

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**ANÁLISIS DE LA ORGANIZACIÓN GENÉTICA Y DE LA EXPRESIÓN DEL
COMPLEJO EhCPADH Y EhRabB EN LA CLONA L-6 DE *Entamoeba
histolytica*, DEFICIENTE EN FAGOCITOSIS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

BEATRIZ ADRIANA CASTILLO JUÁREZ

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



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial al Dr. Mario A. Rodríguez por la dirección de este trabajo, por el apoyo y la confianza depositada en mí para concluirlo.

A la Dra. Esther Orozco por permitirme ser parte de este equipo de trabajo.

A la Dra. Guillermina García Rivera por sus consejos y sugerencias en la realización de este trabajo pero sobre todo por su valiosa amistad.

Al Dr. Feliciano Sánchez y la Dra. Casia Andrade por el interés y apoyo moral que me han brindado antes y durante la realización de este trabajo.

Y por la revisión de esta tesis agradezco a:

Dr. Sergio Vaca Pacheco

Dr. Jorge Campos

Dra. Martha Martínez

Y al M. en C. Elías Piedra

A Rosa María García Pérez por su valiosa amistad y apoyo en todo momento durante la realización de este trabajo.

A Alfredo Padilla Barberi por su gran ayuda en la elaboración de material de apoyo.

Por su gran apoyo técnico:

Al Sr. Alberto García Miguel

A la Sra. Alejandrina Reyes Vivar

A Claudia Montiel Tovar por su apoyo secretarial.

A mis compañeros y amigos: Ernesto, Alfredo Rodríguez (Freddy), Gaby, Lalo, Paco, Quique, Gustavo, Balby, Renata, Alma, Julio, Martha, Juan, Lorena, Gaby (CB), Sergio, Carlos, Oscar Angel, Alejandro, Claus, Sofí, Chuchín, Micky, Jesús.

A todos los integrantes del Laboratorio 2 del Depto. de Patología Experimental del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional:

Mario A., Rossy, Guille, Mónica, Andrés, Alfredo, Ramón, Lalo Carrillo, Alberto, Xóchitl, Caro, Lupita, Ceci, Maty, Lalo Flores, Mayra, Juan Pedro, Israel, Esther, Ale, Claudia, Tomás, Marisol, Rocío, César, Laurence, Karina, Leo, Dulce, Elisa.

DEDICO ESTA TESIS A

MIS PADRES:

María de Lourdes Juárez I.

Angel Castillo Quiroz

Por el amor que me han brindado siempre, pero principalmente por el apoyo y la confianza que han depositado en mi, por eso, este trabajo es por ustedes y para ustedes con mucho cariño, respeto y admiración.

MIS ABUELOS:

Magdalena y Enrique[†]

Gracias por su cariño, comprensión y por alentarme siempre a salir adelante.

MI ESPOSO

Ernesto Mendoza Duarte

Por su amor, apoyo y paciencia que me tuvo durante la realización de este trabajo, pero sobre todo, porque forma una parte importante de mi vida, con mucho cariño.

MIS HERMANOS

Oscar y Alejandro

Por su amistad y cariño, porque los tres juntos formamos un fuerte vínculo para nuestros padres.

CONTENIDO

ÍNDICE	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	v
I INTRODUCCIÓN	1
1. CICLO DE VIDA DE <i>E. histolytica</i>	2
2. MORFOLOGÍA	3
3. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD	5
3.1 Adhesión	5
3.2 Citólisis dependiente de contacto	7
3.3 Fagocitosis	7
3.4 Transporte intracelular	9
3.5 Las pequeñas GTPasas	11
3.6 Rabs como reguladores del trafico vesicular	12
3.7 Rabs en <i>E. histolytica</i>	13
4. IMPORTANCIA DE LAS MUTANTES EN EL ESTUDIO DE LA GENÉTICA MODERNA	13
II ANTECEDENTES	15
1. EL COMPLEJO EhCPADH DE <i>E. histolytica</i>	15
III HIPOTESIS	19
IV OBJETIVO GENERAL	20
V OBJETIVOS ESPECIFICOS	
VI MATERIALES Y MÉTODOS	21
1. Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	21
2. Obtención de DNA	21
3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	22
5. Extracción de proteínas totales	24
6. Análisis de las proteínas en SDS-PAGE	24

7. Inmunotransferencia (WESTERN-BLOT)	25
8. Inmunolocalización de EhRabB	26
9. Obtención de eritrocitos humanos	26
10. Inmunolocalización de EhRabB durante la fagocitosis	26
11. Microscopía confocal	27
VII RESULTADOS	28
1. Purificación de DNA total de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	28
2. Amplificación del gen <i>Ehadh112</i>	28
3. Amplificación de la región intergénica entre los genes <i>Ehcp112</i> y <i>Ehadh112</i> de <i>E. histolytica</i>	31
4. Amplificación del fragmento que codifica para <i>Ehcp112</i>	31
5. Amplificación de la región intergénica entre los genes <i>Ehcp112</i> y <i>EhrabB</i> de <i>E. histolytica</i>	34
6. Amplificación del gen <i>EhRabB</i>	34
7. Expresión de las proteínas EhCPADH y EhRabB en la clona L-6	37
8. Inmunolocalización de EhRabB	40
9. Inmunolocalización de la proteína EhRabB durante la eritrofagocitosis	40
VIII DISCUSIÓN	43
IX CONCLUSIONES	47
X REFERENCIAS	48
XI APÉNDICE	56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*
- Figura 2.** Modelo de la fagocitosis por trofozoítos de *E. histolytica*
- Figura 3.** Organización de los genes *EhrabB*, *Ehcp112* y *Ehadh112* de *E. histolytica*
- Figura 4.** Obtención de DNA total
- Figura 5.** Amplificación por PCR del gen *Ehadh112*
- Figura 6.** Amplificación por PCR de la región intergénica de los genes *Ehcp112* y *Ehadh112*
- Figura 7.** Amplificación por PCR del gen *Ehcp112*
- Figura 8.** Amplificación por PCR de la región intergénica entre los genes *EhrabB* y *Ehcp112*
- Figura 9.** Amplificación por PCR del gen *EhrabB*
- Figura 10.** Análisis electroforético de proteínas totales de trofozoítos de la clona A y L-6
- Figura 11.** Western blot de proteínas totales de trofozoítos de la clona A y L-6
- Figura 12.** Inmunolocalización de la proteína EhRabB
- Figura 13.** Inmunolocalización de la proteína EhRabB durante la eritrofagocitosis

LISTA DE ABREVIATURAS

EhKO	Organelo de <i>E. histolytica</i> parecido al kinetoplasto
kDa	Kilodaltones
CHO	línea celular aislada de ovario de hámster (<i>Chinese Hamster Ovary</i>)
SREHP	Proteína rica en serinas de <i>E. histolytica</i>
BrdU	Bromodesoxiuridina
TYI-S-33	medio de tripticasa, extracto de levadura, hierro y suero para cultivo axénico de <i>E. histolytica</i>
DNA	ácido desoximibonucleico
μl	microlitro
kb	kilobases
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PHMB	<i>para</i> -hidroximercuriobenzoato
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (<i>polyacrilamide gel electrophoresis-SDS</i>)
SDS	dodecil sulfato de sodio (<i>sodium dodecil sulfate</i>)
PBS	solución salina amortiguadora de fosfatos (<i>phosphate buffer saline</i>)
IgG	Inmunoglobulinas tipo G
IgM	Inmunoglobulinas tipo M
PFA	paraformaldehido
MAb	anticuerpo monoclonal
RBCs	eritrocitos (<i>red blood cells</i>)

RESUMEN

La identificación y caracterización de las moléculas que participan en la virulencia de *Entamoeba histolytica* es de suma importancia para, eventualmente, tratar de bloquear la patogenicidad del parásito. Recientemente se localizó en el DNA amibiano un *locus* que contiene tres genes que codifican para proteínas que participan en su virulencia: **i)** el complejo EhCPADH, que está compuesto por una adhesina (EhADH112) y una cisteína proteasa (EhCP112); y **ii)** una proteína reguladora del transporte intracelular (EhRabB) que participa en la fagocitosis. Con el fin de dar más evidencias de la participación de estas proteínas en la patogenicidad de *E. histolytica*, en este trabajo se analizó la organización genómica de este *locus*, la expresión y la localización subcelular de estas proteínas en la clona L-6, una mutante deficiente en fagocitosis y en virulencia. Mediante estudios de PCR utilizando oligonucleótidos específicos, se determinó que en la mutante existe una organización genómica similar a la reportada para la clona silvestre. También, se realizaron experimentos de Western blot utilizando extractos totales de trofozoítos y anticuerpos específicos contra estas proteínas. En estos ensayos se encontraron diferencias en la expresión de estas proteínas en la clona mutante con respecto a la silvestre. Finalmente, mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta, se encontraron diferencias en la localización subcelular de EhRabB durante la fagocitosis.

Estos resultados podrían sugerir que la deficiencia en fagocitosis de la clona L-6 podría deberse, al menos en parte, a la baja expresión de EhCPADH, así como, a la baja velocidad de traslocación de la proteína EhRabB a bocas fagocíticas.

I. INTRODUCCION

La amibiasis es la enfermedad infecciosa del ser humano causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. Esta especie vive como comensal en el lumen intestinal, aunque por factores aún desconocidos puede invadir la mucosa llegando incluso a diseminarse a otros órganos por vía sanguínea, principalmente al hígado y con menos frecuencia, a pulmón, cerebro, piel, genitales, bazo, riñón, incluso el cartílago y el hueso pueden resultar erosionados por efecto de estos parásitos sensibles a los cambios osmóticos y de apariencia inofensiva (Martínez-Palomo, 1982; Kretschmer, 1994). En la mayoría de los casos, la amibiasis intestinal se manifiesta como diarrea o disentería y tiene un curso limitado (Martínez-Palomo, 1986). Las fuentes principales de infección son la falta de higiene en la preparación de los alimentos, el inadecuado tratamiento de las aguas negras y la falta de higiene personal. Este protozooario entérico es responsable de más de 100, 000 muertes cada año a nivel mundial, situándose en segundo lugar en mortalidad debido a protozoarios parásitos, solo después de la malaria (WHO, 1997).

La amibiasis se puede llegar a observar en países con gran desarrollo económico, sin embargo su frecuencia es incomparablemente más alta en los países en vías de desarrollo. Las naciones que a la vista de los investigadores constituyen los máximos representantes mundiales de dicho padecimiento son: India, Egipto, Turquía y México a los cuales se les conoce como "Las patrias de la amibiasis" (Kretschmer y col; 1994).

E. histolytica es un parásito que 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 citoplasmática rudimentaria y división nuclear sin cromosomas evidentes

(Martínez-Palomo, 1987). Así, *E. histolytica* puede ser considerado como un eucarionte rudimentario.

La clasificación taxonómica de *E. histolytica* de acuerdo a Martínez (1985) es la siguiente:

Phylum	Protozoa
Subphylum	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosea
Subclase	Gymnamoebia
Orden	Amoebida
Familia	Entamoebidae
Género	Entamoeba
Especie	<i>Entamoeba histolytica</i>

1. CICLO DE VIDA DE *E. histolytica*

E. histolytica presenta una fase invasiva (trofozoíto) y otra quística (quiste), siendo esta última la que permite propagarse a otros hospederos (Martínez-Palomo, 1982).

El ciclo de vida de *E. histolytica* consta de varios estadios consecutivos que son: quiste, metaquiste, trofozoíto y prequiste. (Fig.1).

La forma infectiva es el quiste, éste puede sobrevivir fuera del huésped por semanas o meses (Noble y Noble, 1976). La transmisión se presenta cuando un individuo ingiere alimentos contaminados con quistes (Fig. 1), entonces, en los intestinos los núcleos del quiste se dividen para formar ocho núcleos (metaquiste), cuya división del citoplasma produce 8 trofozoítos mononucleados. Los trofozoítos viven en el colon y pueden producir la invasión a los tejidos (Fig.1). La enquistación se produce cuando el trofozoíto sufre dos divisiones nucleares, su motilidad disminuye, el citoplasma se reduce (prequiste), entonces tienden a redondearse y se forman los típicos quistes tetranucleados (Fig.1). Se cree que los quistes no pueden pasar a la fase de trofozoíto en el mismo huésped, si no que,

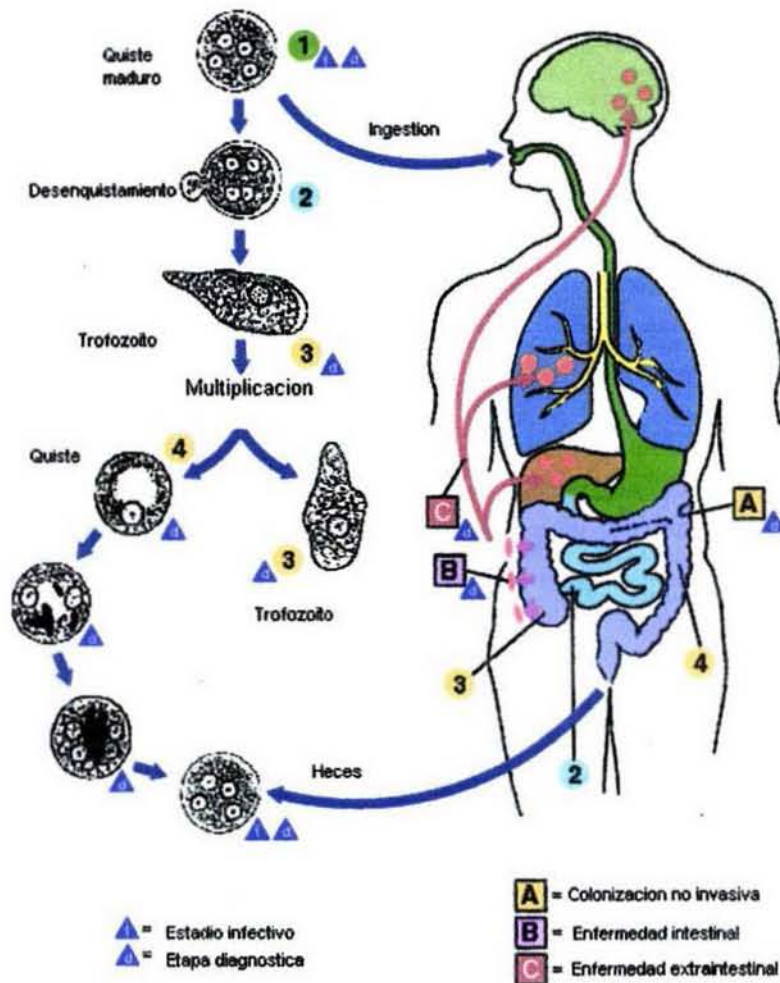


FIGURA 1. CICLO DE VIDA DE *Entamoeba histolytica*.

El ciclo de vida de *E. histolytica* inicia con la ingestión de quistes en bebidas o alimentos contaminados (1). En el intestino, el quiste da lugar a ocho trofozoitos que se adhieren al epitelio y que se dividen por fisión binaria (2,3). Los trofozoitos pueden seguir diferentes vías: salir con las heces para morir, convertirse en comensal del hospedero (A), colonizar el intestino e invadir mucosas (B), invadir otros órganos (C), enquistarse y salir con las heces hasta ser ingerido por un nuevo hospedero (4).

Tomado de <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTLM/Amebiasis.htm>

tienen que ser expulsados con las heces para empezar un nuevo ciclo, por lo que las personas infectadas pueden eliminar hasta un promedio de 45 millones de quistes por día (Martínez-Palomo, 1982; Ravdin, 1988).

2. MORFOLOGIA

Trofozoíto: La forma invasiva de *E. histolytica* habita en la cavidad del tracto gastrointestinal, es pleomorfica, mide de 20-50 μm de diámetro y algunos autores han propuesto que se origina de una forma no invasiva. El trofozoíto es capaz de penetrar en los tejidos y se caracteriza por la gran ingestión de eritrocitos, además de que puede producir úlceras y lesiones de diferentes órganos de hospederos humanos. Estas lesiones se caracterizan primordialmente por una necrosis extensa (Kretschmer y col; 1994).

El citoplasma de los trofozoítos amibianos presenta dos áreas relativamente bien definidas: una porción externa hialina, transparente, sin gránulos, que recibe el nombre de ectoplasma, y una porción interna granular que contiene diversas inclusiones, algunas de ellas vacuolas fagocíticas, denominada endoplasma. En la superficie del trofozoíto amibiano están presentes tres tipos de especializaciones: **i)** los pseudópodos, estructuras motrices orientadas frontalmente, **ii)** el uroide, apéndice situado en la región caudal de la célula y relacionado con funciones defensivas de ésta, y **iii)** los filopodios, proyecciones del citoplasma de las amibas vinculadas con su actividad fagocítica (Fonte, 2000).

Anteriormente se pensaba que las amibas carecían de un citoesqueleto estructurado y de organelos en su citoplasma. Sin embargo, Ghosh y col, (1999) encontraron por experimentos de microscopía confocal quitinasa retenida en algunas vacuolas citoplásmicas, sugiriendo que en este parásito existe un sistema semejante al retículo endoplásmico y al complejo de Golgi. Por otro lado, estos sistemas han sido identificados también mediante microscopía electrónica de transmisión empleando marcadores específicos como la tiamino-pirofosfatasa (Mazzuco y col, 1997). Además, utilizando naranja de acridina y por hibridación *in*

situ de trofozoítos con una sonda de DNA que codifica los RNA ribosomales (rDNA) se detectó DNA citoplasmático en trofozoítos vivos en una estructura que Orozco y col, (1997) llamaron EhKO. Por otro lado Mai y col, (1999) y Tovar y col, (1999), basándose en la presencia de proteínas de origen mitocondrial en estructuras citoplásmicas, han reportado un organelo análogo a mitocondria y que pudiera ser el EhKO.

Quiste: La forma infectiva del organismo es de forma redondeada u oval, mide de 8 a 20 μm de diámetro. Presenta una pared de quitina, membrana plasmática, citoplasma y dependiendo de su madurez contiene de uno a cuatro núcleos, que es la forma madura. Su pared quitinosa le confiere resistencia hasta por ocho días en el suelo a una temperatura de 28-34°C y más de un mes a 10°C, en cambio mueren a 68°C (Freachem, 1983). Los quistes recién formados tienen un solo núcleo grande semejante al de los trofozoítos, pero al evolucionar, este núcleo se divide en dos y estos a su vez por otra división producen cuatro núcleos pequeños, característicos del quiste maduro, los núcleos mantienen su estructura y la cantidad original de cromatina (Ravdin, 1988).

3. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

El estudio de las propiedades biológicas de los trofozoítos amibianos que participan en la expresión de la virulencia, han permitido distinguir tres etapas en el mecanismo agresor de *E. histolytica* sobre la célula blanco: adhesión, citólisis dependiente de contacto y fagocitosis (Orozco y col, 1983; Martínez-Palomo, 1986; Pérez-Tamayo, 1986; Ravdin, 1986).

3.1 ADHESIÓN

Los trofozoítos de *E. histolytica* se adhieren a monocapas de células epiteliales en cultivos y también a superficies inertes como plástico y vidrio. La adhesión de los trofozoítos a sustratos 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, 1985; 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. En estos ensayos se mostró que los trofozoítos de *E. histolytica* tienen una preferencia para unir los eritrocitos de hámster y de humano (Olguín, 1984). Se han descrito dos proteínas con actividad de lectina que se identificaron por la capacidad de los extractos amibianos para aglutinar eritrocitos y células de la línea CHO. Una de ellas es inhibida por oligosacáridos de N-acetil-glucosamina (Kobiler y Mirelman, 1980), y tiene un peso molecular de 220 kDa (Rosales-Encina y col; 1987). La otra lectina se inhibe por galactosa y N-acetil-galactosamina, aglutina eritrocitos humanos y células 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 (Ravdin, 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).

3.2 CITOLISIS DEPENDIENTE DE CONTACTO

El efecto citoletal de los trofozoítos sobre la célula blanco fue demostrado por estudios microcinematográficos (Ravdin y Guerrant, 1980 y 1981), los cuales mostraron que el contacto prolongado entre el efector y las células blanco no fue un elemento necesario para que ocurriera la citólisis (Kretschmer, 1994). 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). En este mecanismo se sugiere la participación de una proteína que forma poros en la membrana plasmática de la célula blanco (amebaporo) (Lynch y col, 1982; Young y col, 1982) y diferentes enzimas hidrolíticas, principalmente cisteína proteinasas (Tannich, 1992), ya que se ha observado que su secreción es un factor importante para determinar el grado de agresividad de los trofozoítos. Además, se ha demostrado que monocapas de fibroblastos son destruidas por las cisteína proteinasas purificadas de *E. histolytica* (Keene y col, 1990).

3.3 FAGOCITOSIS

Una vez que se ha llevado a cabo la citólisis dependiente de contacto, las amibas patógenas ingieren a las células lisadas aunque pueden también ingerir células vivas (Martínez-Palomo, 1986; Kretschmer, 1994). Los trofozoítos pueden internalizar partículas a sus vacuolas citoplasmáticas por mecanismos que requieren polimerización de actina (Bailey y col, 1985). Los trofozoítos de *E. histolytica* son fagocitos profesionales con una gran capacidad de internalizar una variedad de material particulado e incluso células como bacterias, células epiteliales y glóbulos rojos (Rabinovitch, 1995).

La fagocitosis juega un papel importante en la patogenia de *E. histolytica*, pues 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). Además, mutantes deficientes en fagocitosis también son deficientes en la producción de abscesos hepáticos en modelos animales (Orozco y col, 1983; Orozco y col, 1985; Rodríguez y Orozco, 1986). La clona L-6 es una mutante que muestra una notable reducción en la velocidad de fagocitosis, en el efecto citopático y en la formación de abscesos hepáticos, sin embargo, mantiene su capacidad para adherir eritrocitos humanos (Orozco y col, 1983).

E. histolytica presenta dos tipos de fagocitosis que se pueden distinguir fácilmente: **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). Su especificidad se demostró por la diferente afinidad que muestran los trofozoítos para adherir e ingerir eritrocitos de diferentes especies de mamíferos como rata, cuyo, hámster, humano (Olguín, 1984), borrego y bovino (Ravdin y Guerrant, 1981). García-Rivera y col. (1982) demostraron al utilizar mutantes en adhesión que la disminución en esta función disminuye la fagocitosis de los trofozoítos amibianos.

Orozco y col. (1987) propusieron un modelo sobre la fagocitosis en *E. histolytica* (Fig. 2). Este modelo propone que los trofozoítos son atraídos quimiotácticamente hacia la célula blanco (Bailey, 1982) (Fig. 2A). Posteriormente, se realiza la unión de los trofozoítos a la superficie de la célula blanco, mecanismo en el que intervienen las adhesinas localizadas en la superficie amibiana y receptores específicos de la célula blanco (Smith, 1977; Orozco y col, 1982) (Fig. 2B). 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. 2C), y ocurre un desencadenamiento de señales intracelulares que permiten la secreción de enzimas, entre ellas algunas proteinasas, que producen la lisis de

la célula blanco (McLaughlin y Aley, 1985) (Fig. 2D). Mas tarde ocurre la emisión de pseudópodos por el trofozoíto, para envolver a la célula blanco (Fig. 2E), permitiendo así la internalización de la vacuola fagocítica (Fig. 2F) para su posterior fusión con el lisosoma, dando lugar a la formación del fagosoma (Fig. 2G). Finalmente, ocurre la acción de las enzimas digestivas amibianas sobre el material fagocitado y la exocitosis de material no digerido (Fig. 2H). (Chapman-Andersen, 1977).

IZT.

3.4 TRANSPORTE INTRACELULAR

Los eventos de endo y exocitosis juegan un papel importante en la patogenicidad de *E. histolytica*. Las adhesinas deben transportarse hacia la membrana plasmática y el amebaporo y las enzimas hidrolíticas deben secretarse para ejercer su efecto citopático. Además, la ingestión de las células blanco es un evento de endocitosis. 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 eucariontes el transporte intracelular se lleva acabo mediante el uso de vesículas acarreadoras. Existen dos tipos de vesículas: **a)** las cubiertas con clatrina, que median el transporte de la superficie celular a través de la vía endocítica, así como también el exporte de las 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 (Olkkonen y Stenmark, 1997).

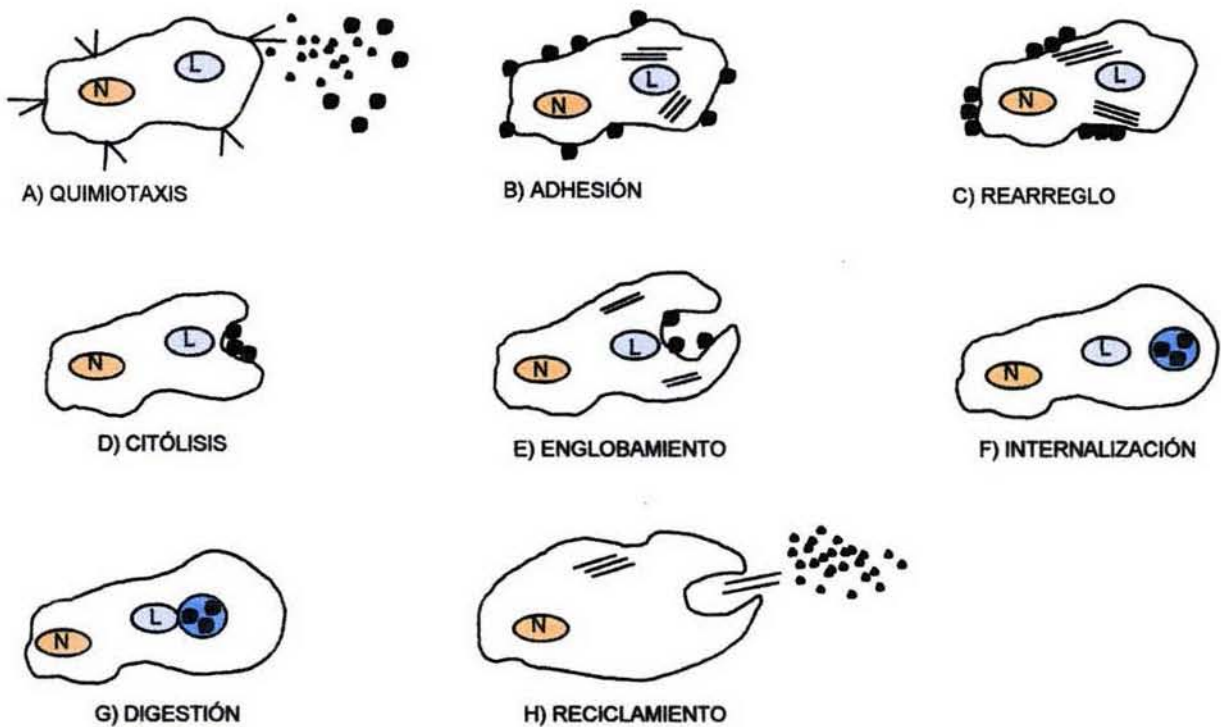


FIGURA 2. MODELO DE FAGOCITOSIS POR TROFOZOÍTOS DE *E.histolytica*.

A) Atracción quimiotáctica de los trofozoítos hacia la célula blanco. **B)** unión de los trofozoítos a la superficie de la célula blanco. **C)** redistribución de las células blanco en la superficie de los trofozoítos. **D)** secreción de enzimas líticas. **E)** emisión de pseudópodos en los trofozoítos para envolver a la célula blanco. **F)** Internalización de la envoltura membranal que contiene a la célula blanco. **G)** acción de las enzimas digestivas amibianas sobre el material fagocitado. **H)** reciclamiento membranal y exocitosis (Hidalgo, M. E. 1989).

Dos tipos de proteínas han sido identificadas como esenciales en la regulación de la generación y fusión de vesículas: **a)** Proteínas integrales de membrana conocidas como SNAREs (por sus siglas en inglés Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptor), necesarias para el ensamblaje vesicular y la fusión (Hay y Scheller, 1997). Si dos proteínas SNAREs interactúan desde diferentes membranas, las dos membranas estarán necesariamente muy cerca una de otra; entonces los SNAREs pueden ser candidatos tanto para determinar la especificidad de la fusión de membrana como para conducir el proceso mismo de fusión mediante interacciones "α-helicoide enrollado" entre ellas (Gerst, 1999). Estas interacciones consisten en dos o más α hélices enroscadas que originan a estructuras muy estables que pueden alcanzar hasta 100 nm o más de longitud (Stryer, 1995); y **b)** Proteínas Rab/YTP/Sec4, pequeñas GTPasas (21-25 kDa) las cuales constituyen la rama más larga de la superfamilia Ras, y 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).

3.5 LAS PEQUEÑAS GTPasas

El concepto de las GTPasas como reguladoras del transporte vesicular se estableció con base en la identificación de las mutantes *Sec 4*, aisladas de un tamizaje para mutantes termosensibles de *S. cerevisiae* deficientes en secreción de proteínas (Novick y col, 1980). Existen tres familias importantes de GTPasas involucradas en el tráfico vesicular: **i)** Sar 1p, la cual controla el transporte entre el retículo endoplásmico y el complejo Golgi en levaduras; **ii)** ARF (Factor de ribosilación de ADP) que controlan el ensamblaje y/o formación de la cubierta de clatrina en vesículas entre el complejo de Golgi; y **iii)** Rab/YTP, necesarias para la formación y/o consumo de vesículas (Schmid, 1993). 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).

Las pequeñas GTPasas se caracterizan por formar un plegamiento tridimensional común, que en el estado de unión a GTP, pueden unir una variedad de proteínas efectoras localizadas río abajo de la cascada de transporte vesicular (González y Scheller, 1999).

3.6 Rabs COMO REGULADORES DEL TRÁFICO VESÍCULAR

Para realizar su función de regular el tráfico vesicular, las proteínas Rab sufren un intrincado ciclo de interacciones con membranas y proteínas (González y Scheller, 1999). Las proteínas Rab son modificadas postraduccionalmente en las cisteínas localizadas en su extremo carboxilo terminal por la adición de dos grupos geranil-geranilo, los cuales median su asociación con las membranas vesiculares cuando Rab está en su estado activo de unión a GTP (González y Scheller, 1999).

Actualmente se piensa que las proteínas Rabs actúan río arriba de las SNAREs en la cascada de transporte, regulando de alguna manera la habilidad para formar complejos de fusión de membranas (Armstrong, 1999). La probable función de la interacción de la proteína Rab con las proteínas efectoras es regular la fusión de las vesículas blanco, para lo cual se proponen diferentes vías (González y Scheller, 1999).

a) Una proteína Rab puede facilitar específicamente el transporte vectorial de las vesículas. Las vesículas son transportadas de su sitio de origen a los compartimentos aceptores probablemente a través de asociaciones con elementos del citoesqueleto y motores transportadores (Echard y col, 1998).

b) Las proteínas Rab pueden regular el tráfico vesicular en el paso de fusión de la vesícula (González y Scheller, 1999), ya que cada proteína efectora contiene un dominio de unión a proteínas Rab (RBD), seguido por un dominio de conexión capaz de interactuar con una segunda Rab o con la membrana blanco (Vitale y col., 1998).

c) Una vez que una vesícula se ha unido a su sitio de fusión, las proteínas Rab pueden activar selectivamente la maquinaria de fusión de los SNAREs. El mecanismo de esta activación es desconocido, pero puede involucrar interacciones directas de Rab o, más probablemente, interacciones entre SNAREs y los efectores (Bean y col, 1997).

d) Las proteínas Rab pueden regular el transporte de carga a organelos específicos mediante la unión de efectores que se unen a su vez a moléculas de carga (Carroll y col, 2001).

3.7 Rabs en *E.histolytica*

En *E. histolytica* se ha descrito la presencia de varias proteínas Rab, como la proteína EhRabB la cuál esta involucrada en la fagocitosis del parásito (Rodríguez y col, 2000), las proteínas Rab 7, Rab 11, Rab 11B y Rab 11C que están asociadas con compartimentos endosomales tempranos y tardíos (Temesvari y col, 1999; Saito-Nakano y col, 2001), la proteína Rab 5 localizada en vacuolas fagocíticas y requerida para la fusión de endosomas tempranos (Saito-Nakano y col, 2001), una proteína homóloga a Rab 8, involucrada en el transporte vesicular hasta la membrana plasmática (Juárez y col, 2001), la proteína Rab 1 que esta involucrada en el transporte del Golgi a el RE y también las proteínas Rab A (Temesvari y col, 1999), Rab C - Rab I (Saito-Nakano y col, 2001), y cuya función y localización no han sido descritas.

4. IMPORTANCIA DE LAS MUTANTES EN EL ESTUDIO DE LA GENÉTICA MODERNA

Las leyes básicas de la herencia fueron enunciadas en 1866 por Gregor Mendel y deducidas a partir del análisis de una serie de cruzamientos genéticos entre cepas de raza pura (que producen una descendencia con los mismos caracteres que los padres) de chícharos de jardín (*Pisum sativum*), que difieren

entre sí en ciertos caracteres bien definidos, como la forma de la semilla (lisa o rugosa), el color de la semilla (amarillo o verde), o el color de la flor (púrpura o blanco). Mendel halló que cuando se cruzan padres (**P**) que difieren en un solo carácter, por ejemplo en la forma de la semilla, toda la descendencia (**F1** ó primera generación filial) posee el carácter de uno solo de los padres, en este caso semillas lisas. El carácter que aparece en F1 se llama dominante mientras que el otro carácter se denomina recesivo. En la segunda generación filial (**F2**) las tres cuartas partes poseen el carácter dominante y una cuarta parte, el carácter recesivo.

Mendel explicó sus observaciones con la hipótesis de que cada uno de los distintos pares de caracteres opuestos se debe a un factor (actualmente llamado **gen**) que posee formas alternativas (**alelos**) (Voet y Voet, 1992).

Algunos experimentos realizados en 1902 por Boveri y Sutton probaron que los genes formaban parte de un cromosoma. La teoría del gen como pequeña unidad del cromosoma fue desarrollada por T.H. Morgan y sus colaboradores a partir de experimentos realizados con la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. El gen clásico había sido definido como una estructura indivisible, una unidad de mutación y una unidad funcional, siendo estos tres atributos considerados como equivalentes.

Estos descubrimientos abrieron el camino hacia una genética molecular que fusiona a la química (bioquímica) y a la física (biofísica) con la biología (Gardner, 1991), con estas herramientas la genética ha logrado llegar hasta el conocimiento de las moléculas que forman los genes, al estudio de sus alteraciones (mutaciones) y de los mecanismos que participan en su expresión, así como al establecimiento de las técnicas para modificarlos deliberadamente (Ingeniería Genética).

Entre las herramientas que se han utilizado para estudiar las moléculas que participan en la virulencia de *E. histolytica*, se encuentra el aislamiento de trofozoítos que presentan alteraciones en funciones relacionadas con la virulencia (mutantes) (Orozco y col, 1983; Rodríguez y Orozco, 1986). Orozco y col, (1983) aislaron una clona amibiana no fagocítica a partir de un cultivo axénico de la cepa HM1:IMSS altamente virulenta. Para ello, los trofozoítos amibianos se alimentaron con bacterias *Escherichia coli* de la cepa CR34 Tim⁻ previamente cultivadas en un medio suplementado con bromodesoxiuridina (BrdU), posteriormente, se permitió que la BrdU se incorporará al DNA de los trofozoítos y éstos se irradiaron con luz UV, 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 y se cultivaron en el medio de cultivo descrito por Diamond y col (1978). Con esta estrategia se obtuvo la clona L-6, la cual muestra una notable reducción en la velocidad de fagocitosis, en el efecto citopático y en la formación de abscesos hepáticos; sin embargo, mantiene su capacidad para adherir eritrocitos humanos (Orozco y col, 1983).

Dado que la clona L-6 es silvestre en adhesión, la mutación o mutaciones que afectan su capacidad fagocítica debe(n) estar en un evento posterior a la adhesión, en alguno de los pasos descritos en la Fig. 2.

II. ANTECEDENTES

1. El complejo EhCPADH de *E. histolytica*

Utilizando anticuerpos monoclonales inhibidores de la adhesión y mutantes deficientes de adhesión Arroyo y Orozco (1987) identificaron una proteína involucrada en la adhesión, de los trofozoítos a su célula blanco y que inicialmente se le determinó un peso molecular de aproximadamente 112 kDa. A través de estudios de microscopía electrónica e inmunofluorescencia indirecta se observó que la adhesina se localiza en forma uniforme en la superficie de los trofozoítos

amibianos y en la membrana de algunas vacuolas (García-Rivera y col, 1994). Esta proteína se une específicamente a la superficie de eritrocitos humanos (Rodríguez y col, 1989) y participa en la fagocitosis, ya que se internaliza junto con las células blanco endocitadas (García-Rivera y col, 1999). Esta adhesina también 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, 1994), reafirmando el papel que desempeña esta molécula en la interacción de los trofozoítos con la célula blanco. Esta adhesina es muy inmunogénica, ya que es una de las principales proteínas reconocida por sueros de pacientes con absceso hepático amibiano (Arroyo y Orozco, 1987).

Para aislar el gen que codifica esta adhesina, Ayala (1989) realizó el inmunotamizaje de un banco genómico de *E. histolytica* con tres pasos de purificación: **a)** anticuerpos contra proteínas de superficie, **b)** con sueros de pacientes con absceso hepático amibiano y **c)** con anticuerpos policlonales anti-adhesina de 112 kDa. Mediante esta estrategia se aisló la clona recombinante λ gt112-19, la cual contiene un fragmento de DNA amibiano de 900 pb y cuyo producto de expresión fue reconocido por anticuerpos monoclonales dirigidos contra la adhesina (García-Rivera, 1997). Posteriormente, el fragmento de la clona λ gt112-19 se utilizó como sonda para el aislamiento del gen completo (García-Rivera y col, 1999).

La identificación del DNA que codifica la adhesina permitió definir que ésta es un complejo (EhCPADH) formado por dos polipéptidos codificados por genes adyacentes (García-Rivera y col, 1999). El primer gen (*Ehcp112*) codifica para una proteína con homología a cisteína-proteinasas. Posteriormente se localiza un fragmento de DNA no codificante de 188 pb, y finalmente en el extremo 3' se localiza el gen *Ehadh112*, que codifica para un polipéptido de 78 kDa que contiene el epítipo reconocido por los anticuerpos monoclonales anti-adhesina (García-Rivera y col, 1999) (Fig. 3). El peso molecular del complejo, deducido de la

secuencia de aminoácidos de los polipéptidos, se ha estimado en 124.6 kDa (García-Rivera y col, 1999).

Río arriba del gen *Ehcp112*, 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 en la cadena complementaria y a 332 pb del gen *Ehcp112*. El gen *EhRabB*, consta de 576 pb y codifica para una proteína de 192 aa con 40-42% de identidad a pequeñas GTPasas de la familia Rab (Fig. 3). La proteína *EhRabB* recombinante une específicamente GTP/GDP (Rodríguez y Orozco, 2000), y está localizada en pequeñas vesículas citoplasmáticas que se traslocan a la membrana plasmática en los primeros minutos de la fagocitosis, 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 (Rodríguez y col, 2000).

Dado que en el laboratorio contamos con la clona L-6 una mutante deficiente en fagocitosis, esto la convierte en una valiosa herramienta biológica para dilucidar los papeles del complejo EhCPADH y de *EhRabB* durante la fagocitosis, función relacionada en la patogenicidad de *E. histolytica*.

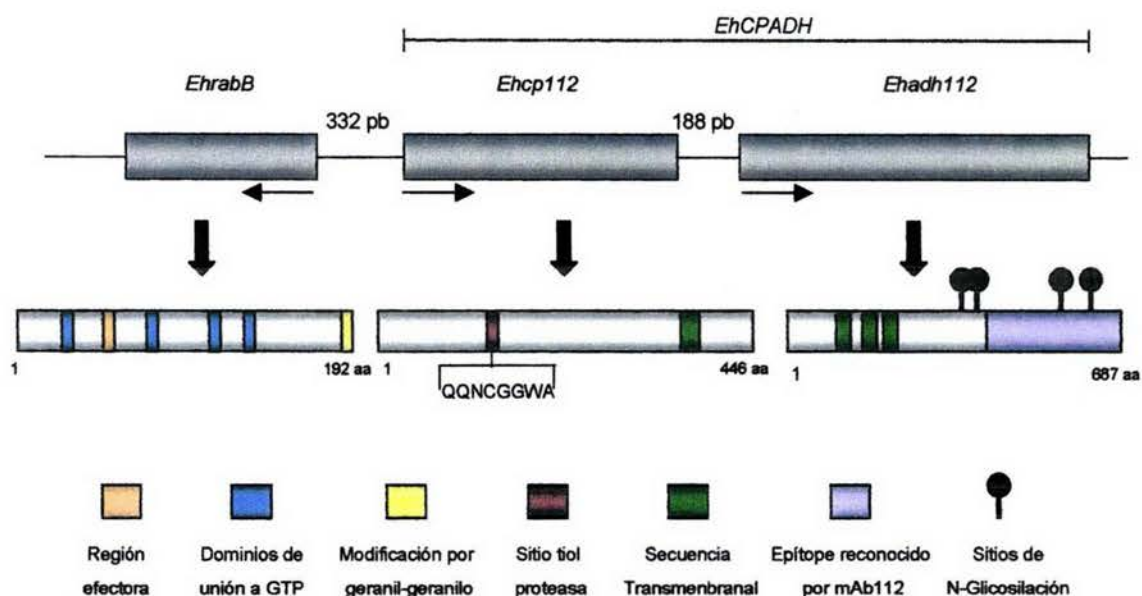


FIGURA 3. ORGANIZACIÓN DE LOS GENES *EhrabB*, *Ehcp112* Y *Ehadh112* DE *E.histolytica*.

El complejo EhCPADH está formado por dos polipéptidos codificados por genes adyacentes. El primer gen (*Ehcp112*) codifica para una cisteína proteinasa y el segundo (*Ehadh112*) codifica para una adhesina. Róo arriba del gen *Ehcp112* y en la cadena complementaria se identificó al gen *EhrabB* que codifica para una proteína involucrada en el transporte celular (EhRabB). (→) Dirección de la transcripción.

III. HIPOTESIS

Si el complejo EhCPADH y la proteína EhRabB participan en la fagocitosis de *E. histolytica*, entonces estas proteínas deben estar alteradas en su expresión y/o en su función en la mutante L-6 deficiente en fagocitosis.

IV. OBJETIVO GENERAL

Analizar la organización genética y la expresión del complejo EhCPADH y de EhRabB en la clona L-6 de *E. histolytica* deficiente en fagocitosis.

V. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✦ Analizar la organización genética de los genes *Ehadh112*, *Ehcp112* y *EhrabB* en la clona L-6.
- ✦ Analizar la expresión de las proteínas EhRabB y del complejo EhCPADH en la clona L-6.
- ✦ Determinar la localización subcelular de EhRabB durante la fagocitosis en la clona L-6.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1) CULTIVO DE TROFOZOÍTOS DE *E. histolytica*

Los trofozoítos de las clonas A (silvestre) y L-6 (mutante deficiente en fagocitosis) (cepa HM1: IMSS), se cultivaron axénicamente a 37°C en medio TYI (Ver apéndice) (Diamond y col., 1978), suplementado con 15% de suero bovino (HyClone Laboratories, USA) inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos, 3% de mezcla de vitaminas de Diamond (KC Biological, USA), 40 UI de penicilina /ml y 57 µg/ml de estreptomina (Lakeside) (medio TYI-S-33) (Ver Apéndice). Los trofozoítos en fase exponencial de crecimiento se cosecharon por incubación en baño de agua-hielo durante 5-10 min y centrifugando a 400 x g por 5 min.

2) OBTENCIÓN DE DNA

Una vez cosechados los trofozoítos, el paquete celular se congeló a -70°C y posteriormente se adicionaron 3 ml de regulador de extracción (EDTA 25 mM, NaCl 200 mM, SDS 0.5%, Tris-HCl 200 mM pH 8.5, Proteinasa K 2 mg/ml). La mezcla se incubó a 65°C durante 1 hora, una vez transcurrido el tiempo de incubación, el volumen total se distribuyó en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 4,000 x g durante 5 min el sobrenadante se recuperó y se distribuyó nuevamente en tubos Eppendorf (aprox. 500 µl en cada tubo), y a cada tubo se adiciono 1 ml de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1), se agitó fuertemente, se centrifugó a 11,000 x g durante 10 min y se recuperó la fase acuosa. Posteriormente se hizo una extracción adicional con cloroformo y se centrifugó a 11,000 x g durante 5 min nuevamente se recuperó la fase acuosa, se agregó RNasa libre de DNasa (50 µg/ml) y se incubó durante 30 min a 37°C. El DNA se precipitó con un volumen de etanol absoluto frío y se lavó con etanol al 70%. Por último, las pastillas se resuspendieron en 50 µl de agua desionizada estéril.

3) REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la amplificación por PCR de los genes *Ehcp112*, *Ehadh112* y *EhRabB*, se utilizaron 100-200 ng del DNA obtenido de los trofozoítos, 200 ng de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores (Ver tabla 1), 20 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), 3.0 μ l de buffer de reacción-PCR 10X (100 mM Tris/HCl, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.3), 2.6 μ l de MgCl₂ 25 mM (GIBCO) y 0.75 U de la enzima Taq polimerasa en un volumen de reacción de 30 μ l. La amplificación se llevo a cabo en un termociclador para PCR System 2700 (Applied Biosystems) utilizando el siguiente programa: una desnaturalización inicial a 94°C por 4 min 30 ciclos de: **i)** desnaturalización a 94°C por 1 min **ii)** hibridación de 50-65°C por 1 min y **iii)** extensión a 72°C por 1 min finalmente se dio una extensión adicional a 72°C por 7 min y una etapa a 4°C por 15 min.

4) ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

Para la separación de los fragmentos de DNA se utilizaron geles de agarosa al 1.2% en cámaras EASY-CAST (Owl Scientific, Inc.) en una solución de TAE 1X (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA pH 8). El amortiguador que se uso para el corrimiento electroforético fue la misma solución de TAE 1X. Las muestras se mezclaron con 2 μ l de solución de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30% en agua bidestilada) y se depositaron en los pozos. El corrimiento electroforético se llevo a cabo a 100 voltios durante 45 minutos aproximadamente. Para detectar el DNA, los geles se sumergieron a una solución de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) durante 2 min se lavaron con agua destilada y se visualizaron con la ayuda de un transluminador de luz U.V. (UVP, U.S.A).

Gen	Oligonucleótido iniciador sentido	Oligonucleótido iniciador antisentido
<i>EhrabB</i>	Rableu-s 5' ATG GGA GAC GTG TCA TCA TTA 3'	Rableu-a 5' ACA ACA TCC CTT ACT TTC TGT 3'
<i>Ehcp112</i>	Pro Xho 5' ATG ACA GCG ATT GTT GTC GCT 3'	Pro Sac 5' TTA GAT TGT ATG ATT GTA GAA TTG 3'
<i>Ehadh112</i>	MR-FR 5' TGA ATA GAC AAT TCA TTC C 3'	ADH 3' 5' TTA AAG AGA TGG AAA CAT AGG 3'
REGIONES INTERGENICAS		
<i>EhrabB</i> y <i>Ehcp112</i>	RabPE2 5' GGT CAC AAT ACT GAC GAA 3'	G-13 5' GGT ACT TCA TTC CAT 3'
<i>Ehcp112</i> y <i>Ehadh112</i>	G-12 5' TAG TAT TGA TGG ATG GG 3'	G-8 5' CAG AAC TGT GTG TTA GA 3'

Tabla 1. OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS GENES *Ehcp112*, *Ehadh112*, *EhrabB*, ASÍ COMO SUS REGIONES INTERGENICAS.

Los oligonucleótidos iniciadores (Primers) se diseñaron tomando en cuenta un mínimo de veinte y un máximo de treinta nucleótidos correspondientes al inicio (sentido) y al final (antisentido) de cada uno de los genes y de las regiones intergénicas.

5) EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Para la extracción de proteínas totales, los trofozoítos amibianos se cosecharon en fase logarítmica, se lavaron dos veces en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS 1X) (Ver Apéndice) y se cuantificaron. Las células se centrifugaron a 400 x g y se resuspendieron en una solución 100 mM del inhibidor de proteasas *para*-hidroximercuriobenzoato, agregando 1 ml por cada 1.5×10^7 trofozoítos. Entonces, las amibas se lisaron por ebullición, durante dos minutos, después se centrifugaron a 400 x g por 7 minutos a 4°C, el sobrenadante se recuperó y se prepararon alícuotas a las cuales se les agregó 1 volumen de solución amortiguadora de carga 2X (50 mM Tris-HCl pH 6.8; 100 mM DTT; 2% SDS; 0.1 % Azul de bromofenol y 10 % Glicerol), para desnaturalizar las proteínas excepto a una alícuota, la cual se utilizó para la cuantificación de proteínas por el método colorimétrico de Bradford (1976) (Ver Apéndice), y todas estas se almacenaron a -70°C hasta su uso.

6) ANALISIS DE LAS PROTEÍNAS EN SDS-PAGE

La separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) se realizó de la siguiente manera: El gel separador se preparó con acrilamida al 12 %, Bis-acrilamida 0.9 %, Tris-HCl 0.375 M pH 8.8 y SDS al 0.1 %. El gel se polimerizó agregando 0.05 % de persulfato de amonio y 0.003 % de TEMED. El gel concentrador se preparó con acrilamida al 5 %; Bis-acrilamida 0.36 %; Tris-HCl 0.125M pH 6.8; SDS al 0.1 %; persulfato de amonio 0.05 % y TEMED 0.005 %. Como amortiguador de corrida se uso una solución Tris 0.25 M, Glicina 1.92 M, 0.1 % de SDS pH 8.3 y la electroforesis de 30 µg de proteína se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 110 voltios (25 miliamperios) durante 1.20 h. 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.

7) INMUNOTRANSFERENCIA (WESTERN-BLOT)

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE, éstas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (supported nitrocelulose-1, Gibco, BRL), montando un dispositivo en el cual se arma una especie de "sandwich", poniendo sobre la base que da al polo negativo una fibra, sobre ésta papel whatman, 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 solución de transferencia frío (20 % Metanol; 10 % Tris-glicina), con esta misma solución se llenó la cámara de transferencia (BIO-RAD) y se corrió entre 250 y 300 mA a 4°C durante 30 min. Para verificar la transferencia de las proteínas al papel de nitrocelulosa, se hizo la tinción de la membrana con rojo Ponceau S (2 g Ponceau S; 30 g ácido tri-cloro acético; 30 g ácido sulfosalicílico y H₂O cbp 100ml) por 3 min se lavó lo suficiente con agua bidestilada para retirar el colorante y posteriormente se realizó el ensayo de Western-blot.

Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon durante toda la noche a 4°C con PBS-Tween 20-0.05 %-Leche 2 %. La membrana se lavó dos veces con PBS-Tween 20-0.05 % (Ver Apéndice), se incubó por 2 h a 37°C, ó 3 h a temperatura ambiente, ó toda la noche a 4°C en agitación constante con anticuerpos contra: **i)** EhRabB (Rodríguez y col, 2000) diluido 1: 500; **ii)** el complejo EhCPADH, monoclonal (directo) o policlonal (1:45000) ó **iii)** contra actina (directo). Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20-0.05 % y se incubaron con el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (anti-IgM de ratón, anti-IgG de conejo ó anti-IgG de ratón, según correspondiera) diluidos 1:2000 en PBS-Tween 20-0.05 %-Leche 1 % por 1.5 h a 37°C. Entonces, las membranas se lavaron dos veces con 20 mM PBS frío (Ver Apéndice), y una vez con 50 mM PB (Ver Apéndice) por 5 min y se revelaron con 4-Cloro-1-naftol (Ver Apéndice) y 0.06% de H₂O₂. La reacción se paró lavando con agua bidestilada.

8) INMUNOLocalIZACIÓN DE EhRabB

Los trofozoítos amibianos fueron crecidos sobre cubreobjetos estériles y fijados con paraformaldehido (PFA) 4% en PBS pH 6.8 a 37°C, durante 1 h, después se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% durante 15 minutos y se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% a 37°C durante 20 minutos. Posteriormente, los trofozoítos fueron incubados con anticuerpos contra la proteína EhRabB (1:250) durante 60 minutos a 37°C y posteriormente con un segundo anticuerpo acoplado a fluoresceína anti IgG de conejo (1:200) durante 30 minutos a 37°C. Las muestras se montaron en portaobjetos con 7 µl de vectashield (Vector) y se sellaron con esmalte de uñas. Finalmente las muestras se analizaron por microscopia de fluorescencia (Polyvar) o confocal (Bio-Rad).

9) OBTENCIÓN DE ERITROCITOS HUMANOS

Eritrocitos humanos frescos de cualquiera de los grupos sanguíneos A, B, O, se obtuvieron por punción venosa, en un volumen aproximado de 3 ml de sangre humana a los cuales se les agrego 3 ml de solución Alsever (0.275 g ácido cítrico, 4 g citrato de sodio, 2.1 g NaCl, 10.25 g dextrosa pH 6.1) como anticoagulante. Las células se centrifugaron a 1000 x g, durante 5 min la pastilla se lavó tres veces con PBS y se ajustaron a 1×10^8 eritrocitos/ml en medio TYI sin suero.

10) INMUNOLocalIZACIÓN DE EhRabB DURANTE LA FAGOCITOSIS

Los trofozoítos amibianos fueron crecidos en cubreobjetos estériles. Posteriormente se hizo la interacción amiba-eritrocito en relación 1:100, durante 2 y 10 minutos a 37°C. A los diferentes tiempos las células fueron fijadas con paraformaldehido (PFA) 4% en PBS pH 6.8 a 37°C durante 1 h, y después se realizaron los experimentos de inmunolocalización como se mencionó anteriormente.

11) MICROSCOPIA CONFOCAL

Para la obtención de imágenes por microscopia confocal se usó un microscopio NIKON diaphot. Para adquirir imágenes de fluorescencia se ocupó un filtro de 480 nm. Las imágenes se capturan en una computadora utilizando el programa COSMOS de BIO-RAD. Posteriormente, las imágenes se procesaron con el programa Voxelview en una computadora índigo de silicón Graphics.

VII. RESULTADOS

1. PURIFICACIÓN DE DNA TOTAL DE TROFOZOÍTOS DE *E. histolytica*

Con el fin de analizar la organización genética de los genes *Ehadh112*, *Ehcp112* y *EhrabB*, se realizaron amplificaciones de estos genes mediante PCR. Para ello, lo primero fue aislar el DNA de los trofozoítos para utilizarlo como molde en las reacciones de amplificación. El DNA se extrajo a partir de pastillas congeladas de trofozoítos de las clonas A (control positivo) y L-6 utilizando una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y posteriormente se hizo el corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1%.

El DNA aislado de ambas clonas mostró una sola banda de alto tamaño molecular (Fig. 4), indicando el aislamiento de DNA de buena calidad, por lo que a partir de este material se hicieron las amplificaciones por PCR.

2. AMPLIFICACIÓN DEL GEN *Ehadh112*

Para obtener el gen *Ehadh112*, que codifica para la adhesina que forma parte del complejo EhCPADH (Fig. 3), se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes al inicio (sentido) y al final (antisentido) de esta región (Tabla 1).

El corrimiento electroforético en geles de agarosa de las reacciones de amplificación, presentaron bandas con el tamaño esperado de 2061 pb en las reacciones donde se utilizó como molde el DNA obtenido de las clonas A y L-6 (Fig. 5, carriles 3 y 4), sugiriendo una secuencia similar de este gen en ambas clonas. Los productos de amplificación son específicos, ya que no se observó DNA alguno cuando en la reacción se omitió el DNA molde (Fig. 5, carril 2).

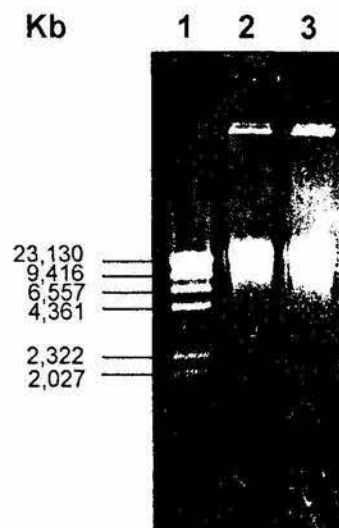


FIGURA 4. OBTENCIÓN DE DNA TOTAL DE TROFOZOÍTOS DE *E. histolytica*

El DNA aislado a partir de un lisado de trofozoítos se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1% y se tiñó con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de tamaño molecular λ / *Hind III*. Carril 2: DNA aislado de la clona A. Carril 3: DNA aislado de la clona L-6.

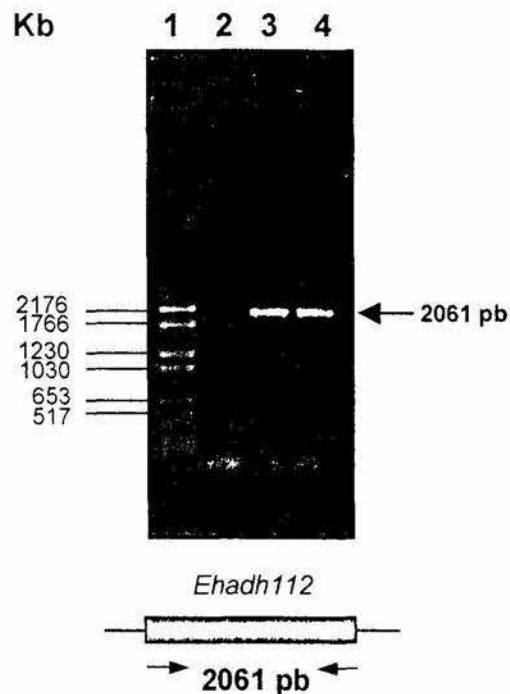


FIGURA 5. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN *Ehadh112*

Utilizando iniciadores específicos del gen *Ehadh112* y DNA amibiano como molde se realizaron ensayos de PCR. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1.2%. Carril 1: Marcador de tamaño molecular (VI). Carril 2: Control de reacción sin DNA molde. Carril 3: Fragmento amplificado utilizando como molde DNA amibiano de la clona A. Carril 4: Fragmento amplificado utilizando como molde DNA amibiano de la clona L-6.

La flecha indica el fragmento de aproximadamente 2061 pb que se obtuvo en las reacciones. En la parte inferior se muestra un esquema donde se representa la localización de los iniciadores usados en la PCR (ver tabla 1).

3. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN INTERGÉNICA ENTRE LOS GENES *Ehcp112* y *Ehadh112* DE *E. histolytica*

Para verificar si la organización de los genes *Ehcp112* y *Ehadh112* en el genoma de la clona L-6 de *E. histolytica*, es similar a la reportada por García-Rivera y col, 1999, se realizaron ensayos de PCR utilizando oligonucleótidos iniciadores presentes en ambos genes y que amplificaran la región intergénica (Fig. 6). En estos experimentos se logró la amplificación de un fragmento de aproximadamente 642 pb utilizando como molde un plásmido que contiene esta región (control positivo) (Fig. 6, carril 3). El mismo fragmento fue obtenido cuando se utilizó como molde el DNA aislado de las clonas A y L-6 (Fig. 6, carriles 4-5). El DNA amplificado corresponde al tamaño esperado según la distancia entre los dos iniciadores. Este resultado indica que la organización de los genes *Ehcp112* y *Ehadh112* en ambas clonas es similar. No se observa alguna diferencia en cuanto al tamaño del fragmento obtenido de ambas clonas (Fig. 6), aunque se puede ver una menor intensidad en el fragmento amplificado a partir del gen de la clona A (Fig. 6, carril 4). Sin embargo, no se puede sugerir diferencia en cantidad de DNA de la clona A, dado que éste no es un experimento cuantitativo. Nuevamente la reacción en ausencia del DNA molde no muestra amplificación alguna (Fig. 6, carril 2), indicando la especificidad de la reacción.

4. AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO QUE CODIFICA PARA *Ehcp112*

Para obtener el gen que codifica para la cisteína proteinasa que forma parte de EhCPADH (Fig. 3), se diseñaron oligonucleótidos iniciadores, tomando en cuenta un mínimo de treinta nucleótidos correspondientes al inicio (sentido) y al final (antisentido) de esta región (Tabla 1).

La amplificación de la región codificante para la cisteína proteinasa se realizó por medio de PCR. El producto de reacción utilizando como molde un plásmido que contiene al gen o el DNA de cualquiera de las clonas presentó el tamaño esperado de 1330 pb según la distancia entre dos iniciadores (Fig. 7, carriles 3-5), sugiriendo una secuencia similar en ambas clonas. El control negativo (sin DNA molde) no presentó amplificación (Fig.7, carril 2).

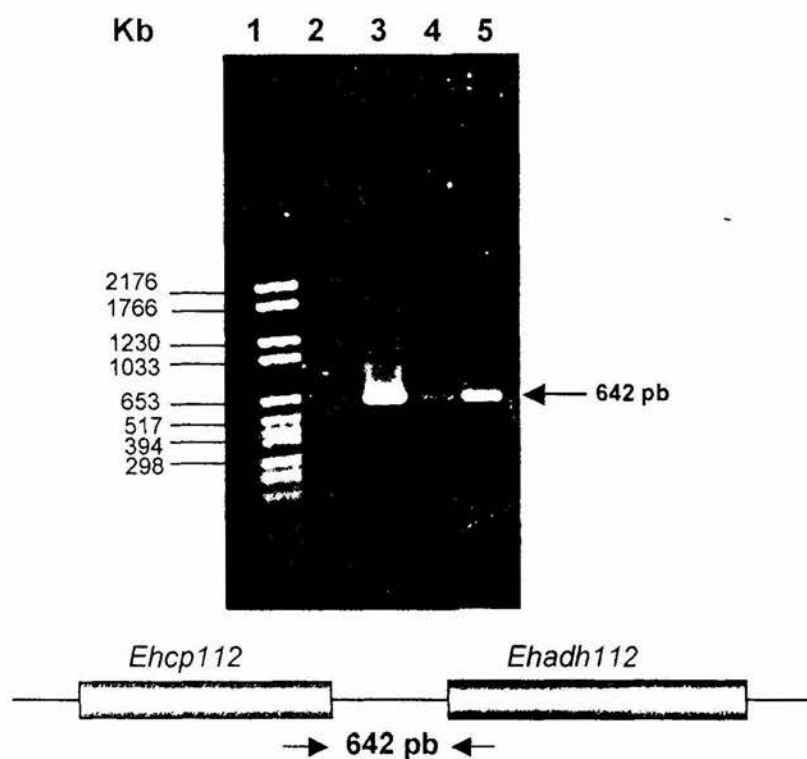


FIGURA 6. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN INTERGENICA DE LOS GENES *Ehcp112* y *Ehadh112*

Utilizando iniciadores localizados en los genes *Ehcp112* y *Ehadh112* y DNA amibiano como molde se realizó una PCR. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1.4%. Carril 1: Marcador de tamaño molecular (VI). Carril 2: Control de reacción sin DNA molde. Carril 3: Fragmento amplificado utilizando como molde DNA de un plásmido que contiene ambos genes (control positivo). Carril 4: Fragmento amplificado utilizando DNA amibiano de la clona A como molde. Carril 5: Fragmento amplificado utilizando DNA amibiano de la clona L-6 como molde. La flecha indica el fragmento de aproximadamente 642 pb que se obtuvo en las reacciones. En la parte inferior se muestra un esquema donde se representa la localización de los iniciadores usados en la PCR.

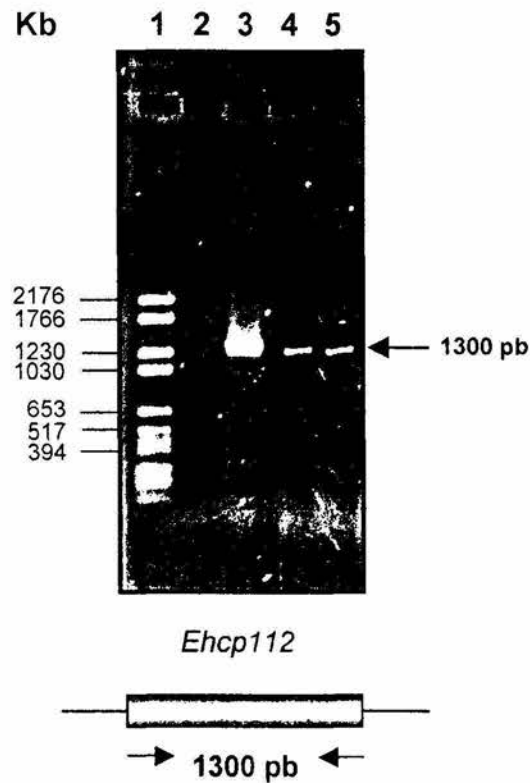


FIGURA 7. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN *Ehcp112*

Utilizando iniciadores localizados en los extremos del gen *Ehcp112* y DNA amibiano como molde se realizó una PCR. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1.2%. Carril 1: Marcador de tamaño molecular (VI). Carril 2: Control de reacción sin DNA molde. Carril 3: Fragmento amplificado utilizando como molde DNA de un plásmido que contiene al gen (control positivo). Carril 4: Fragmento amplificado utilizando DNA amibiano de la clona A como molde. Carril 5: Fragmento amplificado utilizando DNA amibiano de la clona L-6 como molde. La flecha indica el fragmento de aproximadamente 1300 pb que se obtuvo en las reacciones. En la parte inferior se muestra un esquema donde se representa la localización de los iniciadores usados en la PCR.

5. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN INTERGÉNICA ENTRE LOS GENES *Ehcp112* y *EhrabB* DE *E. histolytica*

Para comprobar si en la clona L-6 existe una organización de los genes *EhrabB* y *Ehcp112* similar a la presentada en la clona silvestre (García-Rivera y col, 1999) se realizaron ensayos de PCR utilizando oligonucleótidos iniciadores presentes en ambos genes (Tabla 1). En estos experimentos se logró amplificar el fragmento de aproximadamente 800 pb (Fig. 8, carriles 3-5), usando tanto un plásmido que contiene ambos genes como el DNA de las clonas A y L-6. El tamaño del amplificado corresponde al esperado según la distancia entre los iniciadores, indicando la misma organización genómica. La reacción fue específica dado que no se obtuvo amplificación cuando en la reacción se omitió DNA blanco (Fig. 8, carril 2).

6. AMPLIFICACIÓN DEL GEN *EhrabB*

Finalmente, para amplificar el gen *EhrabB*, se diseñaron los oligonucleótidos iniciadores, tomando en cuenta un mínimo de treinta nucleótidos correspondientes al inicio (sentido) y al final (antisentido) de esta región (Tabla 1). Nuevamente, tanto en el control positivo como en las reacciones usando como DNA blanco el DNA de las clonas A y L-6, se obtuvo el producto de la reacción con el tamaño esperado de aproximadamente 576 pb, según la distancia entre los iniciadores (Fig. 9, carriles 3-5), mientras que no se obtuvo amplificación en ausencia de DNA molde (Fig. 9, carril 2).

En conjunto estos resultados indican que los genes *Ehadh112*, *Ehcp112* y *EhrabB* de la clona L-6 presentan un tamaño y una organización similar a la de la clona silvestre, aunque no descartamos la presencia de pequeñas mutaciones en el DNA de la clona L-6.

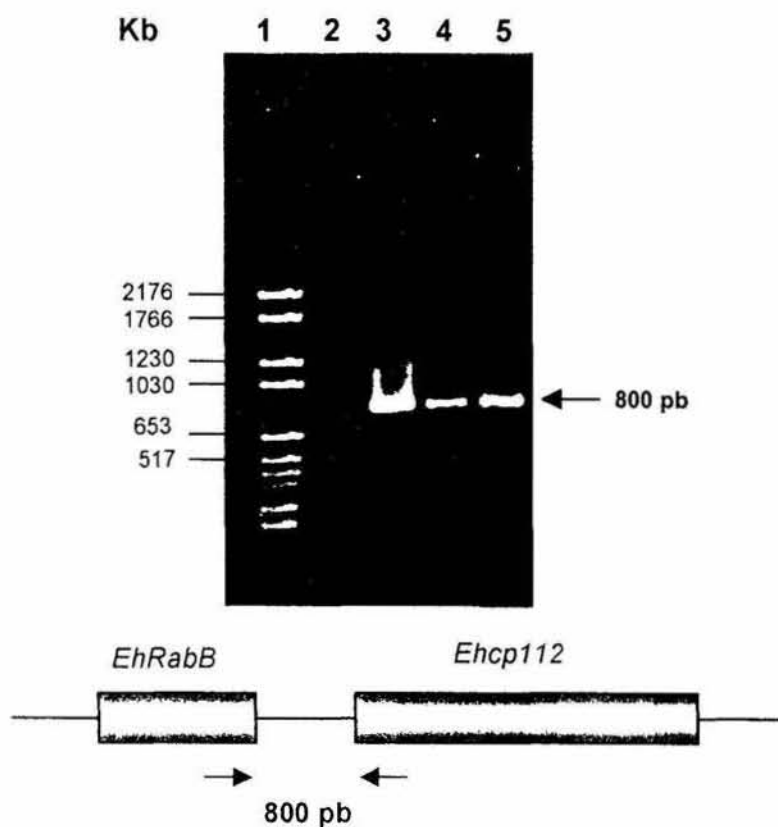


FIGURA 8. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN INTERGENICA ENTRE LOS GENES *EhrabB* y *Ehcp112*

Utilizando iniciadores localizados en los genes *EhrabB* y *Ehcp112* y DNA amibiano como molde se realizó una PCR. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1.2%. Carril 1: Marcador de tamaño molecular (VI). Carril 2: Control de reacción sin DNA molde. Carril 3: Fragmento amplificado utilizando como molde DNA de un plásmido que contiene ambos genes (control positivo). Carril 4: Fragmento amplificado utilizando DNA amibiano de la clona A como molde. Carril 5: Fragmento amplificado utilizando DNA amibiano de la clona L-6 como molde. La flecha indica el fragmento de aproximadamente 800 pb que se obtuvo en las reacciones. En la parte inferior se muestra un esquema donde se representa la localización de los iniciadores usados en la PCR.

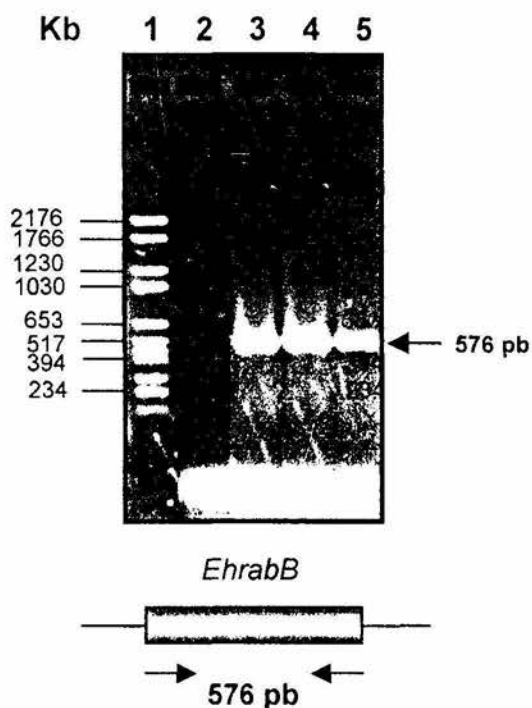


FIGURA 9. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN *EhrabB*

Utilizando iniciadores localizados en los extremos del gen *EhrabB* y DNA amibiano como molde se realizó una PCR. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1.2%. Carril 1: Marcador de tamaño molecular (VI). Carril 2: Control de reacción sin DNA molde. Carril 3: Fragmento amplificado utilizando como molde DNA de un plásmido que contiene al gen (control positivo). Carril 4: Fragmento amplificado utilizando DNA amibiano de la clona A como molde. Carril 5: Fragmento amplificado utilizando DNA amibiano de la clona L-6 como molde. La flecha indica el fragmento de aproximadamente 576 pb que se obtuvo en las reacciones. En la parte inferior se muestra un esquema donde se representa la localización de los iniciadores usados en la PCR.

7. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS EhCPADH Y EhRabB EN LA CLONA L-6

Con el fin de determinar la expresión de EhCPADH y de EhRabB en la clona L-6, deficiente en fagocitosis, se realizaron ensayos de inmunotransferencia e inmunolocalización usando anticuerpos específicos contra estas proteínas.

El patrón electroforético de las proteínas aisladas de ambas muestras fue muy similar y no se observó alguna diferencia notable en la expresión de las proteínas en estas clonas (Fig. 10). Sin embargo, en los ensayos de Western-blot, el anti-EhCPADH Mab detectó fuertemente a esta proteína en la clona A, pero muy débilmente en la clona L-6 (Fig. 11A) sugiriendo una pobre expresión del complejo en la mutante o bien que existe una mutación en el epítipo reconocido por el Mab. Para definir cual de las dos posibilidades es la responsable del pobre reconocimiento de la proteína en la clona L-6, las proteínas de ambas clonas se incubaron con anticuerpos policlonales contra EhCPADH. Estos anticuerpos también reconocieron con menor intensidad al complejo EhCPADH en la mutante (Fig. 11B), indicando que existe una menor expresión de este complejo en la clona L-6.

Por otra parte, los anticuerpos contra EhRabB detectaron dos bandas de 21 y 25 kDa en ambas clonas, pero se detectó incremento en la expresión de esta proteína en la clona L-6 (Fig. 11C). Como un control interno para determinar que los geles contenían cantidades similares de proteínas totales de ambas clonas, las mismas membranas que se utilizaron en la detección de las proteínas EhCPADH y EhRabB, se incubaron con anticuerpos contra actina. En todos los casos los anticuerpos contra actina detectaron cantidades similares de esta proteína en ambas clonas (Fig. 11 A, B, C), indicando que las diferencias encontradas con EhCPADH y EhRabB no son debidas a una diferencia en la cantidad de proteínas totales cargadas en los geles, sino a la diferencia en la expresión de esa proteína. Estos resultados indican que existen diferencias en la expresión de estas proteínas en la clona L-6 con respecto a la clona silvestre, lo que podría sugerir que la deficiencia en fagocitosis de la clona L-6 podría deberse, al menos en parte a la baja expresión de EhCPADH.

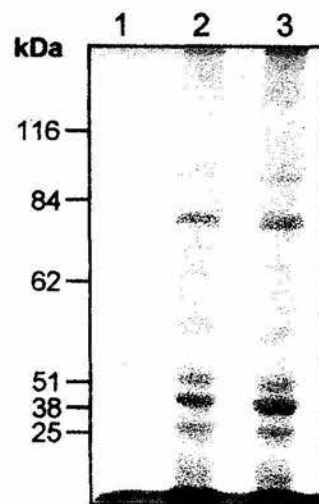


FIGURA 10. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS TOTALES DE TROFOZOÍTOS DE LA CLONA A y L-6.

Las proteínas totales de las clonas A y L-6 se separaron por SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie. Carril 1: Marcadores de peso molecular. Carril 2: Proteínas totales de la clona A. Carril 3: Proteínas totales de la clona L-6.

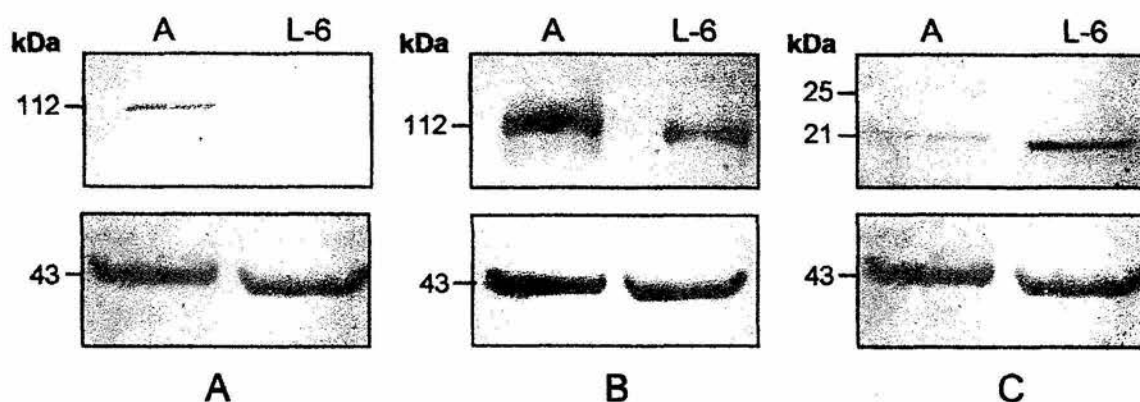


FIGURA 11. WESTERN BLOT DE PROTEÍNAS DE TROFOZOÍTOS DE LA CLONA A y L-6

Después de ser separadas por SDS-PAGE las proteínas totales de las clonas A y L-6 se transfirieron a papel de nitrocelulosa, se incubaron con anti-EhCPADH Mab (A), con anticuerpos policlonales contra el complejo EhCPADH (B), o con anticuerpos contra EhRabB (C). Como control estas mismas membranas se incubaron con anticuerpos contra actina (paneles inferiores).

IZT.



8. INMUNOLocalIZACIÓN DE EhRabB

Con el fin de localizar la proteína EhRabB en los trofozoítos de las clonas A y L-6, se realizaron experimentos de inmunolocalización y análisis por microscopía confocal. Los anticuerpos contra EhRabB detectaron a esta proteína en vesículas distribuidas en el citoplasma de los trofozoítos de ambas clonas (Fig. 12), aunque las vesículas fueron de mayor tamaño y en mayor cantidad en la clona mutante con respecto a la silvestre (Fig. 12). Este resultado corrobora los resultados de Wester-Blot, donde se detectó una mayor expresión del EhRabB en la clona L-6. La incubación de los trofozoítos solamente con el segundo anticuerpo acoplado a fluoresceína no mostró fluorescencia alguna (Fig. 12, panel C, D), indicando que la reacción es específica para la proteína EhRabB.

9. INMUNOLocalIZACIÓN DE LA PROTEÍNA EhRabB DURANTE LA ERITROFAGOCITOSIS

La presencia de la proteína EhRabB en vesículas citoplásmicas de trofozoítos amibianos fue evidenciada por anticuerpos específicos contra un péptido situado en el extremo carboxilo terminal de EhRabB (Rodríguez y col, 2000). En estos ensayos se encontró que esas vesículas se traslocan a bocas fagocíticas, cuando los trofozoítos se incuban con eritrocitos, sugiriendo que EhRabB participa en uno de los primeros pasos de la fagocitosis (Rodríguez y col, 2000). Para ver la funcionalidad de EhRabB en la clona L-6 deficiente en fagocitosis, realizamos ensayos de inmunolocalización durante diferentes tiempos de fagocitosis. Se encontró que además del tamaño, también hay diferencia en la traslocación de las vesículas hacia la membrana plasmática. Mientras que en la clona A a los 2 min de interacción las vesículas que contienen EhRabB se transportan a la membrana plasmática a los 10 min se localizan primeramente en bocas fagocíticas. En la mayoría de los trofozoítos de la clona L-6 a los mismos tiempos, estas vesículas se encuentran distribuidas en el citoplasma de la misma manera que en los trofozoítos sin interacción (Fig. 12 y 13). Esto indica que la función de la proteína EhRabB está alterada en esta clona, confirmando la hipótesis de que EhRabB juega un papel importante en la fagocitosis.

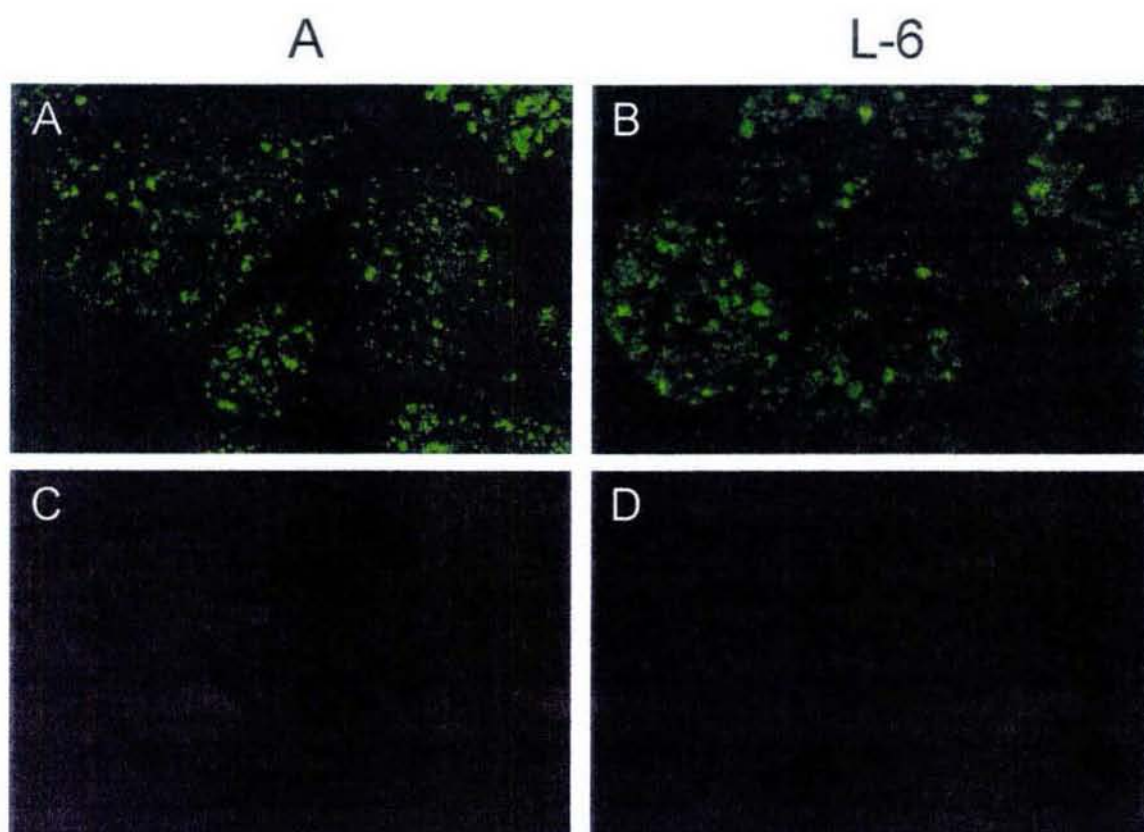


FIGURA 12. INMUNOLocalIZACIÓN DE LA PROTEÍNA EhRabB

Los trofozoítos de las clonas A y L-6 fueron crecidos en cubreobjetos estériles, fijados y permeabilizados. Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo contra el péptido EhRabB y con un segundo anticuerpo acoplado a fluoresceína. **(A)** Trofozoítos de la clona A. **(B)** Trofozoítos de la clona L-6. Como control negativo los trofozoítos fueron incubados solamente con el anticuerpo acoplado a fluoresceína **(C, D)**.

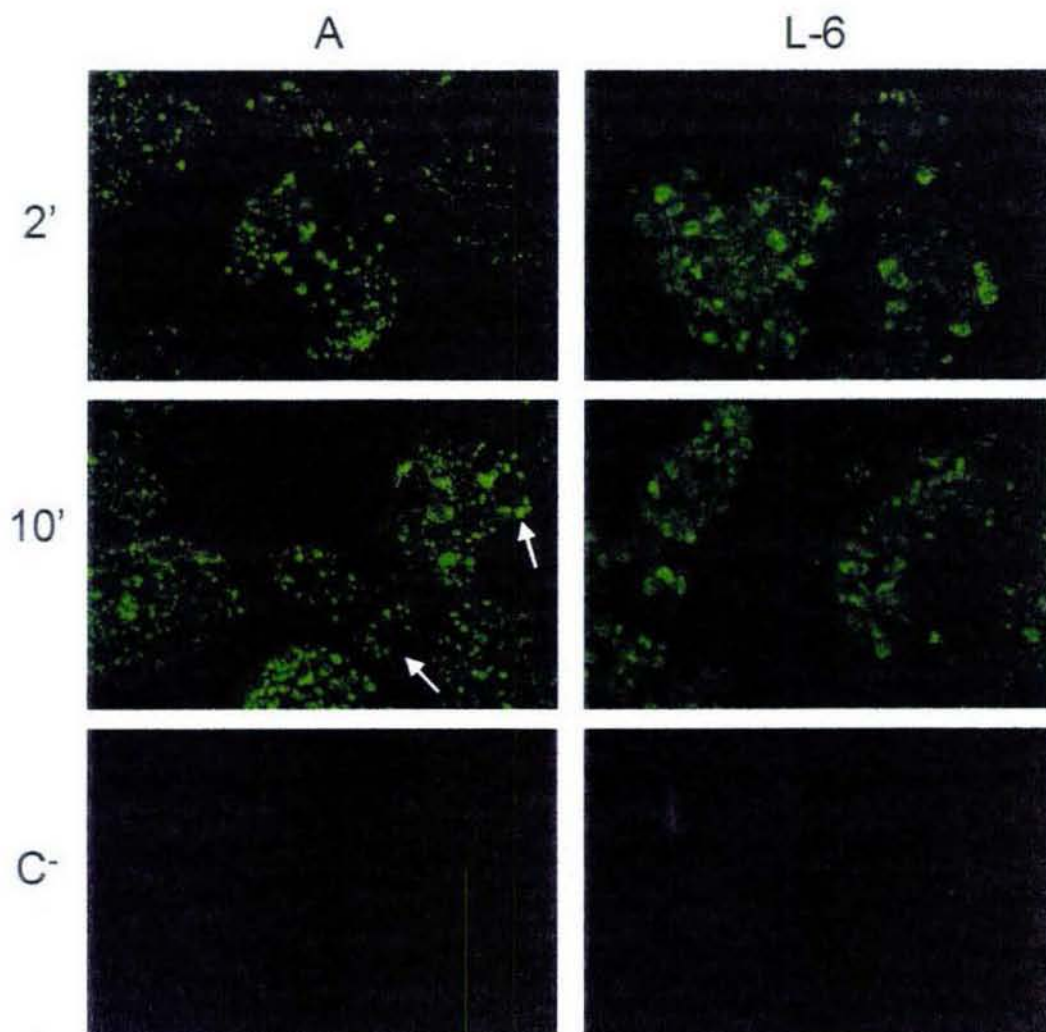


FIGURA 13. INMUNOLocalIZACIÓN DE LA PROTEÍNA EhRabB DURANTE LA ERITROFAGOCITOSIS

Los trofozoítos de las clonas A y L-6 fueron crecidos en cubreobjetos estériles y posteriormente se hizo la interacción amiba-eritrocito durante 2 y 10 min. Estas muestras fueron fijadas y permeabilizadas. Posteriormente se analizaron por microscopía confocal. Como control negativo los trofozoítos fueron incubados solamente con el anticuerpo acoplado a fluoresceína (C⁻). Las flechas indican a la proteína EhRabB en bocas fagocíticas.

VIII. DISCUSIÓN

La identificación de moléculas de *E. histolytica* que intervienen directamente en la relación huésped-parásito es el posible control de la amibiasis. Varios resultados sugieren que el contacto inicial entre el trofozoíto y la célula blanco es mediado por interacciones moleculares específicas, y que la adhesión es necesaria para que ocurra la lisis celular y la fagocitosis (Ravdin y col, 1985; Cano-Mancera y López-Revilla, 1987; Arroyo y Orozco, 1987). Una proteína que originalmente se reportó con un peso molecular de 112 kDa y que es reconocida por sueros de pacientes con absceso hepático amibiano, es una de las moléculas identificadas en este parásito con una función celular de adhesina (Arroyo y Orozco, 1987; Rodríguez y col, 1989). García-Rivera y col, (1999) reportaron que esta proteína es un complejo (EhCPADH) formado por dos polipéptidos uno de 49 kDa y otro de 75 kDa, que son codificados por genes adyacentes, el polipéptido de 49 kDa es una cisteína proteinasa (EhCP112) y el de 75 kDa es una adhesina (EhADH112) (Fig. 3), este último tiene un dominio que involucra la adherencia del trofozoíto a la célula blanco. El peso molecular del complejo (EhCPADH) ha sido estimado de 109-124 kDa, dependiendo si el polipéptido EhCP112 ha sido o no procesado (García-Rivera y col, 1999).

Al investigar los mecanismos de control de la expresión de estos genes que constituyen a este complejo, se decidió conocer las secuencias localizadas río arriba de su sitio de inicio de la traducción y a 332 pb río arriba del gen *Ehcp112*, pero en la cadena de DNA complementaria se localizó al gen *EhrabB*, el cual codifica para una proteína de 192 aa (EhRabB) con una identidad de 40-42 % a proteínas de la familia Rab (Rodríguez y col, 2000) (Fig. 3). La organización de los genes *Ehadh112*, *Ehcp112* y *EhrabB* sugiere que puede existir una regulación coordinada en la expresión de estos genes y que la función de las proteínas puede estar relacionada.

Se ha sugerido que tanto el complejo EhCPADH como la proteína EhRabB, participan en el proceso de fagocitosis (García-Rivera y col, 1999; Rodríguez y col, 2000), el cual a su vez es un evento del mecanismo patogénico de este parásito (Ravdin y col, 1980; Orozco y col, 1982). Sin embargo, se necesitan más estudios para poder confirmar su participación en la fagocitosis y el momento de su intervención en este evento.

Una manera de confirmar la participación de una molécula en un proceso dado, es la utilización de mutantes afectadas en dicho proceso, donde la molécula en estudio debe estar alterada o ausente. En el laboratorio se cuenta con la clona L-6, una mutante de *E. histolytica* deficiente en fagocitosis, lo que la convierte en una valiosa herramienta biológica para estudiar el papel del complejo EhCPADH y de la proteína EhRabB en la fagocitosis, por lo que en este trabajo se propuso analizar la organización de los genes *Ehcp112*, *Ehadh112*, *EhrabB*, y sus regiones intergénicas, así como la expresión y localización subcelular de las proteínas del complejo EhCPADH y EhRabB.

Para poder analizar la organización de los genes *Ehcp112*, *Ehadh112* y *EhrabB* en el genoma de la clona mutante (L-6) de *E. histolytica*, se realizaron amplificaciones mediante PCR, utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos (ver Tabla 1). En todos los casos se logró la amplificación de los fragmentos esperados a partir de el DNA de la clona L-6, indicando que existe una organización similar de estos genes en la clona mutante con respecto a la silvestre (Fig.5-9). Aunque en algunos casos notamos diferencias en la cantidad del fragmento amplificado, pero no se puede afirmar que existe tal diferencia en los trofozoítos dado que estos experimentos no fueron cuantitativos. Por otra parte no podemos descartar que los genes de la clona L-6 presenten pequeñas mutaciones que alteren la expresión de los genes *Ehcp112* y/o *Ehadh112*, la secuenciación y análisis de estos, nos permitiría determinar la presencia de dichas mutaciones y su papel en la expresión de los genes.

Con el fin de determinar la expresión de EhCPADH y de EhRabB en la clona L-6 deficiente en fagocitosis, se realizaron ensayos de Western-Blot utilizando anticuerpos específicos contra estas proteínas. En estos experimentos los anticuerpos monoclonales y policlonales contra EhCPADH detectaron a esta proteína en la clona A de acuerdo a lo descrito por García-Rivera y col, (1999). Sin embargo, los anticuerpos detectaron débilmente al complejo en la clona L-6 (Fig. 11). Esto podría sugerir que en la mutante existe una deficiencia en la expresión del complejo que puede darse a diferentes niveles desde el inicio de la transcripción hasta la estabilidad de la proteína. La secuencia de los genes y las regiones intergénicas en esta mutante podría ayudar a determinar si su deficiente expresión se debe a alteraciones a nivel de la transcripción.

Se ha reportado que el complejo EhCPADH participa en la adhesión de los trofozoítos a la célula blanco (Arroyo y col, 1987; Rodríguez col, 1989; García-Rivera y col, 1999). La mutante L-6 expresa a bajos niveles esta proteína (Fig. 11A, 11B). Sin embargo experimentos de adhesión determinaron que la clona L-6 adhiere eritrocitos tan eficientemente como la clona silvestre (Orozco y col, 1983).

Esto podría sugerir que la adhesión de la mutante a la célula blanco se realiza mediante la utilización de otras adhesinas, como las previamente reportadas (Petri y col, 1987; Rosales-Encina y col, 1987; Rodríguez y col, 1989; Stanley y col, 1990) y que el complejo EhCPADH, aunque también participa en adhesión, actúa principalmente en eventos posteriores a ella, como en la fagocitosis de la célula blanco. Por otra parte, anticuerpos específicos contra EhRabB detectaron un par de bandas de 25 y de 21 kDa sobre proteínas totales de *E. histolytica* de ambas clonas (Fig. 11C), en donde la banda de 21 kDa podría corresponder a la proteína EhRabB sin modificaciones y la de 25 kDa podría corresponder a la proteína EhRabB modificada con el grupo geranil-geranilo necesario para su asociación con las membranas de las vesículas de transporte. Sin embargo, por experimentos de Western-blot se detectó una mayor expresión de la proteína EhRabB en la clona L-6. Dada la organización de los genes en

estudio, podría sugerir que en la clona L-6 existe alteración en la región intergénica entre los genes *EhrabB* y *Ehcp112* ó en los factores transcripcionales que regulan la expresión de estos genes, que ocasiona una mayor expresión de EhRabB y una menor expresión del complejo EhCPADH. Sin embargo, es necesario realizar la secuenciación de esta región en la clona mutante, así como ensayos funcionales del promotor para confirmar esta hipótesis.

Por otro lado, por medio de ensayos de inmunolocalización y análisis por microscopia confocal, en trofozoítos permeabilizados, y con anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína EhRabB, se observó que esta proteína se localiza en menor número de vesículas, pero de un mayor tamaño en la clona mutante, ya que estas pueden medir alrededor de $3\mu\text{m}$, en comparación con la clona A en donde miden hasta $1.5\mu\text{m}$ (Fig. 12), Además, la inmunodetección de EhRabB en trofozoítos que están en contacto con RBCs, muestran que la traslocación de estas vesículas a la membrana plasmática y a bocas fagocíticas es más lenta en la clona mutante con respecto a la silvestre (Fig.13). Estos resultados indican que, si bien la proteína EhRabB en la clona L-6 no esta alterada en su expresión, se presenta una deficiencia en su función, soportando la idea que EhRabB participa en la fagocitosis. La alteración en su función puede estar dada por mutaciones que alteren dominios importantes para su función, lo cual se determinaría por la secuencia del gen de la clona mutante. Otra posibilidad es que la clona L-6 presente alteraciones en alguna(s) proteína(s) que interacciona(n) con EhRabB para regular su función, como las proteínas efectoras, las cuales no han sido aun identificadas.

IX. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, tenemos las siguientes conclusiones:

- La organización y el tamaño de los genes *Ehcp112*, *Ehadh112* y *EhrabB* son similares en las clonas silvestre y mutante, aunque se descartan pequeñas mutaciones que afecten su expresión y/o función.
- Los patrones electroforéticos de las proteínas de las clonas silvestre y mutante no presentan alguna diferencia notable.
- El complejo EhCPADH se expresa pobremente en la clona L-6.
- Existe un incremento en la expresión de la proteína EhRabB en la clona L-6 con respecto a la clona A.
- La proteína EhRabB se localizó en la mutante en mayor cantidad de vesículas más grandes que las correspondientes en la clona silvestre.
- En la localización de la proteína EhRabB en la mutante durante la eritrofagocitosis, se observa una diferencia notable en el tiempo de traslocación de las vesículas a la membrana plasmática.
- La deficiencia en fagocitosis de la clona L-6 se debe, al menos en parte, a la baja expresión del complejo EhCPADH y a la baja velocidad de traslocación de las vesículas que contienen EhRabB a la membrana plasmática y a bocas fagocíticas.

X. REFERENCIAS

- ↻ Armstrong, J. (1999). Review. How do Ra Proteins function in membrane traffic? *Int J. Bioch & Cell Biol*, **32**, 303-307.
- ↻ Arroyo, R., and Orozco, E. (1987). Localization and Identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol. Biochem. Parasitol.* **23**: 151-158.
- ↻ Ayala, B.P. (1989). Aislamiento de genes de *Entamoeba histolytica* que participan en su antigenicidad o virulencia. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Molecular). Centro de Investigación y Estudios Avanzados-IPN. México, D.F.
- ↻ Bailey, G.B. (1982). Preliminary studies of chemotaxis by *Entamoeba histolytica*. *Arch. Inv. Med. (Méx)*. **13** (supl. 3): 265-271.
- ↻ Bailey, G.B., Day, D.B., Gasque, G.W. (1985). Rapid polimerization of *E. histolytica* actin induced by interaction with target cells. *J. Exp. Med.* **162**, 546-58.
- ↻ Bean, A. J., Seifert, R., Chen, Y.A., Sacks, R., Scheller, R.H. (1997). Hrs-2 is an ATPase implicated in calcium-regulated secretion. *Nature*, **835**, 826-829.
- ↻ 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.
- ↻ 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.
- ↻ Carroll, K.S., Hanna, J, Simon, I., Krise, J., Barbero, P., Pfeferr, S. R. (2001). Role of Rab 9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Scie.* **292**, 1373-1375.
- ↻ Chapman-Andersen, C. (1977). Endocytosis in freshwater amebas. *Physiol. Rev.* **57**: 371-385.

- ⇨ Diamond, L.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.
- ⇨ Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapère, J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I. And Goud, B. (1998). Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science*, **279**, 580-585.
- ⇨ Fonte, G., L. (2000). Amebiasis: enfoques actuales sobre su diagnóstico tratamiento y control. (ed.) Elfos. La Habana. Cuba. Pp. 26-39.
- ⇨ Freachem, R.G., Braddeley, D.J., Garelick, H. y Mara, D. (1983). Sanitation and disease. Health aspects of excreta and wastewater management. Chichester: Wiley/World Bank. 337.
- ⇨ García-Rivera, G., Sánchez, T., Orozco, E. Y Guameros, G. (1982). Aislamiento de clones de *E. histolytica* deficientes en adhesión a eritrocitos humanos. *Arch. Inv. Méd. (Méx.)* **13** (Supl. 3): 129-136.
- ⇨ García-rivera, G., Rigother, M. C., and E, Orozco. (1994). The 112 kDa adhesin of *Entamoeba histolytica* presents proteolytic activity and participates in phagocytosis. (En prensa).
- ⇨ García-Rivera, G., Avila, A., Ayala, P., Arroyo, R., Rigother, M.C., and Orozco, E. (1997^a). Identification and localization of the cell-binding domain in the 112 kDa adhesin gene of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* **28**: 164-165.
- ⇨ García-Rivera, G., Arroyo, R., Mena, R., Luna, J., and Orozco, E. (1997^b). Involvement of the 112 kDa Adhesin in *Entamoeba histolytica* phagocytosis. *Arch. Med. Res.* **28**: 166-167.
- ⇨ 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.
- ⇨ Gardner, E.J. (1991). Principios de Genética. Ed. Limusa. México, D.F; capítulo 2, 8.

- ⇒ Gavallas, A. and Zalkin, H. (1995). Analisis of the chicken GPAT:AIRC bidirectional promoter for the novo purine nucleotide síntesis, *J. Biol. Chem.* **270**: 2403-2410.
- ⇒ Gerts, J.E. (1999). SNARE's and SNARE regulators in membrane fusion and exocytosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 707-734.
- ⇒ Ghosh, S. K., Field, J., Frisardi, M. Rosenthal, B., Mai, Z., Rogers, R. and Samuelson, J. (1999). Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and trasfected *Entamoeba histolytica*: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Infect. Immun.* **67** (6), 3073-3081.
- ⇒ González, L., Scheller, R. (1999). Regulation of Membrane Trafficking: Structural Insights from a Rab/Effector complex. *Cell.* **96**: 756-758.
- ⇒ Hay, J.C., and Scheller, R.H. (1997). SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**, 505-512.
- ⇒ Hidalgo, M. E. (1989). Secreción de enzimas proteolíticas y virulencia de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Maestría en ciencias (Biología Molecular). Centro de Investigación y Estudios Avanzados-IPN. (CINVESTAV-IPN). México, D.F.
- ⇒ Juárez, P., Sánchez-López, R., Stock, R., Olvera, A., Ramos, M., Alagón, A. (2001). Characterization of the *Ehrab8* gene, a marker of the late stages of the secretory pathway of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **116**: 223-228.
- ⇒ Keene, W.E., Hidalgo, M.E., Orozco, E., and Mckerrow, J.H. (1990). *Entamoeba histolytica*: Correlation of the cytophatic effect of virulent trofozoites with secretion of a cysteine protease. *Exp. Parasitology.* **71**: 199-206.
- ⇒ Kobilier, D., and D. Mirelman. (1980). Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* **29**, 221-225.
- ⇒ Kretschmer, R. y col. (1994). Amibiasis: Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*, ed. Trillas, México.
- ⇒ 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.
- ↻ Martínez, P.J. (1985). *Introducción a la protozoología*. Trillas. México, D.F. pp 86-89.
- ↻ Martínez-Palomo, A. (1982). *The biology of Entamoeba histolytica*. Research Studies Press. John Wiley y 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.
- ↻ Mazzuco, A., Benchimol, M., and De Souza, W. (1997). Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*. *Micron*. **28**: 241-247.
- ↻ McLaughlin, J. and Aley, S. (1985). The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. *J. Protozool.* **32**: 221-240.
- ↻ Noble, E.R; and Noble, G.A. (1976). *The biology of animal parasites*. Lea & Febiger (ed.) Piladelphia. P.60.
- ↻ Novick, P., Field, C., and Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-transcriptional 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. Edo. De México.
- ↻ 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., Martínez-Palomo, A., González-Robles, A. (1982). Las interacciones lectina-receptor median la adhesión de *Entamoeba histolytica* a células epiteliales. *Arch. Inv. Med. (Méx)*. **13**, (Suppl. 3): 153-57.
- ⇒ 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., Suárez, M.E., Sánchez, T. (1985). Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones form *Entamoeba histolytica*, satín HM1:IMSS. *Int. J. Parasitol.* **15**: 655-60.
- ⇒ Orozco, E., Rodríguez, M.A., Murphy, C. F., Salata, R. A., Petri, W. A., Smith, R. D. Ravdin, J. I. (1987). *Entamoeba histolytica*: cytopathogenicity and lectin activity of a virulent mutants. *Exp. Parasitol.* **63**: 157-65.
- ⇒ 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.* **154**, 250-257.
- ⇒ Pérez-Tamayo, R. (1986). Pathology of amebiasis. In: Amebiasis. A. Martínez-Palomo (ed.) Amsterdam Elsevier Biomedical. Pp 54-94.
- ⇒ Petri, W. A. Jr., and Ravdin, J. I. (1987). Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: the role of amebic adherence and contact-dependent cytolysis in patogenesis. *Eur. J. Epidemiol.* **3**(2): 123-136.
- ⇒ Rabinovitch, M. (1995). Professional and no professional phagocytes: and introduction. *Trends Cell Biol.* **5**, 85.
- ⇒ 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 mamalian tissue culture and human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* **68**, 1305-1313.
- ⇒ Ravdin, J. I., Murphy, C.F., Salata, R. A., Guerrant, R.L., and Hewlwt, E.L. (1985^a). 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. (1986). Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*. Studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytotoxicity. *Rev. Infect. Dis.* **8**, 247-260.
- ⇨ Ravdin, J. (1988). Amebiasis human infection by *Entamoeba histolytica*. Wiley Medical. Canadá, E.U.
- ⇨ Rigother, M.C., García-Rivera, G., Guaderrama, M., and E, Orozco. (1992). Purification and functional characterization of the 112 kDa adhesin of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res. (Méx.)*. **23**: 239-241.
- ⇨ Rodríguez, M.A., Orozco, E. (1986). Isolation and characterization of phagocytosis and virulence-deficient mutants of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **157**: 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-Reyez, I., Mendoza, L., Ortiz-Navarrete, V., and Orozco, E. (2000). An *Entamoeba histolytica* Rab-like encoding gene end protein: function and cellular location. *Mol. Biochem. Parasitol.* **108**, 199-206.
- ⇨ Rodríguez, M. A., Orozco, E. (2000). Characterization of the *EhRabB* Recombinant Protein of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* **31**: 171-172.
- ⇨ 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.
- ⇨ Saito-Nakano, Y., Nakazawa, M., Shigueta, Y., Takeuchi, T., Nozaki, T. (2001). Identification and characterization of genes encoding novel Rab proteins from *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **116**: 219-222.
- ⇨ 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.

- ⇒ Schmid, S.L. (1993). Biochemical requirements for the formation of clathrin-and COP-coated transport vesicles. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **5**, 621-627.
- ⇒ 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. *Bacterio.* **41**:475.
- ⇒ Stanley, S.L., Becker, A., Kunz-Jenkins, C., Foster, L., and Ellen Li. (1990). Cloning and expresion of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 4976-4980.
- ⇒ Stryer, L. (1995). *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company. New York. U. S. A. 4th edition.
- ⇒ Tannich, E., Nickel, R., Buss, H., and Herstmann, R.D. (1992). Mapping and partial sequencing of the genes coding for two different cysteine proteinases in pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **54**: 109-112.
- ⇒ 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.
- ⇒ 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., Martinez-Palomo. A., Argüello, C., *et al.* (1977). Surface properties related to concavalin 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.
- ⚡ Vitale, G; Rybin, V; Christoforidid, S; Thornqvist, P; McCaffrey, M; stenmark, H; and Zerial, M. (1998). *EMBO J.* **17**, 1941-1951.
- ⚡ Voet, D; Voet, J. G. (1992). *Bioquímica*. Ed. Omega. Barcelona. Capítulo 27.
- ⚡ WHO. (1997). Amebiasis. *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.

XI. APÉNDICE

MEDIO TYI-S33

- 30 g Biosate
- 9 g Glucosa
- 2 g NaCl
- 0.6 g KH_2PO_4
- 1.36 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- 1.25 g 1-Cisteína
- 0.25 g Ácido ascórbico
- aforar a 870 ml
- ajustar pH 6.8
- 2% de suero bovino con 1.2 U/ml de penicilina y 1.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina

PBS pH 7.4

- 5 ml Na_2HPO_4 1M
- 5 ml NaH_2PO_4 1M
- 30.8 ml NaCl 5M

TAE 10X

- 24.2 g Tris base
- 5.71 ml Ácido acético glacial
- 4 ml EDTA 0.5 M pH 8.0
- aforar a 500 ml

PBS 0.05%-TWEEN 20 pH 7.4

- 8 g NaCl
- 0.2 g KH_2PO_4
- 2.9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 0.2 g KCl
- 0.5 ml Tween20

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 Na_2HPO_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

BUFFER DE CARGA (DNA)

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

AZUL DE COOMASSIE

- Disolver 0.25 g de Azul brillante de Coomassie R-250 en:
- 90 ml de metanol:H₂O (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
- H₂O para 100 ml

BUFFER DE CORRIDA PARA GELES DE POLIACRILAMIDA 10X

- 30.2 g Tris-base
- 144 g Glicina
- 10 g SDS
- aforar a 1000 ml
- ajustar pH 8.3

BUFFER DE TRANSFERENCIA 10X

- 5.8 g Tris-base
- 2.9 g Glicina
- 0.37 g SDS
- 200 ml Metanol
- aforar a 1000 ml

4-Cl-1-NAFTOL (3 mg/ml)

- 300 mg 4-Cl-1-naftol
- 100 ml metanol
- cubrir de la luz
- guardar a 4°C