANCO.

En ensayos de inmunolocalización de la proteína EhRabB durante la fagocitosis, se encontró que al contacto de los trofozoítos con la célula blanco la proteína se translocó hacia la superficie de los trofozoítos y a bocas fagocíticas, sugiriendo que EhRabB participa en uno de los primeros pasos de la fagocitosis (Rodríguez y col, 2000). Además se vió un cambio en la cantidad de vesículas conteniendo la proteína EhRabB con respecto al tiempo de interacción (Rodríguez y col, 2000) (ver Fig. 9). Con el fin de determinar como influye la presencia de las células blanco en la expresión de la proteína EhRabB se realizaron experimentos de Western blot en trofozoítos con diferente tiempo de interacción con eritrocitos humanos. Los anticuerpos de conejo contra el péptido RabB detectaron que el par de bandas se expresa de manera diferencial para los tiempos de contacto utilizados (Fig. 15). A los 5 y 10 minutos parece aumentar la señal, con respecto al control sin contacto con eritrocitos, pero disminuye un poco a los 30 y presenta mayor expresión a los 60 minutos de interacción (Fig. 15A). Anticuerpos contra actina detectaron a esta proteína en aproximadamente la misma cantidad en todos los tiempos de interacción (Fig. 15B). Estos resultados sugieren que la expresión de la proteína EhRabB está regulada por el contacto con la célula blanco.

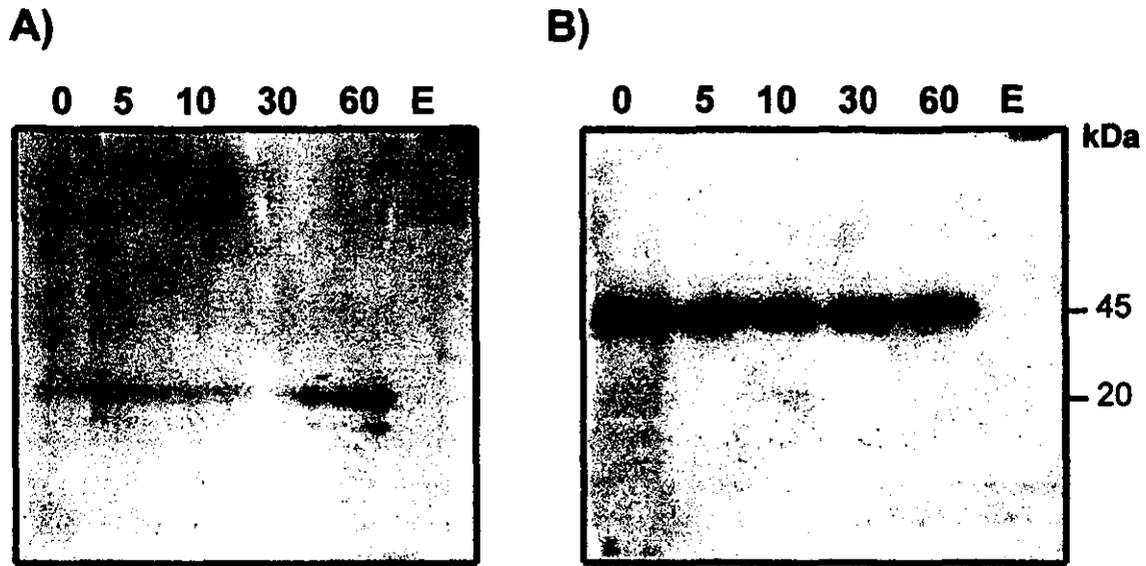


Fig. 15. Ensayos de Western blot en la interacción trofozoítos-eritrocitos. Anticuerpos de conejo específicos contra el péptido EEVSLEKPTESKG localizado en el extremo carboxilo terminal de EhRabB (177-190 aa) (A) o anticuerpos contra actina (B), fueron utilizados para reconocer a las proteínas en diferentes tiempos de contacto con eritrocitos. En la parte superior se indican los tiempos en minutos de interacción. A la derecha se indican los marcadores de peso molecular. E proteínas de eritrocitos.

## DISCUSIÓN

*E. histolytica* posee una adhesina de 112 kDa la cuál está conformada por dos polipéptidos, codificados por dos genes adyacentes, uno de estos es una cisteína proteinasa (EhCP112) y el otro es una adhesina (EhADH112) (García-Rivera y col, 1999).

Al investigar los mecanismos de control de los genes de la adhesina de 112 kDa se decidió conocer la secuencia localizada río arriba del sitio de inicio de la transcripción de dichos genes. Al analizar la secuencia se identificó un marco de lectura abierto de 576 pb (*EhrabB*) a 332 pb río arriba del gen *Ehcp112*, pero localizado en la cadena de DNA complementaria. *EhrabB* codifica para una posible proteína de 192 aa (EhRabB) con una identidad de 40-42 % a proteínas de la familia Rab (Rodríguez y col, 2000).

La organización inusual de estos tres genes sugirió que pudiera deberse a un artefacto creado durante la construcción del banco genómico del cual fueron aislados. Sin embargo, en otros organismos existen genes que tienen esta organización particular que además permite que sus promotores se traslapen y con esto exista una regulación coordinada entre ellos (Shinya y Shimada, 1999; Gavalas y Zalkin, 1995).

Para confirmar que los genes *EhrabB* y *Ehcp112* están adyacentes en el genoma de *E. histolytica* se realizaron ensayos de PCR utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos de ambos genes y DNA genómico amibiano. El oligonucleótido en sentido (G-13 de 17 b) está localizado a 351 pb del primer ATG del gen *Ehcp112*, mientras que el oligonucleótido en antisentido (RabPE2, de 18 b) se localiza a 64 pb del primer ATG del gen *EhrabB*. Mediante estos experimentos logramos un producto de amplificación esperado de  $\approx$  800 pb que incluye un fragmento no codificante de 332 pb localizado entre los genes *Ehcp112* y *EhrabB* (ver esquema en Fig. 11), estos resultados indican que la organización detectada en la clona genómica no es un artefacto.

En experimentos de Northern blot empleando una sonda específica para rab se detectaron dos transcritos correspondientes a este gen de 0.6 y 0.97 kb. La banda pequeña tiene la talla esperada para el tamaño de la secuencia codificante del gen (576 pb). La banda de mayor tamaño (0.97 kb) probablemente corresponde a la secuencia del gen *EhrabB* y a la secuencia no codificante más larga detectada en los experimentos de primer extension.

La determinación de los sitios de inicio de la transcripción del gen *EhrabB* mostró que existen secuencias 5' no traducidas de los transcritos de este gen que se solapan con regiones 5' no traducidas del transcrito del gen *Ehcp112* (Fig. 16). Apoyando la idea de que el transcrito de mayor tamaño detectado en los ensayos Northern pueda deberse a la presencia en éste de una región 5' que no se traduce. El transcrito más corto de *EhrabB*, con 72 b no traducidas en su extremo 5', se solapa 20 bases con la región 5' no traducida del gen *Ehcp112*. El núcleo del promotor de genes de *E. histolytica* estudiados a la fecha está determinado por alrededor de 300 pb río arriba de los sitios de inicio de la transcripción de los genes (Gómez y col, 1998; Pérez y col, 1998). De acuerdo a esta descripción, la secuencia del promotor del gen *Ehadh112* estaría solapada con el gen *Ehcp112*. Mientras que también, la secuencia de los promotores de los genes *Ehcp112* y *EhrabB* estarían solapadas (Fig. 16). Estos resultados confirman la idea de que *EhrabB* y *Ehcp112* deben tener una regulación de la transcripción coordinada, ya que esta asociación sugiere que algunos de los elementos regulatorios de la transcripción de los genes *Ehcp112* y *EhrabB* pudieran ser compartidos o bien estar solapados como se ha sugerido para este tipo de organización de genes en otros organismos (Shinya y Shimada, 1994; Gavalas y Zalkin, 1995).

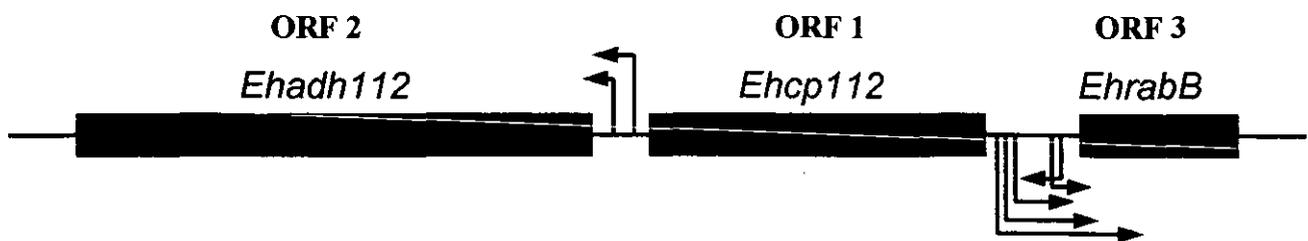


Fig. 16. Organización genómica y sitios de inicio de la transcripción de los genes *EhrabB*, *Ehcp112* y *Ehadh112*. La vecindad de los genes, sus opuestos marcos de lectura abiertos, así como el sitio de inicio de sus transcritos, sugieren que los genes *EhrabB*, *Ehcp112* y *Ehadh112* deben tener una co-regulación de su transcripción. Las flechas indican los sitios de inicio de la transcripción y la dirección de ésta.

EhCP112 es una cisteína proteinasa que es secretada (García-Rivera, comunicación personal), mientras que la proteína EhADH112 está involucrada en la adhesión y fagocitosis de las células blanco. Ambas proteínas son traslocadas de la membrana plasmática a vacuolas fagocíticas durante la fagocitosis (García-Rivera y col, 1999). EhRabB podría participar en el transporte de éstas y/u otras moléculas. Rodríguez y col. (2000) sugirieron que la proteína EhRabB que debe ser necesaria para el transporte pudiera estar regulando ciertas etapas de la fagocitosis, quizá internalizando el complejo de la adhesina de 112 kDa o algunas moléculas que se fagocitan y que su expresión es regulada por la presencia o contacto con la célula blanco. Para comprobar esto, se realizaron experimentos de Western blot con proteínas de trofozoítos que tuvieron diferentes tiempos de interacción con eritrocitos humanos.

La presencia de la proteína EhRabB en los extractos de trofozoítos fue evidenciada por anticuerpos específicos contra un péptido situado en el extremo carboxilo terminal de EhRabB (Rodríguez y col, 2000). Estos anticuerpos detectaron a la proteína EhRabB en vesículas de transporte (Rodríguez y col, 2000). En este trabajo los anticuerpos detectaron un par de bandas de aproximadamente 19 y 21 kDa sobre proteínas totales de *E. histolytica*, una banda puede corresponder a la proteína sin modificaciones, mientras que otra puede corresponder a la proteína modificada con el grupo geranil-geranilo necesario para su asociación con las membranas de las vesículas de transporte. Así mismo el par de bandas se expresaron de manera diferencial en los tiempos de contacto utilizados, así a los 5 y 10 minutos parece aumentar la señal, disminuir un poco a los 30 min y aumentar mucho más a los 60 minutos. Estos resultados sugieren que la expresión de la proteína EhRabB está influenciada por la presencia de la célula blanco y por otro lado que quizá su función está relacionada a la actividad de la adhesina de 112 kDa, probablemente en la fagocitosis de la célula blanco, como ha sido propuesto por Rodríguez y col (2000). Al parecer esta regulación diferencial pudiera estar dada a nivel transcripcional; sin embargo, es necesario realizar más estudios para poder determinarlo.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados, podemos concluir lo siguiente:

- Los resultados de la amplificación por PCR utilizando iniciadores de *EhrabB* y *Ehcp112* y DNA genómico como molde, confirmaron que los genes *EhrabB* y *Ehcp112* están adyacentes en el genoma de *E. histolytica*.
- El gen *EhrabB* produce transcritos con diferente longitud en su extremo 5' no traducido.
- Los transcritos de los genes *EhrabB* y *Ehcp112* se translapan en su región 5' no traducida, sugiriendo una expresión coordinada y que posiblemente las proteínas codificadas por ellos tengan una función relacionada.
- Anticuerpos contra la proteína EhRabB detectaron un par de bandas de aproximadamente 19 y 21 kDa en extractos de proteínas totales de *E. histolytica*. Probablemente relacionadas con las formas no modificada y modificada por grupos geranilo, respectivamente.
- La proteína EhRabB se expresó de manera diferencial en los tiempos de interacción utilizados. Con lo cual se sugiere fuertemente que la expresión de la proteína EhRabB está influenciada por la presencia de la célula blanco y que su función está relacionada a la función de la adhesina de 112 kDa, probablemente en la fagocitosis de la célula blanco, como ha sido sugerido por Rodríguez y col (2000).

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

**BIBLIOGRAFÍA**

Adari, H., Lowy, D. R., Willumsen, B. M., Der, C. J., and McCormick, F. (1988). Guanosine triphosphatase activating protein (GAP) interacts with the p21<sup>ras</sup> effector binding domain. *Science* **240**, 518-521.

Ankri, S., Stolarsky, T., and Mirelman, D. (1998). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol. Microbiol.* **28**, 777-785.

Antony, C., Cibert, C., Geraud, G., Santa María, A., Maro, B., Mayau, V., and Goud, B. (1992). The small GTP-binding protein Rab6p is distributed from medial Golgi to the trans-Golgi network as determined by a confocal microscopic approach. *J. Cell Sci.* **103**, 785-796.

Arroyo, R. and Orozco, E. (1987). Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol. Biochem. Parasitol.* **23**: 151-158.

Ausubel, I. F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1994). Current protocols in molecular biology. Vol I & II. Jhon Wiley & Sons, Inc. USA.

Bacon, R. A., Salminen, A., Ruohola, H., Novick, P., and Ferro-Novick, S. (1989). The GTP-binding protein Ypt1 is required for transport *in vitro*: The Golgi apparatus is defective in ypt1 mutant. *J. Cell Biol.* **109**, 1015-1022.

Barker, D. C., and Swales, L. S. (1972). Characterization of ribosomes during differentiation from trophozoites to cyst in axenic *Entamoeba* sp. *Cell differ.* **1**, 297-306.

Bailey, G. B. (1982). Preliminary studies of chemotaxis by *Entamoeba*. *Arch. Inv. Med. (Mex.)* **13** (supl.3): 265-271.

Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C.O.A., Schrimmer, N.K., Sprinzl, M., and Hilgenfel, R. (1993). Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature* **365**, 126-132.

Bourne, H.R. (1988). Do GTPases direct membrane traffic in secretion? *Cell.* **53**, 669-671.

Bracha, R., Kobilier, D. and Mirelman, D. (1982). Attachment and ingestion of Bacteria by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **36**: 396-406.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-254.

- Brennwald, P., and Novick, P. (1993). Interactions of three domains distinguishing the Ras-related GTP-binding proteins Ypt1p and Sec4p. *Nature*. **365**, 560-563.
- Calderón, J., Muñoz, M. L., and Acosta, H. M. (1980). Surface redistribution and release of antibody-induced caps in *Entamoeba*. *J. Exp. Med.* **151**, 184-193.
- Cano-Mancera, R. and López-Revilla, R. (1987). Inhibition of adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes by carbohydrates. *Parasitol. Res.* **74**, 18-22.
- Chapman-Andresen, C. (1977). Endocytosis in freshwater amebas. *Physiol. Rev.* **57**, 371-385.
- Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K., and Zerial, M. (1990). Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* **62**, 317-329.
- Chavrier, P., Gorvel, J-P., Stelzer, E. Simons, K., Gruenberg, J., and Zerial, M. (1991). Hypervariable C-terminal domain of Rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* **353**, 769-772.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**, 2110.
- Daro, E., van der Sluijs, P., Galli, T., and Mellman, I. (1996). Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 9559-9564.
- Der, C. J., Finkel, T., and Cooper, G. M. (1986). Biological and biochemical properties of human ras<sup>H</sup> genes mutated at codon 61. *Cell* **44**, 167-176.
- Diamond, I. S., Harlow, D. R., and Cunnick, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**, 431-432.
- Eaton, R. D., Meerovitch, E. and Costerton, J. W. (1969). A surface active lysosome in *Entamoeba histolytica*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **63**, 678-680.
- Feria-Velasco, A., and Treviño, N. (1972). The ultrastructure of trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to spherical arrangements of osmophilicylindrical bodies. *J. Protozool* **19**, 200-211.
- Fischer von Mollard, G., Mignery, G. A., Baumert, M., Perin, M. S., Hanson, T. J., Burger, P. M., Jahn, R., and Südhof, T. C. (1990). Rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 1988-1992.

Fischer von Mollard, G., Stahl, B., Walch-Solimena, C., Takei, K., Daniels, L., Khoklatchev, A., De Camilli, P., Südhof, T. C., and Jhan, R. (1994). Localization of Rab5 to synaptic vesicles identifies endosomal intermediate in synaptic vesicle recycling pathway. *Eur. J. Cell Biol.* **65**, 319-326.

García-Rivera, G. (1987). Papel de la adhesión, de la fagocitosis y de la interacción con bacterias en la virulencia de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D. F.

García-Rivera, G., Rodríguez, M. A., Ocádiz, R., Martínez-López, M. C., González-Robles, A., and Orozco, E. (1999). *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol. Microbiol.* **33** (3), 556-568.

García-Rivera, G., Sánchez, T., Orozco, E. y Guarneros, G. (1982). Aislamiento de clones de *E. histolytica* deficientes en adhesión a eritrocitos humanos. *Arc. Inv. Méd. (Méx.)* **13** (supl.3): 129-136.

Gavalas, A. and Zalkin, H. (1995). Analysis of the chicken GPAT: AIRC bidirectional promoter for the novo purine nucleotide synthesis. *J. Biol. Chem.* **270**, 2403-2410.

Ghosh, S., and Samuelson, J. (1997). Inhibition of phagocytosis, cytokinesis, and capping by overexpression of mutated p21<sup>racA</sup> in cultured *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **65**, 4243-4249.

Ghosh, S. K., Field, J., Frisardi, M., Rosenthal, B., Mai, Z., Rogers, R. and Samuelson, J. (1999). Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica*: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Infect. Immun.* **67** (6), 3073-3081.

Godbold, G. D., and Mann, B. J. (1998). Involvement of the actin cytoskeleton and p21rho-family GTPases in the pathogenesis of the human protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**, 1049-1058.

Gómez, C., Pérez, D. G., López-Bayhen, E., and Orozco, E. (1998). Transcriptional analysis of the Ehpgp1 promoter of *Entamoeba histolytica* multidrug-resistant mutant. *J. Biol. Chem.* **273**, 7277-7284.

Goud, B., Salminen, A., Walworth, N. C., and Novick, P. J. (1988). A GTP-binding protein required for secretion rapidly associates with secretory vesicles and the plasma membrane in yeast. *Cell* **53**, 753-768.

Goud, B., Zahraoui, A., Tavitian, A., and Saraste, J. (1990). Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature* **345**, 553-556.

Gromov, P. S., Celis, J. E., Hansen, C., Tommerup, N., Gromova, I., and Madson, P. (1998). Human rab11a: transcription, chromosome mapping and effect on the expression levels of host GTP-binding proteins. *FEBS lett.* **429**, 359-364.

- Guerrant, R.L., Brush, J., Ravdin, J. I., Sullivan, J. A., and Mandell, Q. L. (1981). Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J. Infect. Dis.* **143**, 83-93.
- Harlow, E. and D. Lane. (1988). Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratories. EUA.
- Haubruck, H., Disela, C., Wagner, P., and Gallwitz, D. (1987). The ras-related ypt protein is an ubiquitous eukaryotic protein: Isolation and sequence analysis of mouse cDNA clones highly homologous to the yeast YPT1 gene. *EMBO J.* **6**, 4049-4053.
- Hay, J. C., and Scheller, R. H., (1997). SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**, 505-512.
- Hoffenberg, S., Sanford, J. C., Liu, S., Daniel, D. S., Tuvin, M., Knoll, B. J., Wessling-Resnick, M., and Dickey, B. F. (1995). Biochemical and functional characterization of a recombinant GTPase, Rab5, and two of its mutants. *J. Biol. Chem.* **270**, 5048-5056.
- Huber, L. A., Pimplikar, S., Parton, R. G., Virta, H., Zerial, M., and Simons, K. (1993). Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *J. Cell Biol.* **123**, 35-45.
- Jones, S., Litt, R. J., Richardson, C. J., and Segev, N. (1995). Requirement of nucleotide exchange factor for Ypt1 GTPase mediated protein transport. *J. Cell. Biol.* **130**, 1051-1061
- Jurnak, F. (1985). Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to Ras oncogene proteins. *Science* **230**, 32-36.
- Karniguan, A., Zahraoui, A., and Tavitian, A. (1993). Identification of small GTP-binding Rab proteins in human platelets: Thrombin-induced phosphorylation of Rab3B, Rab6, and Rab8 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 7647-7651.
- Keene, W. E., Hidalgo, M. E., Orozco, E., and McKerrow, J. H. (1990). *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine protease. *Exp. Parasitol.* **71**, 199-206.
- Kobiler, D. and D. Mirelman. (1980). Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* **29**, 221-225.
- LaCour, T. F. M., Nyborg, J., Thirup, S., and Clark, B. F. C. (1985). Structural details of the binding of guanosine diphosphate to elongation factor Tu from *E. coli* as studied by X-ray crystallography. *EMBO J.* **4**, 2385-2388.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M., and Boedtger, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions: A critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743-4751.

- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblida, A. R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C. Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., and Wallace, F. G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozol* **27**, 37-58.
- Li, C., Takei, K., Geppert, M., Daniell, L., Stenius, K., Chapman, E. R., Jahn, R., De Camilli, P., and Südhof, T. C. (1994). Synaptic targeting of rabphilin-3A, a synaptic vesicle Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-binding protein, depends on rab3A/3C. *Neuron* **13**, 885-898.
- Lütke, A., Jansson, S., Parton, R. G., Chavrier, P., Valencia, A., Huber, L.A., Lehtonen, E., and Zerial, M. (1993). Rab17, a novel small GTPase, is specific for epithelial cells and is induced during cell polarization. *J. Cell Biol.* **121**, 553-564.
- Lynch, E. C., Rosenberg, I. M., and Gitler, C. (1982). An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *EMBO J.* **1**, 801-804.
- Mai, Z., Ghosh, S., Frisardi, M., Rosenthal, B., Rogers, R., and Samuelson, J. (1999). Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("Crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Cell Biol.* **19** (3), 2198-2205.
- Marshall, C. J.(1996). Ras effectors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 197-204.
- Marshall, M. S.(1993). The effector interactions of p21<sup>ras</sup>. *Trends. Biochem. Sci.* **18**, 250-254.
- Marshall, M. S.(1995). Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J.* **9**, 1311-1318.
- Martínez-Palomo, A. (1982). The biology of *Entamoeba histolytica*. Research Studies Press. John Wiley & Sons. England. pp 5-56.
- Martínez-Palomo, A. (1986). Biology of *Entamoeba histolytica*. In: Amebiasis. A. Martínez-Palomo (ed.) Amsterdam Elsevier Biomedical, pp 11-43.
- Martínez-Palomo, A. (1987). Las amibas, enemigos invisibles. Fondo de Cultura Económica. Méx, D. F. pp 11, 42, 46-47, 53-59.
- Matsui, Y., Kikuchi, A., Kondo, J., Hishida, T., Teranishi, Y., and Takai, Y. (1988). Nucleotide and deduced amino acid sequences of a GTP-binding protein family with molecular weights of 25,000 from bovine brain. *J. Biol. Chem.* **263**, 11071-11074.
- Mazzuco, A., Benchimol, M., and De Souza, W. (1997). Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*. *Micron.* **28**, 241-247.
- McKerrow, J. H., Sun, E., Rosenthal, P. J., and Bouvier, J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**, 821-853.

- McLaughlin, J., and Aley, S. (1985). The biochemistry and functional morphology of *Entamoeba*. *J. Protozool.* **32**, 221-240.
- Milburn, M. V., Tong, L., de Vos, A. M., Brünger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., and Kim, S. H. (1990). Molecular switch for signal transduction: Structural differences between active and inactive forms of protooncogenic Ras proteins. *Science* **247**, 939-945.
- Muñoz, M. L., Calderón, J., and Rojkind, M. (1982). The collagenase of *E. histolytica*. *J. Exp. Med.* **155**, 42-51.
- Muñoz, M. L., Moreno, M. A., Pérez-García, J. N., Tovar, G. N., and Hernández, V. I. (1991). Possible role of calmodulin in the secretion of *Entamoeba histolytica* electron dense granules. *Mol. Microbiol.* **5**, 1707-1714.
- Noble, E. R., and Noble, G. A. (1976). The biology of animal parasites. Lea & Febiger (Ed.). Philadelphia. P. 60.
- Noel, J. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin- $\alpha$  complexed with GTPS. *Nature* **366**, 654-663.
- Novick, P., Field, C., and Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**, 205-215.
- Novick, P., and Zerial, M. (1997). The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**, 496-504.
- Olguin, T. (1984). Estudio comparativo de la fagocitosis de dos clones de *Entamoeba histolytica* de diferente virulencia. Tesis de licenciatura en Biología. ENEP-Iztacala. UNAM. México, D. F.
- Olkkonen, V. M., and Stenmark, H. (1997). Role of Rab GTPases in membrane traffic. In: A survey of Cell Biology. K. W. Jeon (ed). USA. Academic Press *Int. Rev. Cytol.* **176**, 1-85.
- Orozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo, A. and Sánchez, T. (1983). *Entamoeba histolytica* Phagocytosis as a virulence factor. *J. Exp. Med.* **158**, 1511-1521.
- Orozco, E., Martínez-Palomo, A., y González-Robles, A. (1982). Las interacciones lectina-receptor median la adhesión de *Entamoeba histolytica* a células epiteliales. *Arch. Inv. Méd. (Méx)*. **13**, (suppl. 3): 153-157.
- Orozco, E., Martínez-Palomo, A., y R. López-Revilla. (1978). Un modelo *in vitro* para el estudio cuantitativo de la virulencia de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* **9**, 257-260.

- Orozco, E., Rodríguez, M. A., and Hernández, F. (1988). The role of phagocytosis in the pathogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*. In: Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. J. I. Ravdin (Ed.). John Wiley & Sons. EUA. pp 326-338.
- Orozco, E., Gharaibeh, R., Riverón, A. M., Delgadillo, D. M., Mercado, M., Sánchez, T., Gómez Conde, E., Vargas, M. A., and López-Revilla, R. (1997). A novel cytoplasmic structure containing DNA networks in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Mol Gen Genet.* **254**, 250-257.
- Pai, E. F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K. C., John, J., and Wittinghofer, A. (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* **341**, 209-214.
- Pai, E. F., Krenger, U., Petsko, G. A., Goody, R. S., Kabsch, W., and Wittinghofer, A. (1990). Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: Implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* **9**, 2351-2359.
- Pérez, D. G., Gómez, C., López-Bayhen, E., Tannich, E., and Orozco, E. (1998). Transcriptional analysis of the Ehpgp5 promoter of *Entamoeba histolytica* multidrug-resistant. *J. Biol. Chem.* **273**, 7285-7292.
- Pérez-Tamayo, R. (1986). Pathology of amebiasis. In: Amebiasis. A. Martínez-Palomo (ed.) Amsterdam Elsevier Biomedical. Pp 54-94.
- Pfeffer, S. R. (1994). Rab GTPases: Master regulators of membrane trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 522-526.
- Plutner, H., Cox, A. D., Pind, S., Khoseavi-Far, R., Bourne, J. R., Schwaninger, R., Der, C. J., and Balch, W. E. (1991). Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments. *J. Cell Biol.* **115**, 31-43.
- Ramos, M. A., Mercado, G. C., Salgado, L. M., Sánchez-López, R., Stock, R. P., Lizardi, P. M., and Alagón, A. (1997). *Entamoeba histolytica* contains a gene encoding a homologue to the 54kDa subunit of the signal recognition particle. *Mol. Biochem. Parasitol.* **92**, 355-359.
- Ravdin, J. I., Croft, B. Y., and Guerrant, R. L. (1980). Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **152**, 377-390.
- Ravdin, J. I., and Guerrant, R. L. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture and human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* **68**, 1305-1313.
- Ravdin, J. I., Sperelakis, N., and Guerrant, R. L. (1982). Effect of ion channel inhibitors on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **146**, 335-340.

- Ravdin, J. I., Murphy, C. F., Salata, R. A., Guerrant, R. L., and Hewlett, E. L. (1985a). The N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*, I. Partial purification and relation to amebic virulence *in vitro*. *J. Infect. Dis.* **151**, 804-815.
- Ravdin, J. I., Murphy, C. F., Guerrant, R. L. and Long-Krug, S. A. (1985b) Effect of calcium and phospholipase A antagonists in the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica* *J. Infect. Dis.* **152**, 542-549.
- Ravdin, J. I. (1986). Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*. Studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytotoxicity. *Rev. Infect. Dis.* **8**, 247-260.
- Riederer, M. a., Soldati, T., Shapiro, A. D., Lin, J., and Pfeffer, S. R. (1994). Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* **125**, 573-582.
- Rodríguez, M. A., and Orozco, E. (1986). Isolation and characterization of phagocytosis- and virulence-deficient mutants *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **154**, 27-32.
- Rodríguez, M. A., Hernández, F., Santos, L., Valdez, A., and Orozco, E. (1989). *Entamoeba histolytica*: Molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Mol. Biochem. Parasitol.* **37**, 87-100.
- Rodríguez, M. A., García-Pérez, R. M., García-Rivera, G., López-Reyes, I., Mendoza, L., Ortiz-Navarrete, V., and Orozco, E. (2000). An *Entamoeba histolytica* Rab-like encoding gene and protein: function and cellular location. *Mol. Biochem. Parasitol.* **108**, 199-206.
- Rosales-Encina, J. L., Meza, I., López de León, A., Talamás-Rohana, P., and Rojkind, M. (1987). Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **156**, 790-797.
- Rosenbaum, R. M., and Wittner, M. (1970). Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to helical bodies. *J. Cell. Biol.* **45**, 367-382.
- Salminen, A., and Novick, P. J. (1987). A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell.* **49**, 527-538.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez-López, R., Gama-Castro, S., Ramos, M. A., Merino, E., and Lizardi, P. M. (1998). Alagón cloning and expression of the *Entamoeba histolytica* ERD2 gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* **92**, 355-359.
- Sánchez, M. A., Peattie, D. A., Wirth, D., and Orozco, E. (1994). Cloning, genomic organization and transcription of the *Entamoeba histolytica* ( $\alpha$  tubulin-encoding gene). *Gene* **146**, 239-244.

Sander, C., and Valencia, A. (1995). The Ras superfamily. In "Guidebook to the Small GTPase" (M. Zerial and L. A. Huber, Eds.), pp 12-20. Oxford Univ. Press, London.

Sanger, F., Nicklen, F., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

Saraste, J., Lahtinen, U., and Goud, B. (1995). Localization of the small GTP-binding protein Rab1p to early compartments of the secretory pathway. *J. Cell Sci.* **108**, 1541-1522.

Schaudinn, F. (1903). On the development of some rhizopoda (preliminary report). *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte.* **19**, 547.\*

Schmid, S. L. (1993). Biochemical requirements for the formation of clathrin- and COP-coated transport vesicles. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 621-627.

Schmitt, H. D., Wagner, P., Pfaff, E., and Gallwitz, D. (1986). The ras-related YPT1 gene product in yeast: A GTP-binding protein that might be involved in microtubule organization. *Cell.* **47**, 401-412.

Shinya, E. and Shimada, T. (1994). Identification of two initiator elements in the bidirectional promoter of the human dihydrofolate reductase and mismatch repair protein 1 genes. *Nucl. Acids Res.* **22**, 2143-2149.

Serrano, R., Deas, J. E., and Warren, L. G. (1977). *Entamoeba histolytica*: membrane fractions. *Exp. Parasitol.* **41**, 370-384.

Simons; K., and Zerial, M. (1993). Rab-Prot road maps intra trans *Neuron.* **11**, 789-799.

Smith, H. (1977). Microbial surfaces in relation to pathogenicity. *Bacteriol. Rev.* **41**, 475.

Stanley, S. L., Becker, A., Kunz-Jenkins, C., Foster, L., and Ellen Li. (1990). Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 4976-4980.

Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lütcke, A., Gruenberg, J., and Zerial, M. (1994). Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* **13**, 1287-1296.

Tanaka, T., Tanaka, M., and Mitsui, Y. (1997). Analysis of expressed sequence tags (ESTs) of the parasitic protozoa. *Entamoeba histolytica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 611-615.

Temesvari, L. A., Harris, E. N., Stanley, S. L., and Cardelli, J. A. (1999). Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab GTPases. *Mol. Biochem. Parasitol.* **103**, 225-241.

- Touchot, N., Chardin, P. and Taviatian, A. (1987). Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: Molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8210-8214.
- Tovar, J., Fisher, A., and Clark, C. G. (1999) The mitosome, a novel organelle related to mitochondrial in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* **32**, 1013-1021.
- Trissl, D., Martínez-Palomo, A., Argüello, C., de la Torre, M. and de la Hoz, R. (1977). Surface properties related to Concanavalin A-induced agglutination. A comparative study of several *Entamoeba* strains. *J. Exp. Med.* **145**, 652-655.
- Trissl, D., Martínez-Palomo, A., de la Torre, M., de la Hoz, R., and Pérez de Suárez, E. (1978). Surface properties of *Entamoeba histolytica*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *J. Exp. Med.* **148**, 1137-1145.
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A., and Sander, C. (1991). The Ras protein family: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* **30**, 4639-4648.
- Voigt, H., Olivo, J. C., Sansonetti, P., and Guillen, N. (1999). Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. *J. Cell. Sci.* **112**, 1191-1201.
- Walsh, J. A. (1988). Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. In: Amibiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. J. I. Ravdin (Ed.). John Wiley & Sons. EUA. pp 93-105.
- Walter, M., Clark, S. G., and Levinson, A. D. (1986). The oncogenic activation of human p21<sup>ras</sup> by a novel mechanism. *Science*. **233**, 649-652.
- Walworth, N. C., Goud, B., Kabcenell, A. K., and Novick, P. J. (1989). Mutational analysis of SEC4 suggests a cyclical mechanism for the regulation of vesicular traffic. *EMBO J.* **8**, 1685-1693.
- Walworth, N. C., Brennwald, P., Kabcenell, A. K., Garrett, M., and Novick, P. (1992). Hydrolysis of GTP by Sec4 protein plays an important role in vesicular transport and is stimulated by a GTPase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2017-2028.
- WHO. (1997). Amoebiasis. *WHO Weekly Epidemiol Record.* **72**, 97-100.
- Young, J. D., Young, T. M., Lu, L. P., Unkeless, J. C. and Cohn, Z. A. (1982). Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **156**, 1677-1690.
- Zahraoui, A., Touchot, N., Chardin, P., and Tavitian, A. (1989). The human Rab genes encode a family of GTP-binding proteins related to yeast ans SEC4 products involved in secretion. *J. Biol. Chem.* **264**, 12394-12401.

Zerial, M. and Stenmark, H. (1993). Rab GTPases in vesicular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 613-620.

- Esta referencia ha sido trasladada y reimpressa en *Tropical Medicine and Parasitology: Classic Investigations, Vols I and II*. Editada por Kean, Mott y Russell. Cornell University Press, Ithaca, N. Y., 1978.

## APÉNDICE

### MEDIO TYI-S-33

- 30 g Biosate
- 9 g Glucosa
- 2 g NaCl
- 0.6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 1.36 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- 1.25 g l-Cisteína
- 0.25 g Ácido ascórbico
- aforar a 870 ml
- pH 6.8
- 2% de suero bovino con 1.2 U/ml de penicilina y 1.4  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina

### PBS pH 7.4

- 5 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1M
- 5 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1M
- 30.8 ml NaCl 5M

### SSC 20X

- NaCl 3 M
- Citrato de sodio 0.3 M

### T E N

- 0.1 M Tris Cl (pH 8.0)
- 0.01 M EDTA (pH 8.0)
- 1 M NaCl

### T E pH 7.4

- 10 mM Tris Cl (pH 7.4)
- 1 mM EDTA (pH 8.0)

### T B E 10X

- 54 g Tris base
- 27.5 g Ácido bórico
- 4.65 g EDTA
- aforar a 500ml y esterilizar

### MOPS 10X

- 4.18 g MOPS
- 4 M Acetato de sodio pH 5.2
- 0.25 M pH 8.0
- aforar a 100 ml

### SOLUCIÓN DE PREHIBRIDACIÓN

- 50% Formamida desionizada
- 5X Denhardt
- 1% SDS
- 100  $\mu\text{g/ml}$  DNA espermatozoos de Salmón
- 6X SSC

### SOLUCIÓN DE DENHARDT 50X

- 0.5 g Ficoll
- 0.5 g Polivinilpirrolidona
- 0.5 g Suero bovino albúmina
- $\text{H}_2\text{O}$  para 50 ml
- filtrar y almacenar a  $-20^\circ\text{C}$

### PBS 0.05%-TWEEN 20 pH 7.4

- 8 g NaCl
- 0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 2.9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 0.2 g KCl
- 0.5 ml Tween 20

### PBS 20 mM pH 7.4

- 1.7906 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 0.6899 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 4.4999 g NaCl
- aforar a 500 ml

### PB 50 mM pH 7.4

- 4.4765 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 1.725 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- aforar a 500 ml

**REACTIVO DE BRADFORD 5X**

- 250 mg Azul de Coomassie G-250
- 125 ml Etanol 100%
- 250 ml Ácido fosfórico
- aforar a 500 ml

**SOLUCIÓN ALSEVER pH 6.1**

- 0.275 g Ácido cítrico
- 4 g Citrato de sodio
- 2.1 g NaCl
- 10.25 g Dextrosa
- aforar a 500 ml ajustar pH 6.1 y esterilizar

**LÍQUIDO DE CENTELLEO**

- 700 ml Tolueno
- 300 ml Tritón X-100
- 4 g Omnifluor

**POLIACRILAMIDA PARA GEL DE SECUENCIACIÓN**

- 11.6 g Acrilamida
- 0.6 g Bis-acrilamida
- 93.6 g Urea
- 10 ml TBE 10X
- aforar a 200 ml y filtrar

**BUFFER T D M N**

Para 10 ml

- |                            |           |
|----------------------------|-----------|
| • 280 mM T E S             | 0.642 g   |
| • 2.76 M HCl               | 0.0996 ml |
| (aprox 100 µl)             |           |
| • 50 mM DTT                | 0.0771 g  |
| • 170 mM MgCl <sub>2</sub> | 0.1629 g  |
| • 200 mM NaCl              | 0.1169 g  |

**BUFFER DE CARGA (DNA-RNA)**

- 0.25% Azul de bromofenol
- 0.25% Xilen cianol FF
- 30% Glicerol en agua

**BUFFER DE CARGA (Secuenciación)  
(Sequencing Stop Solution)**

- 98% Formamida desionizada
- 10 mM EDTA (pH 8.0)
- 0.025% Xilen cianol FF
- 0.025% Azul de bromofenol

**AZUL DE COOMASSIE**

- Disolver 0.25 g de Azul brillante de Coomassie R250 en
- 90 ml de metanol:H<sub>2</sub>O (1:1 v/v) y
- 10 ml de Ácido acético glacial.
- Filtrar la solución a través de filtro Whatman n° 1

**ROJO PONCEAU S**

- 2 g Ponceau S
- 30 g Ácido tri-cloro acético
- 30 g Ácido sulfosalicílico
- H<sub>2</sub>O para 100 ml

**AGUA DEPC 0.05%**

(Agua tratada)

- 0.5 ml de DEPC para 1 lt de H<sub>2</sub>O
- agitar 2 hrs por lo menos y esterilizar.