



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS Y  
MOLECULARES DE CANALES IÓNICOS *EN*  
*Entamoeba histolytica*

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**B I O L O G A**  
P R E S E N T A  
ROMMY MARLENE MORALES CARREÑO

DIRECTOR DE BALDERAS TESIS: DR. ARTURO PONCE

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO

2003





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.

## DEDICATORIA

*A Dios:*

*Porque me concedió el privilegio de la vida para poder cumplir todos mis sueños y aún alcanzar lo que parecía era inalcanzable.*

*A mis Padres:*

*Agustín y Octavia porque siempre han confiado en mi, por su amor y apoyo incondicional y por ser unos luchadores incansables, dignos de ser admirados. Siempre estaré agradecida con ustedes.*

*A mis hermanos:*

*Nancy, Abigail y Aldo porque hemos pasado tiempos muy agradables juntos que han marcado nuestras vidas.*

*A mi mejor amigo:*

*David porque eres muy especial para mi, por tu cariño y porque siempre has estado conmigo para apoyarme.*

*.....y esto va por todos ustedes*

*iiiiiiiiiiiiiiii Los quiero mucho!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!*

## **AGRADECIMIENTOS**

Le doy gracias a mi director de tesis: Dr. Arturo Ponce Balderas por aceptar dirigir este trabajo, por sus consejos y disposición.

Agradezco a mis revisores de tesis: Berta Segura, M<sup>a</sup> Eugenia Heres, Ignacio Peñalosa y Ricardo Mejía por su tiempo en la revisión de este trabajo y por sus críticas que sin duda alguna sirvieron para enriquecerlo.

A mis amigos de la F.E.S. Iztacala: Bárbara, José Ángel, Luis y Aarón por hacerme sonreír y por pasar conmigo momentos muy agradables.

A mis maestros de la carrera: M<sup>a</sup> Eugenia Heres, Edith, Víctor Ramón y Diego Arenas por ser excelentes en su trabajo.

# CONTENIDO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
Biología de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	10
Clasificación taxonómica.....	11
Ciclo de vida.....	13
Canales Iónicos.....	16
Componentes funcionales básicos.....	19
Diversidad Molecular.....	21
Conceptos electrofisiológicos para el estudio de los canales iónicos .....	25
Inducción de la expresión de corrientes iónicas en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> inyectados con RNAm.....	29
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>33</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>37</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>39</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>41</b>
Cultivo celular.....	41

Obtención de RNA total de <i>E. histolytica</i> por el método de un solo paso (Chomczynski y Sacchi, 1987).....	42
Purificación de RNA mensajero (poli A <sup>+</sup> ).....	43
Obtención y manejo de los ovocitos.....	44
Inyección de RNAm. ....	45
Registro de corrientes iónicas en ovocitos.....	47
Búsqueda “en línea” de secuencias genómicas de DNA similares a canales iónicos.....	48
Síntesis de cDNA.....	49
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	49
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
Expresión de corrientes iónicas en ovocitos tras la inyección de RNAm de <i>E. histolytica</i> .....	51
Búsqueda “en línea” de secuencias genómicas de <i>E. histolytica</i> similares a canales de potasio.....	61
Diseño de “primers”.....	64
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>66</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>72</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>73</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1 Imagen de trofozoitos en cultivo de *E. histolytica*
- Fig. 2 Representación de los estadios: quíste y trofozoito de *E. histolytica*
- Fig. 3 Esquema que muestra el ciclo de vida de *E. histolytica*
- Fig. 4 Representación de la técnica de “patch clamp” y las corrientes registradas
- Fig. 5 Componentes funcionales de los canales iónicos
- Fig. 6 Topología de una subunidad de canal de potasio dependiente del voltaje
- Fig. 7 Topología de un canal de sodio dependiente del voltaje
- Fig. 8 Representación de la técnica de fijación del voltaje
- Fig. 9 Esquema que muestra la técnica de expresión heteróloga de corrientes iónicas
- Fig. 10. Esquema que representa las condiciones de corrida de PCR
- Fig. 11 Registro de la expresión de corrientes iónicas en ovocitos
- Fig. 12 Efecto de la sustitución del Cl<sup>-</sup> en el medio extracelular por un anión impermeable
- Fig. 13 Efecto del TEA sobre las corrientes expresadas
- Fig. 14 Efecto del 4-AP sobre las corrientes iónicas
- Fig. 15 Estudio de la selectividad de las corrientes inducidas por la inyección del RNAm
- Fig. 16 Gel que muestra la sonda obtenida por PCR
- Fig. 17 Gel que muestra el análisis de restricción enzimática del fragmento de PCR

## LISTA DE TABLAS

Tabla I. Clasificación taxonómica de *E. histolytica*

Tabla II. Nomenclatura de los aminoácidos



## RESUMEN

*Entamoeba histolytica* es un protozoo parásito cuyo estudio es de gran interés desde el punto de vista de salud pública, pues es causa importante de altos índices de morbilidad y mortalidad, particularmente en los países del tercer mundo. No obstante, se conoce muy poco de su fisiología celular y molecular y en particular, no se sabe qué tipos de canales iónicos presenta, ni la función desempeñan en la fisiología del organismo.

En este trabajo recurrimos a la estrategia de expresión de corrientes iónicas en ovocitos de rana, para saber si la inyección de RNAm de *E. histolytica* en ovocitos *Xenopus laevis*, induce la expresión de corrientes iónicas distintas de las endógenas; y si este es el caso, determinar las propiedades de dichas corrientes. Hemos encontrado que la inyección de RNAm de *E. histolytica* induce la expresión de corrientes iónicas distintas a las endógenas. Dichas corrientes parecen ser catiónicas no selectivas, aunque existe una proporción que muestran sensibilidad a bloqueadores de canales de  $K^+$ , lo cual nos hace pensar que existe en la expresión una mezcla de diferentes tipos de canales iónicos, entre los que predominan los de tipo catiónico no selectivo. En este trabajo también se exploró la posibilidad de que *E. histolytica* posea canales de  $K^+$  dependientes del voltaje con criterios de biología molecular. Basados en la comparación de secuencias de aminoácidos de estas proteínas con otras

especies se diseñaron “primers<sup>1</sup>”. Usando la técnica de RT-PCR<sup>2</sup>, encontramos una secuencia que podría codificar canales de K<sup>+</sup> dependientes del voltaje.

---

<sup>1</sup>Primer: Secuencia de nucleótidos diseñada de manera que se complemente con una región específica de DNA. A partir de esta secuencia, la enzima DNA polimerasa inicia la construcción de una cadena de DNA complementaria al templado de DNA (Alberts *et al*, 2002).

<sup>2</sup> PCR: Por sus siglas en inglés Polimerase Chain Reaction. Reacción en cadena de polimerasa. Técnica que permite amplificar entre miles y millones de veces un fragmento de DNA a partir de un templado o matriz original por medio de ciclos consecutivos de temperaturas para permitir la actuación de la enzima DNA polimerasa (Alberts *et al*, 2002).

## INTRODUCCIÓN

### Biología de *Entamoeba histolytica*

*Entamoeba histolytica* es un parásito que posee gran importancia en problemas de salud a nivel mundial pues es el agente causal de la amibiasis; principalmente en países en vías de desarrollo, donde la mayor incidencia ocurre en comunidades de bajos recursos y con una mala higiene ambiental. En nuestro país se estima que 20% de la población total, es portadora asintomática, 2% padece la enfermedad y entre 0.1% y 0.2%, muere a causa de ésta (Conde-Bonfil y de la Mora, 1992). *E. histolytica* puede vivir como comensal en el intestino grueso, causando infecciones generalmente asintomáticas. Sin embargo bajo determinadas condiciones, que aún no se conocen, en el estadio de trofozoito llega a colonizar la mucosa intestinal causando disentería amibiana. Este parásito eventualmente llega a destruir los tejidos del cuerpo humano; desde los recubrimientos epiteliales y los órganos sólidos, hasta tejidos como el cartílago y el hueso (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000). Este comportamiento se puede explicar gracias a que *E. histolytica* es un anaerobio facultativo; ventaja que le permite cambiar de un medio donde la presión de oxígeno es baja (lumen intestinal) a un ambiente en donde la concentración de oxígeno es mayor (órganos sólidos), gracias al abundante flujo sanguíneo. Al mismo tiempo, este parásito evade exitosamente los mecanismos moleculares y celulares de defensa del hospedero humano y encuentra las condiciones necesarias para su multiplicación. Los trofozoitos

tienen capacidad invasora, sin embargo no logran sobrevivir fuera del organismo humano, por lo que no tienen la capacidad de transmitir la enfermedad ( Figura 1).



Figura 1. Imagen de microscopía de barrido que muestra trofozoitos de *E. histolytica* en cultivo. Imagen tomada de Martínez-Palomo, 1989

## Clasificación taxonómica

Gracias a estudios filogenéticos y a la comparación de secuencias codificables de la subunidad pequeña de RNA ribosomal, se ha determinado que *E. histolytica*, miembro del grupo de los protozoarios, es probablemente una de las formas animales más primitivas que existen (Corliss, 1984) .

*E. histolytica*, a diferencia de los eucariontes superiores, presenta una organización citoplasmática relativamente sencilla: no posee citoesqueleto estructurado, ni tampoco un sistema membranal equivalente al complejo de

Golgi y al retículo endoplásmico eucariótico, no hay presencia de mitocondrias, además de que carece de un sistema de lisosomas primarios y secundarios (González-Robles y Martínez-Palomo, 1982). Respecto a su organización nucleolar se tiene muy poco conocimiento; en teoría, los trofozoitos poseen un sólo núcleo, sin embargo, suelen encontrarse amibas con más de un núcleo. Estos presentan una doble membrana, la cual posee una gran cantidad de poros nucleares, reflejo probable de un intercambio muy activo entre el núcleo y el citoplasma. Se considera que este parásito posee una compleja organización de la cromatina.

*Entamoeba histolytica*, además de que se clasifica dentro del reino Protista, es considerado un organismo rizópodo debido a que en el estadio de trofozoito posee pseudópodos como aparato de locomoción (Corliss, 1984). La clasificación taxonómica completa se muestra en la tabla I (Parker, 1982).

Superreino	Eukariotae
Reino	Animalia
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Sarcodina
Superclase	Rizhopoda
Clase	Lobosa
Subclase	Gymnamoebida
Orden	Amoebida
Suborden	Tubulina
Familia	Entamoebidae
Género	Entamoeba
Especie	histolytica

Tabla I. Clasificación taxonómica de *Entamoeba histolytica*. Tomada de <http://sn2000.taxonomy.nl/>

Ciclo de vida.

*E. histolytica* particularmente presenta dos estadios en su ciclo de vida: la fase infectiva: el quiste, el cual es resistente a factores ambientales y la fase activa: el trofozoito, que es sensible al ambiente y fuera del hospedero muere rápidamente por desecación (Figura 2).

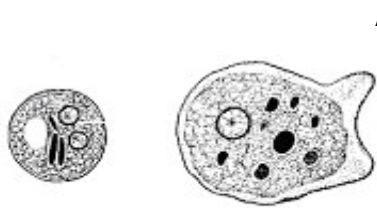


Figura 2. Imagen que muestra el estadio de (A) quiste y (B) trofozoito de *E. histolytica*. Imagen adaptada de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

El quiste es tetranucleado y posee un radio de 4 a 10  $\mu\text{m}$  aproximadamente con una forma redondeada o ligeramente ovalada. Cuando es observado en el microscopio electrónico se aprecia una pared de aproximadamente 125 a 150 nm de espesor, formada por una red de elementos fibrilares de 2 a 3 nm de diámetro. Cuando una persona ingiere alimentos o bebidas contaminados por quistes maduros, estos viajan a través del estómago llegando a el intestino delgado donde ocurre el proceso de desenquistamiento (Figura 3). Los trofozoitos pueden permanecer en el lumen intestinal viviendo como comensales inofensivos de la mayor parte de los individuos infectados (Martínez-Palomo, 1989).

Estos individuos se convierten en portadores asintomáticos, que no sufren la enfermedad, pero que sin embargo tienen la capacidad de infectar a

otros; especialmente cuando están dedicados al manejo y preparación de los alimentos .

Una vez colonizada la mucosa intestinal, los trofozoitos se dividen por fisión binaria produciendo quistes, los cuales son expulsados a través de las heces. Por razones aún desconocidas, los trofozoitos pueden atravesar la mucosa intestinal, produciéndose una colitis sintomática (enfermedad intestinal), o diseminarse a través del flujo sanguíneo hacia diferentes órganos del cuerpo como pulmones, cerebro e hígado principalmente, provocando abscesos (enfermedad extraintestinal) con la ayuda de enzimas proteolíticas, citotoxinas y fagocitosis.

En determinadas condiciones, los trofozoitos se desprenden de la mucosa y en el lumen del intestino grueso inician el proceso de enquistamiento. Durante este proceso, los trofozoitos se deshidratan y secretan parte de las reservas alimenticias presentes en las vacuolas digestivas, asumiendo la forma de prequiste. Posteriormente, secretan una pared probablemente de quitinas y forman pilas de ribosomas que constituyen los cuerpos cromidiales, transformándose en quistes uninucleados inmaduros (Eichinger, 1997), que posteriormente presenta divisiones nucleares sucesivas dando origen a los quistes tetranucleados.

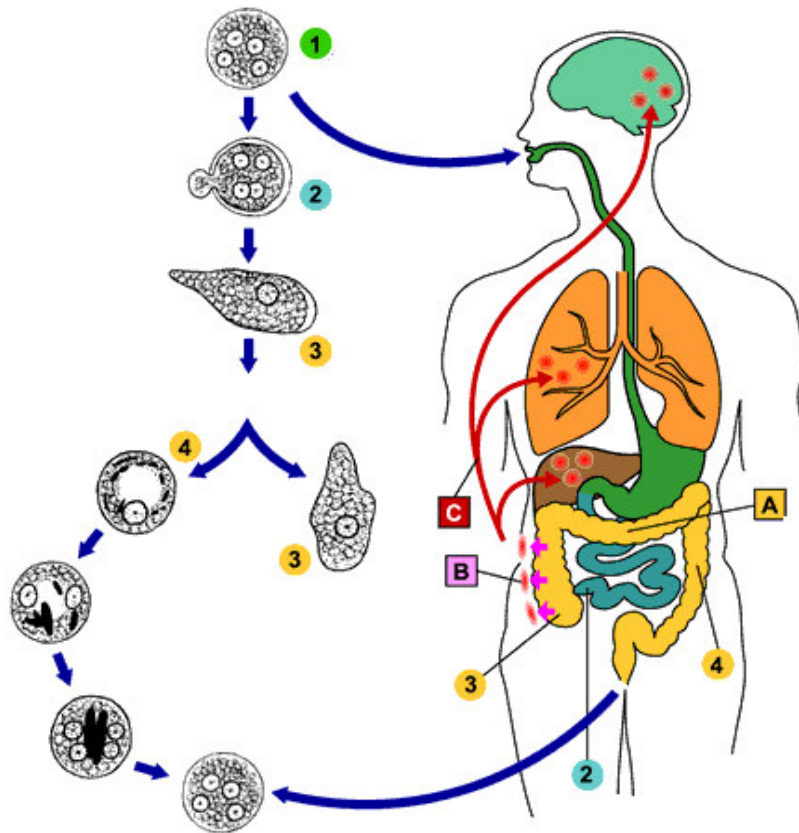


Figura 3. Esquema simplificado del ciclo de vida de *E. histolytica*. (1) Ingestión de quistes por medio de alimentos o bebidas contaminadas, (2) Etapa de desenquistamiento ocurrida en el intestino delgado, (3) Fase activa: los trofozoitos son liberados y migran hacia el intestino grueso, (4) División celular, dando lugar a nuevos quistes los cuales son desechados nuevamente por las heces fecales. En muchos casos los trofozoitos actúan como comensales en el intestino grueso (A. Infección no invasiva). En algunos casos los trofozoitos invaden la mucosa intestinal (B. Enfermedad intestinal) o a través del fluido sanguíneo pueden migran hacia otros órganos como son el hígado, pulmones y cerebro (C. Enfermedad extraintestinal). Imagen adaptada de [www.medicine.mcgill.ca/tropmed/txt/\\_derived/lecture1](http://www.medicine.mcgill.ca/tropmed/txt/_derived/lecture1)



## Canales Iónicos

Los canales iónicos son componentes esenciales de prácticamente todas las membranas biológicas, no sólo de la membrana citoplásmica, sino también de estructuras intracelulares, como mitocondrias y vacuolas, y aún de la compleja red membranal intracelular. Bajo este término se ha agrupado a una enorme diversidad molecular y funcional de complejos proteínicos, que sin embargo comparten una misma función: la de regular y seleccionar el flujo de iones entre una y otra cara de la membrana en la que se encuentran embebidos.

En los últimos treinta años, pocos campos de investigación en el área de biología celular, y tal vez de la biología misma, han evolucionado a un paso tan dinámico como el estudio de los canales iónicos. No obstante, aún no se ha entendido con certeza por qué las células necesitan una variedad de canales, ni se ha estudiado en detalle la estructura y función de muchos de ellos.

Desde los estudios de Hodgkin, Huxley y Katz y antes de la aceptación de la teoría de membrana, se creía que los fenómenos de excitabilidad de las neuronas y los músculos, estaban asociados con el flujo de iones a través de la membrana, y se sospechaba de la presencia de entidades que funcionaban a manera de poros, que tenían capacidad de discriminar entre iones como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$  (Katz, 1966; Aidley, 1983). Los trabajos de Hodgkin y Huxley (1952) dieron una descripción cuantitativa del potencial de acción; cambio transitorio de

voltaje que sucede en las membranas excitables. En este trabajo incluyeron la idea de “partículas”, que al cambiar de conformación serían capaces de controlar el flujo de los iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Durante los años sesentas y setentas, este campo de investigación estuvo enfocado a tratar de entender los fenómenos de membrana, y se pudo constatar la diversidad funcional de corrientes iónicas en gran variedad de preparaciones de distintas especies, lo cual anticipaba que éste sería un campo rico en conocimiento por la diversidad de funciones, incluso en células en las que no se hubiera sospechado que existieran estos flujos.

Fue sin embargo, con la invención del método de “patch clamp”, a finales de la década de los setentas, por Neher *et al.*, (1978), que el estudio de los canales iónicos tomó renovados bríos. Esta técnica consiste en el uso de pipetas de vidrio capaces de establecer sellos de alta resistencia eléctrica y por lo tanto, con un complicado sistema electrónico, son capaces de controlar espacial y temporalmente el voltaje, en una pequeña área de membrana (Figura 4). Bajo estas condiciones se puede registrar el comportamiento de un sólo canal iónico, de manera que cuando éste se abre y se cierra, la corriente eléctrica pasa de un nivel a otro. La magnitud de esta corriente, así como las propiedades cinéticas, como son el tiempo de apertura y cierre, constituyen criterios que permiten caracterizar a los canales iónicos. Con esta técnica se pudo constatar aún más la diversidad de canales iónicos. Se ha demostrado que existen canales iónicos, no sólo en las membranas de células excitables como neuronas y células musculares, sino también en células no excitables, como epitelios, macrófagos,

células endócrinas, células sanguíneas y, prácticamente en todo tipo celular existen trabajos que describen las propiedades de las corrientes iónicas que ahí se generan. La ubicuidad y diversidad de los canales iónicos también es evidente a la largo de la filogenia, pues están presentes en todas las especies ahora estudiadas, animales y vegetales, e inclusive en bacterias y levaduras (Hediger, 1997).

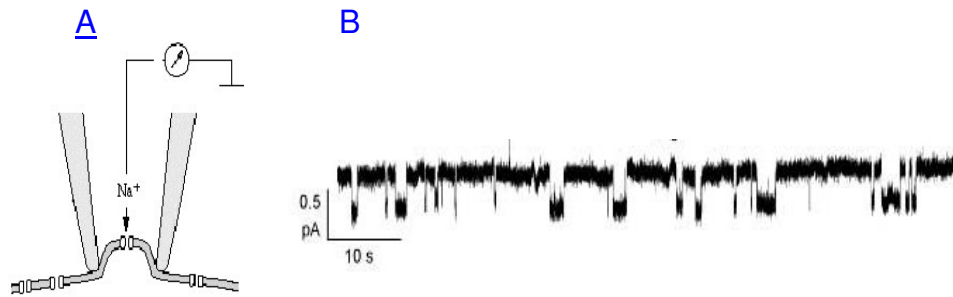


Figura 4. A. Representación de una pipeta de “patch clamp” estableciendo un gigasello con una membrana. B. Ejemplo de registros unitarios de corriente obtenidos mediante “patch clamp”. Las transiciones aleatorias entre dos niveles de corriente representan los estados de apertura y cierre de los canales iónicos atrapados en el parche de membrana. Imagen modificada de [www.medicin.fu-berlin.de/klinphys/images/patch](http://www.medicin.fu-berlin.de/klinphys/images/patch).

El fenómeno de excitabilidad es el ejemplo más claro en el que participan los canales iónicos, pero no es el único. Se ha demostrado la participación de éstos en procesos tan diversos como la mitosis (Valenzuela *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2002), la regulación del volumen celular (Gschwentner *et al.*, 1999), la capacidad de las células de reconocer su microambiente (Seydel *et al.*, 2001), la regulación del pH intracelular (Devuyst y Guggino, 2002); así mismo, existen una variedad de ejemplos en el que los canales iónicos, principalmente de  $\text{Ca}^{2+}$ , participan como intermediarios para señales moleculares, pues regulan la

entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio intracelular, cuando éste ión funciona como segundo mensajero (Dolmetsch, 2003; López-González *et al.*, 2003).

Actualmente se han logrado notables avances para comprender a nivel molecular cómo funcionan los canales iónicos. Con el uso de técnicas de biología molecular, se ha logrado identificar, aislar y secuenciar el o los genes de una gran cantidad de canales iónicos, principalmente en humano, rata, ratón y en algunas especies de invertebrados. Al contar con la secuencia de DNA, se ha podido deducir la secuencia primaria de la cadena peptídica resultante, de la cual se puede inferir la estructura secundaria, y finalmente la posible conformación que dicha proteína tendría en la membrana. Para algunos tipos de canales se han logrado producir cristales, con los cuales, al estudiar sus patrones de difracción de rayos X, se ha descrito su estructura a nivel atómico; tal es el caso del canal de  $\text{K}^+$  (Li *et al.*, 1998), el canal de  $\text{Cl}^-$  dependiente de voltaje (Dutzler *et al.*, 2002) y el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de voltaje (Jiang *et al.*, 2002). Sin embargo, aún en estos últimos ejemplos, se está todavía lejos de comprender cómo funcionan a nivel atómico estas proteínas, y cómo son capaces de discriminar tan efectivamente entre especies de iones, mientras que dichos iones son capaces de permear, a velocidades casi comparables a las de la difusión libre (Chung y Kuyucak, 2002).

## Componentes funcionales básicos de los canales iónicos.

A pesar de su diversidad molecular y funcional, algunas propiedades son comunes a todos los canales iónicos, de manera que, desde el punto de vista

puramente operacional, se puede describir un canal iónico modelo como se ilustra en la figura 5 en la cual se representan algunos componentes funcionales:

(1) Una **matriz proteínica** que se encuentra embebida en la membrana plasmática; (2) Un **poro acuoso**, que constituye la vía de acceso y transporte de los iones a través de la membrana; (3) Un **filtro de selectividad**, con el cual los canales iónicos adquieren su propiedad más notable, que es la de discriminar efectivamente entre las distintas especies de iones que se encuentran en el microambiente de ambas caras de la membrana. Así, existen canales que son capaces de discriminar hasta 1 en 100 millones de veces el  $\text{Na}^+$  sobre el  $\text{K}^+$ , y otros que son capaces de discriminar preferencialmente el  $\text{K}^+$  sobre el  $\text{Na}^+$ , o el  $\text{Ca}^{2+}$  sobre otros cationes. Igualmente hay canales que son capaces de permear el  $\text{Cl}^-$  y no los cationes, y otros que no tienen predilección por los cationes, aunque no dejan pasar los aniones; operacionalmente se ha descrito una (4) **compuerta** para comprender los procesos cinéticos que se observan en las corrientes iónicas, y por ende en la manera como los canales iónicos se abren y se cierran de manera aleatoria, sin embargo esta probabilidad depende de cambios microambientales, como pueden ser el voltaje, la tensión mecánica, o bien la presencia de agentes moduladores o segundos mensajeros. De todos estos estímulos, la respuesta de la compuerta es la mejor entendida para algunos tipos de canales conocidos como canales dependientes del voltaje transmembranal, y que agrupa a canales selectivos al  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Hille, 1992; Cereijido *et al.*, 2003).

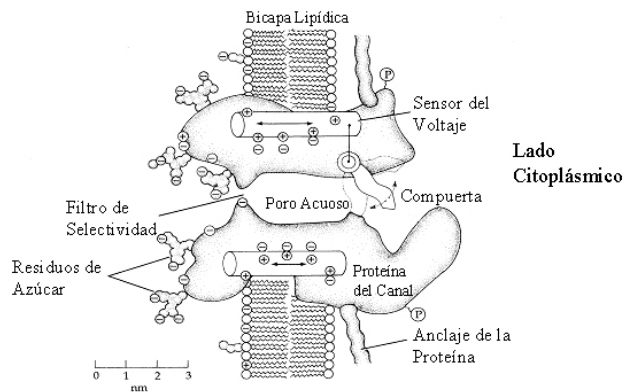


Figura 5. Esquema que ilustra los componentes funcionales de un canal iónico. Dibujo adaptado de Hille, 1992

## Diversidad Molecular.

Actualmente se han clonado y secuenciado una gran variedad de genes que codifican para canales iónicos. Existen en la naturaleza familias y superfamilias de genes cuya estructura está, a veces muy conservada a lo largo de la ontogenia y la filogenia. El ejemplo más estudiado de todos es el de la ahora denominada “superfamilia de canales iónicos dependientes del voltaje transmembranal”, a la cual pertenecen los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje, los canales de  $Na^+$  y las subunidades alfa de canales de  $Ca^{2+}$  (Terlau y Stuhmer, 1998; Ponce y Cerejido, 2000). Por otro lado existen canales selectivos al  $Cl^-$ , que se han denominado canales de  $Cl^-$  dependientes de voltaje o CIC, estos también forman una superfamilia, ampliamente diseminada en la naturaleza, al grado que se consideran componentes “ubicuos” de la membrana (Jentsch *et al.*, 2002). Un ejemplo más es el de los canales de  $Cl^-$  relacionados a

la superfamilia de proteínas del “cassette enlazador de ATP”, a la cual pertenecen canales iónicos como el CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), el canal asociado con la enfermedad de Fibrosis Quística, algunas ATPasas y el gene de Multi Resistencia a Drogas, el cual se afirma que se comporta como un canal de Cl<sup>-</sup> (Klein *et al.*, 1999)

En vista de que, como se verá adelante, los objetivos de este trabajo requieren del uso de conceptos de biología molecular de canales de K<sup>+</sup> por un lado, y de conceptos electrofisiológicos para el estudio de corrientes iónicas por el otro (véase Objetivos), se incluirá en seguida una breve revisión del conocimiento de canales dependientes de voltaje, que agrupa a los canales de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y, una revisión de algunos conceptos biofísicos relacionados con el estudio de canales iónicos.

## Superfamilia de canales iónicos dependientes del voltaje

De todas las familias de canales iónicos, la más estudiada es la superfamilia de canales iónicos dependientes del voltaje, a la cual pertenecen, como ya mencionamos los canales de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y canales de Ca<sup>2+</sup> (Terlau y Stuhmer, 1998).

El estudio molecular de los canales de K<sup>+</sup> dependientes del voltaje se inició cuando se identificó una cepa mutante de *Drosophila*, la cual se observó que tiembla, bajo la acción de éter. Se encontró que este defecto se debe a la ausencia de cierto tipo de corrientes iónicas en el músculo las cuales poseen la capacidad de inactivarse aún en presencia del voltaje (Papazian *et al.*, 1988).

La ausencia de estas corrientes se interpretó como la carencia de canales de  $K^+$  de algún tipo, por lo que para identificar los genes que codifican dichos canales se comparó el genoma de *Drosophila* silvestre con el de la mutante; así se identificó el locus *Shaker*, pudiéndose demostrar que este gene codifica para un canal de  $K^+$  (Ganetzky, 2000). Posteriormente se identificaron otros tres genes, también en *Drosophila*, a los que se les denominó *Shab*, *Shaw* y *Shal* (Covarrubias *et al.*, 1991). Esto condujo a la búsqueda de genes que codifican canales de  $K^+$  en otros organismos. Hasta la fecha se han identificado más de 60 genes en mamífero, que tienen similitud con los cuatro genes de *Drosophila*, y se han agrupado en familias por su homología. Existen así canales de  $K^+$  de la familia *Shaker*, *Shaw*, *Shab* y *Shal* en mamíferos e inclusive en plantas (Coetzee *et al.*, 1999).

El análisis de la secuencia peptídica predice que ésta se conforma en la membrana atravesándola seis veces (Figura 6). Existe una región que se embebe sólo parcialmente en la membrana, denominada H5, que parece ser el dominio que constituye el filtro de selectividad por el  $K^+$ , y es la región denotada S4 que confiere al canal su sensibilidad por el voltaje. Los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje son tetrámeros que pueden constituirse como heteromultímeros, formados por subunidades de la misma, pero no de diferente familia (Covarrubias *et al.*, 1991).



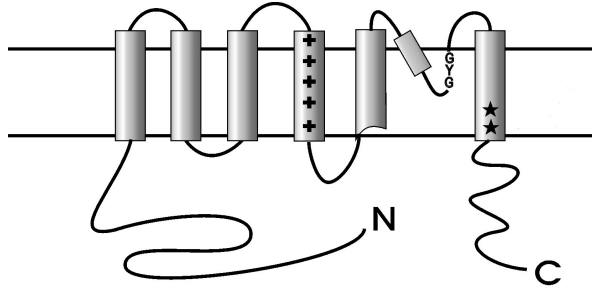


Figura 6. Representación topológica de una subunidad de canal de  $K^+$  dependiente del voltaje, que consiste de seis segmentos transmembranales, y una porción parcialmente embebida en la membrana. Se requieren cuatro de estas subunidades para conformar un canal iónico.

Por otro lado, y de manera independiente, se realizó la clonación del primer canal de  $Na^+$ , a partir del órgano eléctrico de *Electrophorus electricus* (Noda et al., 1986). Gracias a que se sabía que los canales de  $Na^+$  existen de manera abundante en este organismo, y que la saxitoxina se enlaza específicamente, se pudo purificar bioquímicamente una cantidad de proteína suficiente para secuenciar una porción del canal. A partir de la secuencia de aminoácidos se dedujo la secuencia de DNA, que se usó posteriormente como templado para buscar, en una librería genómica, el gen completo. Así se encontró que los canales de  $Na^+$  dependientes del voltaje consisten en una estructura que consta de cuatro repeticiones, incluidas en el mismo gen y cada una de las repeticiones tiene a su vez un patrón que consiste en seis segmentos transmembranales con una porción parcialmente embebida; de manera muy similar a los canales de  $K^+$  (Figura 7). De manera similar al caso de los canales de  $K^+$ , la secuencia del canal de  $Na^+$  de *Electrophorus electricus* sirvió como templado para buscar por homología, genes similares en otros organismos como rata y humano y se constató que existe una enorme conservación en la

estructura básica del canal, en la región de los segmentos transmembranales y sobre todo en la región H5 que es la que críticamente constituye el filtro de selectividad (Goldin, 2002).

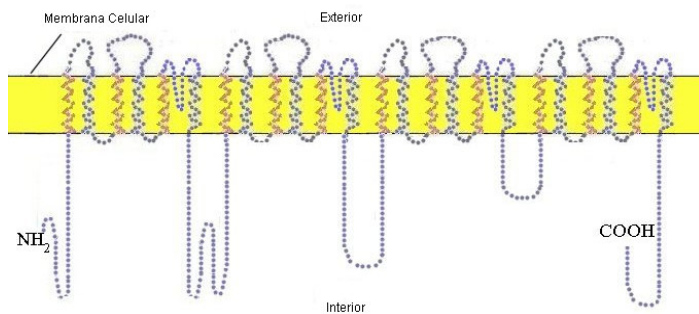


Figura 7. Topología de un canal de sodio dependiente de voltaje que muestra las cuatro repeticiones y seis segmentos transmembranales en cada repetición.

## Conceptos electrofisiológicos para el estudio de los canales iónicos

En vista de que los canales iónicos son entidades que permiten el flujo de iones, y de que los iones poseen carga eléctrica, para el estudio de las propiedades de los canales iónicos es necesario comprender algunos conceptos eléctricos. A continuación incluimos una breve revisión de los que consideramos cruciales en este trabajo, sin embargo una explicación más completa y detallada se puede consultar en textos especializados.

En su forma más simple, los canales iónicos se pueden considerar como un elemento conductor en un circuito eléctrico. La cantidad de iones que fluye a través de los canales determina una corriente eléctrica que obedece a la ley de Ohm:

$$I = g \cdot E$$

Donde  $I$  es la corriente en Amperios,  $g$  es la conductancia en Siemens y  $E$  es el potencial eléctrico transmembranal, en Volts.

Cuando se estudian los canales iónicos utilizando electrofisiología, lo que se registra generalmente es la corriente que fluye a través de la membrana, con la ayuda de aparatos electrónicos, que son capaces de amplificar varios miles de veces las tenues corrientes que se generan a través de una membrana o inclusive de un solo canal. Sin embargo, para poder atribuir los registros al flujo de iones a través de la membrana, es necesario lograr una condición en la que el potencial transmembranal se mantenga constante en función del tiempo. Esto es porque los canales se encuentran embebidos en la membrana, la cual se comporta como un capacitor (elemento eléctrico que consiste en dos placas conductoras separadas por un material dieléctrico, o no conductor). Este arreglo forma una corriente adicional, denominada corriente capacitiva, cuya magnitud depende del área de membrana y del cambio de voltaje; es decir, de la derivada temporal del potencial transmembranal. Cuando el potencial de membrana se mantiene constante en función del tiempo, la corriente capacitiva se anula y entonces podemos registrar sólo el flujo de los iones a través de la membrana i.e. de canales iónicos. La condición de fijación de voltaje se consigue utilizando un sistema electrónico de retroalimentación, en el que primeramente se mide el potencial transmembranal y después se compara con el valor de potencial al que se desea mantener, seguidamente el circuito inyecta la corriente necesaria

para corregir el potencial real de la membrana, esto con la suficiente rapidez como para no perturbar el sistema al grado de causar oscilaciones debido a retardos (Figura 8). La condición de fijación de voltaje se logró inicialmente en el axón gigante de calamar, sin embargo, con la invención

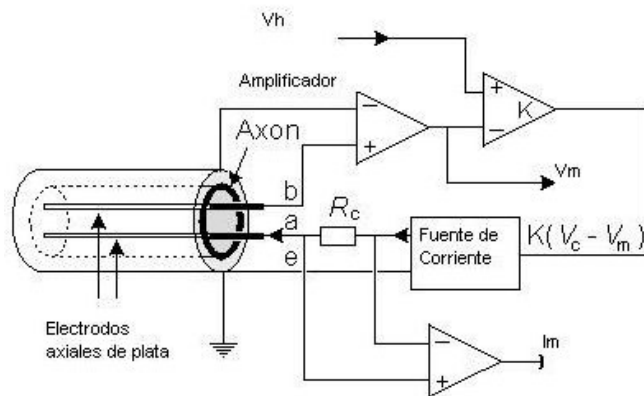


Figura 8. Esquema que representa la fijación de voltaje en un axón gigante de calamar, con dos amplificadores operacionales, indicados con un triángulo. Esquema adaptada de [butler.cc.tut.fi/~malmivuo/bem/bembook/04/fi/0404.gif](http://butler.cc.tut.fi/~malmivuo/bem/bembook/04/fi/0404.gif)

del “patch clamp” se ha podido generalizar a prácticamente todo tipo de células. Otros procedimientos experimentales también se basan en este principio, entre ellos está el de fijación de voltaje con dos microelectrodos. En esta condición, uno de los electrodos sirve para medir el potencial y compararlo con el valor deseado, mientras el segundo inyecta la corriente necesaria para compensar el voltaje. Este procedimiento se realiza iterativamente, en intervalos de tiempo discretos.

La corriente necesaria para compensar el circuito será exactamente equivalente en magnitud y cinética a la corriente que fluye a través de la membrana i.e. de los canales iónicos que ahí se encuentran, la cual puede ser positiva o negativa, dependiendo del valor al que se esté fijando el voltaje y de las propiedades de los canales en estudio.

En virtud de que en el medio acuoso existen tanto aniones como cationes, una corriente eléctrica puede deberse al flujo de aniones, o bien de cationes, o ambos.

La corriente producida por el flujo de aniones se considera inverso al de cationes; así, el eflujo de un catión podría registrarse equivalentemente al influjo de un anión, y por convención se considera que una corriente positiva es ocasionada ya sea por el influjo de aniones o por el eflujo de cationes.

### *Ecuación de Nernst.*

En una célula se observa que las concentraciones de los iones de interés fisiológico, como el  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$  es distinta en el citoplasma con respecto al medio extracelular. Esta asimetría generalmente es dada por la acción de bombas y transportadores activos. Al estudiar las propiedades biofísicas de la permeabilidad de la membrana se puede observar que para cada especie de ión existe un valor de potencial de membrana en el cual no hay un flujo neto. Este valor se conoce como el potencial de equilibrio de dicho ión, y se puede calcular con la Ecuación de Nernst, de la siguiente manera:

$$E_{ión} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[ión]_{ext}}{[ión]_{int}}$$

Donde R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta, z la valencia del ión y F la constante de Faraday.

Esta ecuación considera que existe un valor del potencial de membrana en el cual la fuerza química que impulsa un ión en un sentido de la membrana, se contrarresta con una fuerza eléctrica que la impulsa en el sentido contrario, de manera que el flujo neto es de cero. Así, cada ión de interés fisiológico como son el  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$  tienen un valor de potencial de equilibrio que depende de sus concentraciones intra y extracelulares.

Cuando se estudian corrientes iónicas en una membrana, generalmente se desea saber qué iones ocasionan ese flujo, es decir, los canales que permiten esa corriente a qué ión son selectivos, por lo que se fija la membrana a valores de voltaje variables que van desde  $-100$  mV hasta  $100$  mV y se registran las corrientes resultantes en cada caso. Se determina el valor de potencial de membrana en el que las corrientes cambian de negativas a positivas. Este potencial de inversión puede estar muy cercano al valor teórico de potencial de equilibrio calculado por la ecuación de Nernst para cualesquiera de los iones, de manera que el potencial de inversión puede ser un primer criterio para determinar la naturaleza iónica de las corrientes en estudio.

Inducción de la expresión de corrientes iónicas en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNAm.

El ovocito de la rana sudafricana, *Xenopus laevis*, es actualmente uno de los sistemas de expresión heteróloga más utilizados para ensayar las propiedades de canales iónicos cuyo RNAm es sintetizado *in vitro* (Goldin, 1992; Shih *et al.*, 1998). También se utiliza frecuentemente como un bioensayo para

medir la expresión de corrientes iónicas a partir de RNAm aislado de tejidos o células en cultivo (Romero *et al.*, 1998). La principal razón estriba en el tamaño de los ovocitos, de aproximadamente 1 mm de diámetro, lo cual facilita enormemente su manipulación. En vista de que el ovocito está capacitado para disparar la síntesis de biomoléculas a partir de la fecundación, en teoría también es capaz de sintetizar proteínas a partir de los RNA mensajeros que se le inyecten. Sin embargo no es así en todos los casos, pues existen ejemplos de secuencias de mensajeros que no prosperan a proteínas maduras (Morin *et al.*, 1995). Los ovocitos han sido utilizados para estudiar las propiedades de una gran variedad de canales iónicos, así como de transportadores y receptores a neurotransmisores (Stuhmer *et al.*, 1998).

El método de expresión heteróloga en ovocitos se empezó a utilizar en 1984, cuando se demostró que la inyección en los ovocitos de RNAm aislado de células musculares inducía la expresión de receptores nicotínicos de acetilcolina en su membrana (Miledi y Parker, 1984). Aunque los ovocitos son capaces de realizar gran parte de las modificaciones post-transcripcionales de las proteínas codificadas por RNAm exógeno (como son la acetilación, glicosilación, fosforilación, degradación de precursores y ensamblaje de subunidades), a veces son incapaces de igualar las condiciones que se realizarían en las células de las que se origina el RNAm, por esta razón, en algunos casos, los resultados obtenidos con este sistema se deben tomar con cautela, porque bien podrían no reflejar las propiedades reales de los canales en estudio.

La figura 9 muestra el procedimiento general que se sigue cuando se utiliza este sistema de expresión, que comienza con la purificación de RNAm a partir de células o de tejido, o bien a partir de su síntesis *in vitro* cuando se parte de una secuencia de cDNA. Posteriormente se inyecta el RNA m en la cara animal de los ovocitos maduros y se incuban por varios días hasta que se registra el grado de expresión de las corrientes iónicas con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos, apoyado por un sistema electrónico que amplifica las corrientes que se obtienen al enviar un protocolo de voltaje, que consiste en pulsos cuadrados de magnitud y de duración variable, que se controlan con ayuda de un “software” especializado mediante una computadora y a través de un convertidor analógico digital (Wagner *et al.*, 2000).

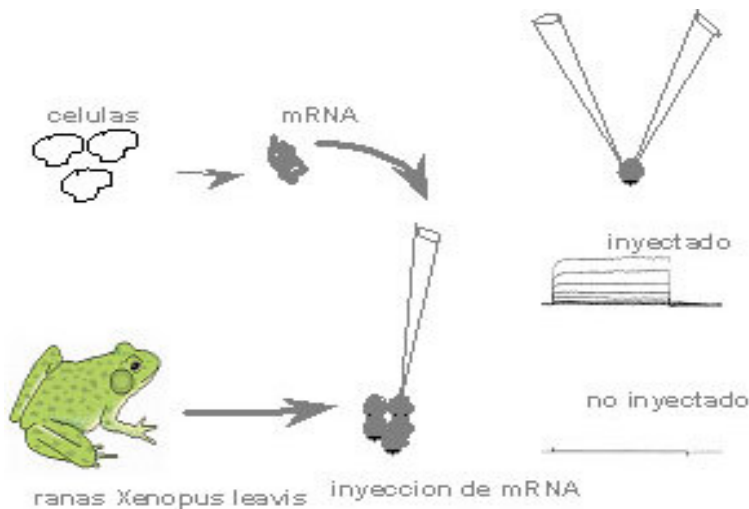


Figura 9. Esquema que representa el procedimiento general para la expresión de corrientes iónicas en ovocitos de rana mediante la inyección de RNA mensajero heterólogo. Imagen tomada de Cerejido *et al*, 2003.



Por otro lado, se ha encontrado en el ovocito una gran variedad de corrientes iónicas endógenas, de las cuales aún se desconoce su función, y que en algunos casos pueden confundir los resultados de la inyección de RNAm exógeno (Arellano *et al.*, 1996). Las más notables son (1) Corrientes de Cl<sup>-</sup> activadas por Ca<sup>2+</sup>; (2) Corrientes de Cl<sup>-</sup> inducidas por hiperpolarización, las cuales son producidas por canales de Cl<sup>-</sup> tipo ClC, que se activan con hiperpolarizaciones de -100 mV; (3) Corrientes de Cl<sup>-</sup> sensibles al volumen, o dependientes de la osmolaridad; (4) Corrientes de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje; (5) Corrientes de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje. Sin embargo, los niveles de expresión de estas corrientes endógenas es despreciable en comparación de los niveles que suelen obtenerse como resultado de la inyección de mensajeros. Las corrientes de Cl<sup>-</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> generalmente se expresan con una magnitud de 100 nA. El resto con magnitudes entre 2 y 10 nA. En contraste, las corrientes que suelen obtenerse por la inyección de RNA generalmente superan los 2000 –6000 nA de magnitud.

## ANTECEDENTES

En protozoarios en general, y en *E. histolytica* en particular, existen muy pocas referencias que sugieran o demuestren la existencia de cualquier tipo de canal iónico. En *Paramecium tetraurelia* por ejemplo, existen estudios electrofisiológicos que revelan la existencia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Preston *et al*, 1992) y canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Saimi y Ling, 1995) entre otros. En protozoarios parásitos sin embargo no existe hasta ahora ninguna evidencia electrofisiológica de la presencia de algún tipo de canal iónico. Algunos estudios sugieren la presencia de canales de manera indirecta; Por ejemplo, se ha descrito un incremento en las corrientes de  $\text{K}^+$  de macrófagos infectados con *Leishmania amazonensis* que sugieren que se trata de canales rectificadores entrantes (Forero *et al*, 1999); También se ha observado que *Plasmodium falciparum* induce cambios en los canales iónicos de eritrocitos humanos (Egee *et al*, 2002; Huber *et al*, 2002). En el caso de *E. histolytica* existen pocos trabajos que estudien las propiedades de los canales iónicos. Al estudiar el efecto de inhibidores de canales iónicos como el verapamil y el brepidil sobre la citopatogenicidad de *E. histolytica* se encontró que estos bloqueadores inhiben significativamente la capacidad de adherirse a células de ovario de hamster CHO (por sus siglas en inglés de: Chinese Hamster Ovary), lo cual sugiere que existen canales de  $\text{Ca}^{2+}$  involucrados en este proceso (Ravdin *et al*, 1982). Dichos bloqueadores sin embargo, no inhiben la capacidad de invasividad de *E. histolytica* en monocapas de células MDCK (Madine Darby Canine Kidney), una línea celular proveniente de riñón de perro, pues existe una caída en la

resistencia eléctrica trans-epitelial (TER) de la misma manera que ocurre cuando no hay presencia de dichos bloqueadores (López-Vancell *et al*, 2000). Por otro lado se ha clonado en *E. histolytica* el gene *EhPgp5*, que tiene similitud a canales de multi-resistencia a drogas (por sus siglas en inglés MDR). Cuando el RNAm de *EhPgp5* se inyecta en ovocitos de rana, éste induce la expresión de corrientes de Cl<sup>-</sup>. (Delgadillo *et al*, 2000). Aparte de los trabajos anteriores no existen otras investigaciones que estudien las propiedades electrofisiológicas y moleculares de los canales iónicos en *E. histolytica*.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Identificar y caracterizar canales iónicos en trofozoitos en cultivo de *Entamoeba histolytica*, utilizando metodologías electrofisiológicas y moleculares.

### Objetivo Particular 1.

Determinar si el RNAm de trofozoitos de *E. histolytica* en cultivo, induce la expresión de corrientes iónicas distintas a las endógenas, cuando éste es inyectado en ovocitos de rana *Xenopus laevis*.

Objetivos específicos:

- 1.1. Obtener el RNA total a partir de trofozoitos de *E. histolytica* en cultivo y a partir de éste, aislar el RNAm.
- 1.2. Realizar la disección de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.
- 1.3. Inyectar el RNAm en los ovocitos
- 1.4. Registrar con técnicas electrofisiológicas las corrientes iónicas expresadas en los ovocitos
- 1.5. Analizar las propiedades cinéticas de las corrientes iónicas.

### Objetivo Particular 2

Identificar con técnicas de biología molecular posibles canales iónicos de *E. histolytica*, comparando la base de datos del genoma de este parásito parcialmente secuenciado (GSS, Genomic Sequence Survey) con fragmentos de secuencias conservadas de canales iónicos; específicamente de canales pertenecientes a la familia de canales de potasio dependientes del voltaje.

Objetivos específicos:

- 2.1 Identificar secuencias conservadas de familias de canales iónicos.
- 2.2 Identificar secuencias genómicas parciales de *E. histolytica* con posible similitud a canales iónicos.
- 2.3 Diseñar “primers” para amplificar dichas secuencias a partir de cDNA de *E. histolytica*.
- 2.4 Obtención de una sonda con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- 2.5 Verificar la secuencia del fragmento con análisis de restricción enzimática.

## JUSTIFICACIÓN

El estudio de los canales iónicos de *E. histolytica* es importante, debido a que este protozoo tiene un alto impacto en materia de salud pública, y cualquier avance en el conocimiento de su fisiología celular y molecular, podría ayudar a comprender mejor sus mecanismos de supervivencia y de patogenicidad. Actualmente se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de la diversidad funcional y molecular de canales iónicos en muchas especies, pero en *E. histolytica* no se ha descrito hasta ahora ningún tipo de canal iónico. Sin embargo, dado que se han encontrado este tipo de proteínas en prácticamente todo tipo celular, desde las bacterias hasta los mamíferos, es esperable que *E. histolytica* tenga también canales iónicos.

En la naturaleza se han encontrado familias de canales iónicos cuya estructura general permanece muy conservada a lo largo de la filogenia, y otros que son muy especializados y se expresan solamente en ciertos tejidos u organismos. En virtud de la distancia taxonómica entre *E. histolytica* y los mamíferos, se puede esperar que existan en éste parásito canales iónicos cuya estructura y propiedades sean muy distintas a las que se han descrito en mamíferos; sin embargo también es posible esperar la presencia de canales iónicos que conserven la estructura general de familias de estas proteínas que se han encontrado en bacterias, en plantas, hongos o mamíferos.

En el presente trabajo hemos empleado dos estrategias distintas para identificar posibles canales iónicos de *E. histolytica*. En el primer caso hemos supuesto que este parásito tenga algún o algunos canales similares a la familia

de canales de potasio dependientes del voltaje y que estos canales tendrían un dominio que es muy conservado, propiamente la secuencia de aminoácidos TVGYG que constituye el filtro de selectividad de los canales. En el segundo caso hemos recurrido a la técnica de expresión de corrientes iónicas que se ha utilizado cuando se trata de clonar canales iónicos que no tienen una similitud con canales ya clonados en otras especies y para los cuales no existen referencias a partir de las cuales se puedan diseñar sondas o “primers”.

## HIPÓTESIS

Como hipótesis central de este trabajo podemos establecer que *E. histolytica*, al igual que cualquier otro tipo celular, tiene una variedad de canales iónicos, los cuales le sirven para distintos propósitos, como podría ser la regulación de volumen, el reconocimiento de microdominios, quimiotaxis, etcétera. Algunos de ellos podrían ser similares en función y en estructura a los identificados en otras especies. Pero también se podrían encontrar en este organismo canales enteramente distintos a los descritos hasta hoy en otras especies.

De acuerdo a los objetivos planteados en este trabajo podemos postular las siguientes hipótesis:

1. Respecto a la expresión de corrientes iónicas en ovocitos inyectados con RNAm de *E. histolytica*, pensamos que, si este parásito en realidad presenta una variedad de canales iónicos, y si existe una reserva de secuencias de RNAm que codifican para estas proteínas, entonces la inyección del mensajero, inducirá corrientes iónicas distintas a las endógenas de los ovocitos, aún cuando no se pueda precisar qué tipo de corrientes se expresarán. Dados los antecedentes que sugieren la presencia de casi cualquier tipo de canal iónico (ver antecedentes), esperaríamos que las corrientes expresadas fueran una mezcla de la expresión de estos canales. De acuerdo a la abundancia de una o varias especies de canales iónicos esperaríamos que las corrientes iónicas



tuvieran determinadas características cinéticas y de selectividad que exploraremos en este trabajo.

**2.** Así mismo, es posible esperar que *E. histolytica* posea canales iónicos similares a los descritos para otros organismos, particularmente entre estos los canales de potasio dependientes del voltaje, pues, como se ha visto, tienen secuencias altamente conservadas, desde las bacterias hasta el humano (Anderson y Greenberg, 2001). Por tal motivo esperamos encontrar, a partir del análisis del genoma parcial de *E. histolytica*, secuencias peptídicas similares a canales iónicos.

## METODOLOGÍA

### Cultivo celular.

Los trofozoitos de *E. histolytica* de la cepa HM1-IMSS, se cultivaron como se describe en Delgadillo *et al.*, (2000). Se mantuvieron en tubos de vidrio siliconizados de 125 mm con tapa de rosca (13-415., Bellco, USA), a 37°C en medio axénico Diamond TYI-S-33, suplementado (20% de suero bovino, 3% de mezcla de vitaminas de Diamond, 0.25 UI/ml de penicilina y 35 µg/ml de estreptomicina). Cuando se resembraron, los trofozoitos en fase logarítmica de crecimiento se incubaron en hielo durante 5-10 min, se agitaron suavemente y se inocularon en medio fresco ( $1 \times 10^4$  células/ml). Para cosecharlos, los trofozoitos se colocaron en hielo con el fin de desprenderlos y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4° C en una centrífuga Beckman y un rotor JA10 . El sobrenadante se decantó y los paquetes celulares se lavaron una vez en PBS (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mM, pH 7.2). Las pastillas se resuspendieron en PBS y el número de células se estimó con la cámara de Neubauer.

*Obtención de RNA total de E. histolytica por el método de un solo paso (Chomczynski y Sacchi, 1987).*

Los materiales utilizados fueron tratados como se recomienda en Sambrook *et al.*, (2000) para procedimientos de RNA. Fueron lavados con agua bidestilada y horneados a 200 °C durante 2 horas. De igual manera, los reactivos usados fueron tratados o preparados con agua previamente tratada con Dietil Pirocarbonato (por sus siglas en inglés DEPC).

Para la obtención del RNA total se cultivaron trofozoitos hasta que, en fase logarítmica se tuviera la cantidad de  $1.5 \times 10^7$  trofozoitos aproximadamente. Éstos se centrifugaron posteriormente en PBS a 1000 rpm a 4 °C en tubos de 50 ml (rotor Beckman JA10) por 15 min. La pastilla celular se mezcló con 5ml de solución D (tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM; pH 7 y sarcosyl 0.5%), 0.5 ml de acetato de sodio 3M; pH 7.2 y 1ml de fenol cloroformo. Posteriormente se adicionaron a cada tubo 35µl de β mercaptoetanol y 1 volumen de isopropanol. Se agitaron fuertemente y se colocaron en hielo por 15 minutos. Se centrifugaron a 13000 rpm (rotor HB4 de Sorvall) durante 20 min a 0°C. La fase acuosa se pasó a un tubo nuevo de 50 ml, se le agregó 1 volumen de fenol-cloroformo y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min (rotor HB4 de Sorvall) . El paso anterior se repitió en tres ocasiones. La muestra se dejó precipitando durante toda noche a -20°C en un tubo Corex. Después la muestra se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min, el sobrenadante se decantó y se agregó 1 volumen de etanol al 70 %. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 min, este paso se repitió dos veces. La pastilla obtenida se resuspendió en 300 µl

de solución D complementada con  $\beta$  mercaptoetanol (7  $\mu$ l/ml) y se pasó a un tubo Eppendorf. Se agregó un volumen de isopropanol y se dejó al menos 2 horas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Después se centrifugó en una micro centrífuga (Brinkmann) a 13000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  15 min. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 300  $\mu$ l de etanol absoluto frío. Finalmente la muestra se resuspendió en agua DEPC.

### Purificación de RNA mensajero (poli A<sup>+</sup>)

A partir del RNA total se purificó el RNA poli (A)<sup>+</sup> haciéndolo pasar por columnas de poli-dU Sepharosa, de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Pharmacia-LKB, Suecia): En un tubo cónico se prepararon 800  $\mu$ l de resina hidratada en una solución denominada amortiguador de unión, que contiene NaCl 200 mM, Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM y SDS al 0.2% . La resina empacada, se equilibró con 15 ml de solución amortiguadora de recuperación compuesta por formamida al 90%, Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM y SDS al 0.2% y posteriormente se equilibró con 17 ml de amortiguador de unión.

La muestra de RNA total se pasó por la columna preparada. Para linearizar el RNA, el tubo contenedor del RNA total, se colocó durante 15 min a  $70^{\circ}\text{C}$  e inmediatamente se colocó en hielo. A la muestra de RNA total se le agregó un volumen igual de solución de unión 2X y en seguida se pasó 3 veces por la columna. A la solución recuperada (poli A<sup>-</sup>) se le agregaron 0.1 volúmenes de NaCl 5 M, 0.23 volúmenes de agua desionizada y 1 volumen final de etanol absoluto frío para que se precipitaran las moléculas.

Para la recuperación de las moléculas de poli (A)<sup>+</sup> la columna se lavó con 10 fracciones de 0.75 ml de amortiguador de recuperación. Cada fracción se trató de igual forma que las muestras de poli (A)<sup>-</sup>. Finalmente, las muestras de RNA se resuspendieron en agua desionizada y el RNA se cuantificó por espectrofotometría. Se utilizó el espectrofotómetro modelo ICP-OES OPTIMA 2000 DV de Perkin-Elmer. Se diluyeron 2 µl de RNAm en 300 µl de agua desionizada. La mezcla se puso en una cubeta de cuarzo para leer la absorbancia a una longitud de onda de 260 nanómetros. La concentración de la muestra se calculó considerando que 1 DO es equivalente a una concentración de 50 µg/µl.

### Obtención y manejo de los ovocitos.

Se procedió de manera similar a como se describe en Delgadillo *et al.*, (2000) y Stumher (1998). Las ranas sudafricanas hembras de la especie *Xenopus laevis* fueron obtenidas de la compañía Xenopus One (Wisconsin, EUA). Mantenidas en contenedores de agua libre de pirógenos y alimentadas cada tercer día con hígado de pollo en trozos. Para la obtención de ovocitos, las ranas se anestesiaron sumergiéndolas en un contenedor con agua y hielo durante 10 minutos o hasta cerciorarse de su estado de inconciencia, evaluado por la ausencia de reflejo inducido al ejercer presión en una pata. Una vez anestesiadas, se transfirieron a un nuevo recipiente con hielo colocando la región abdominal hacia arriba. Para la disección de los ovocitos, se realizó una incisión en la parte inferior derecha o izquierda del abdomen de la rana, de aproximadamente 1 cm y se extrajeron algunos lóbulos del ovario, que se

colocaron en cajas Petri con medio OR2-P, compuesta por NaCl 83 mM, KCl 2.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ácido N-2-hidroxietilpiperazo-N'-2-etanosulfónico-trietanolamína (HEPES) 5 mM y NaHPO<sub>4</sub> 1 mM, pH 7.6. El resto del ovario se reacomodó en su lugar; se suturó separadamente la piel y la pared abdominal y se permitió que la rana se recuperara por varias horas en un pequeño contenedor. Los lóbulos ováricos extraídos se enjuagaron dos veces con medio OR2-P, se disgregaron mecánicamente bajo un microscopio invertido con un par de forceps y posteriormente se incubaron con colagenasa (tipo 1A SIGMA, EUA) disuelta en medio OR2-P, a una concentración 0.5 mg/ml durante una hora a temperatura ambiente y con agitación constante, esto se hizo para eliminar la capa celular folicular que rodea a cada ovocito. Finalizado el tiempo de incubación, los ovocitos se enjuagaron dos veces con medio ND96 (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM, pH 7.6) para eliminar la acción de la colagenasa y posteriormente se colocaron en cajas Petri de 60 x 15 mm, para cultivo de tejido (Costar, EUA) con medio ND96 complementado con piruvato de sodio 2.5 mM y gentamicina 100 µg/ml y se incubaron a 17 ° C, en una incubadora de baja temperatura (VWR modelo 2005, EUA).

### Inyección de RNAm.

Se seleccionaron los ovocitos maduros ( que estaban en los estadios III y IV) y se microinyectaron con pipetas de vidrio (Drummond), elaboradas a partir de capilares horneados a 200°C por 4 horas, los cuales se produjeron en

un estirador de pipetas vertical (David Kopf, California, EUA) y se rompieron con unas pinzas flameadas o una espátula de metal, bajo observación en un microscopio invertido, hasta que se obtuvo una punta con el filo biselado y un diámetro adecuado (entre 10 y 20  $\mu\text{m}$ ). Se colocó en la base del electrodo un poco de aceite mineral, se insertó la aguja de un microinyector (Microdispenser Digital 10  $\mu\text{l}$ , Drummond Scientific, Model 510X ) desde la base del electrodo de inyección hasta la punta, se aseguró el electrodo al inyector, y éste a su vez se aseguró a un micromanipulador mecánico (Narishige) sujeto en una base magnética. El electrodo se llenó por succión, con 1 a 3  $\mu\text{l}$  de la solución de inyección deseada (RNA mensajero) disuelta en agua previamente tratada con DEPC, esta operación se realizó bajo el microscopio estereoscópico.

Una vez tomada la muestra de RNA en la pipeta de vidrio, se colocó bajo el microscopio una caja de Petri de plástico, de 100 mm de diámetro, que fue rallada repetidamente en el fondo (para evitar que se resbalaran los ovocitos), esta caja se llenó de solución ND96 y en ella se ordenaron, en fila un grupo de 20 a 30 ovocitos previamente seleccionados. Con el micromanipulador, sobre el que está sujeto el microinyector, se aproximó la micropipeta sobre cada uno de ellos, verificando la penetración con el microscopio. Después de penetrado, a cada ovocito se le inyectaron de 40 a 60 nanolitros del RNAm que contenía la pipeta. Posteriormente se incubaron en medio ND96 (complementado con piruvato de sodio y gentamicina) a 16 °C.

## Registro de corrientes iónicas en ovocitos.

Se utilizó la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos. Los ovocitos se colocaron en una cámara de lucita, que tiene una horadación en el centro para poder albergar un ovocito inmerso en una solución salina de composición conocida (ND96 ó ND0). La cámara de lucita está debajo del microscopio estereoscópico, y a los lados se encuentran dos bases que tienen cada una un micromanipulador sobre el que se montó un cabezal de prueba, al que a su vez se adaptó un sostenedor de pipetas, que tiene alambre de plata clorurado. En cada uno de estos sostenedores se colocó una pipeta de vidrio, llena con solución salina de KCl 3M. Los electrodos fueron elaborados de manera similar a las pipetas que se usan para inyectar a los ovocitos, pero utilizando un tipo de vidrio distinto (Kimax) y un estirador de pipetas horizontal (Sutter, Brown Flaming). Los electrodos de registro se elaboraron de manera que tuvieran una resistencia de 0.5 a 1.0 mega-Ohms ( $1 \times 10^6$  Ohms) para los electrodos de corriente y de 1 a 2.5 megaohmios para los electrodos de voltaje. Para el registro de las corrientes iónicas se insertaron simultáneamente ambos microelectrodos en el ovocito. El proceso se verificó midiendo el cambio de potencial del electrodo, que pasa de un valor de cero a un valor de potencial de entre  $-15$  y  $-60$  mV, que refleja el potencial de membrana del ovocito. La medición del potencial de membrana se leyó en un panel del amplificador (TEV-200A, DAGAN, EUA). El amplificador tiene dos conectores BNC, en uno de los



cuales se leyó el valor de la corriente de membrana y en el otro el potencial de membrana del ovocito. También tiene un BNC de entrada, mediante el cual se puede controlar el potencial al que se desea mantener el ovocito y que a su vez es controlado por una computadora, a través de un “software” especializado (CLAMPEX, de Axon Instruments, CA) y mediante un convertidor analógico digital (Digidata 2000, Axon Instruments)

Búsqueda “en línea” de secuencias genómicas de DNA similares a canales iónicos.

Se utilizó el programa de “software” BLAST avanzado de NCBI, NIH (National Institutes of Health, USA). Las secuencias peptídicas comunes a canales tipo *Shaker*, *Shab*, *Shal* y *Shaw* se ingresaron en el programa, en el cual se definieron los parámetros para restringir la búsqueda al banco de datos GSS (Genomic Survey Sequence) de GENE BANK, una base de datos que contiene secuencias incompletas del genoma de *E. histolytica*. Para saber cuál de los candidatos obtenidos era viable, traducimos toda la secuencia del GSS reportado, en el marco de lectura en que encontró la secuencia peptídica y vimos si no tenía codones de terminación tempranos. La secuencia peptídica traducida fue a su vez utilizada como templatado para hacer un BLAST sin restricciones de especie.

## Síntesis de cDNA.

Se utilizó el kit de transcripción reversa de Superscript II RT, de GIBCO BRL, siguiendo las instrucciones del fabricante, que son como a continuación se describe: En un tubo de reacción, se mezclaron 1  $\mu$ l de oligo dT, 2  $\mu$ g de RNAm y 11  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O DEPC, esterilizada en autoclave y libre de RNAsas. El tubo se incubó a 70 °C por 10 min., e inmediatamente se transfirió a hielo para linearizar las especies de RNAm. Después de agitar el tubo se agregaron 4  $\mu$ l de buffer de primera cadena 5X, 2  $\mu$ l de DTT 0.1 M y 1  $\mu$ l de la mezcla de dNTP 10 mM. Posteriormente la mezcla se agitó suavemente y se incubó a 45 °C por 2 min para equilibrar la temperatura. Finalmente se añadió 1  $\mu$ l (200 U) de la enzima transcriptasa reversa (Superscript II RT), se mezcló suavemente y se incubó a 45 °C durante 1 hr.

## Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se utilizó como templado cDNA, elaborado a partir de RNA total de *E. histolytica* como se describió anteriormente. Los “primers” se diseñaron basados en la secuencia de los GSS encontrados en la búsqueda en línea, como se detallará más adelante (Resultados). La reacción de PCR se realizó en un termociclador Perkin-Elmer (GeneAmp , modelo 2400, MD, EUA). Los reactivos para la reacción de PCR fueron de Invitrogen (Antes Gibco BRL). El

procedimiento general para PCR consistió en agregar, en tubos de reacción para PCR (Perkin Elmer) los siguientes reactivos:

Buffer 10X	5 $\mu$ l
dNTP 10 mM	1 $\mu$ l
Mg Cl <sub>2</sub> 50 mM	1-4 $\mu$ l
Primer sentido 100 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Primer antisentido 100 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Enzima Taq Polimerasa	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	suficiente para volumen final de 50 $\mu$ l

Las condiciones de corrida (temperatura y tiempo), se describen en la figura 10.

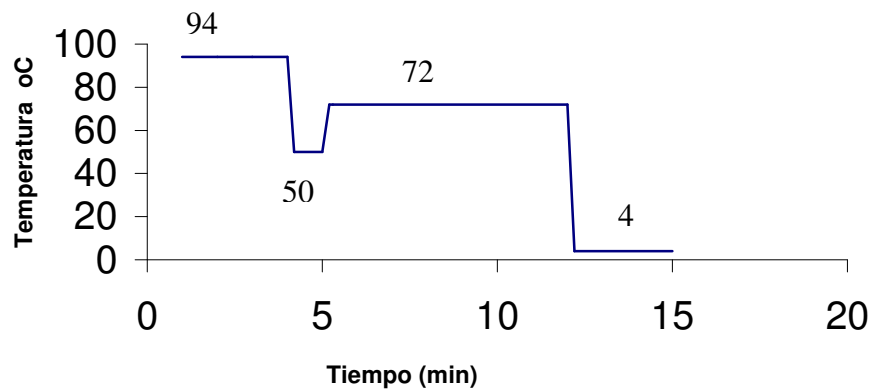


Figura 10. Esquema que muestra las condiciones de temperatura y tiempo usadas en el termociclador para la reacción de PCR. Se programaron 30 ciclos, que iniciaron en 94 °C por 4 minutos, seguido de incubación a 50 °C por 1 minuto y 72 °C por 12 minutos

## RESULTADOS

Expresión de corrientes iónicas en ovocitos tras la inyección de RNAm de *E. histolytica*.

Para saber si el RNA mensajero, obtenido a partir de trofozoitos de *E. histolytica*, contiene secuencias que codifiquen para canales iónicos, utilizamos en este trabajo el sistema de expresión de ovocitos de rana *Xenopus laevis*. Para este fin aislamos el RNA mensajero a partir de trofozoitos de *E. histolytica* en cultivo, en fase logarítmica de crecimiento. A partir de un cultivo de 15 millones de células, obtuvimos rendimientos de 5 µg de RNA m. Los resultados fueron obtenidos a partir de dos lotes de purificación de RNAm, sin embargo no encontramos diferencias notables en los resultados obtenidos con cada lote de RNAm.

A partir de la extracción del RNAm, el procedimiento experimental que se siguió, como se detalla en metodología, consistió en extraer los ovocitos de las ranas, limpiarlos mecánica y enzimáticamente e incubarlos en medio ND96 complementado. Al día siguiente se inyectaron y después de dos o tres días se hicieron los registros. Para el registro de las corrientes iónicas se siguieron los mismos protocolos de estimulación, pero la solución extracelular se cambió alternativamente para reemplazar los iones como el cloro y el potasio, a fin de estudiar la naturaleza iónica de las corrientes expresadas.

En cada ovocito se registraron las corrientes iónicas, inicialmente teniendo como medio extracelular ND96 y posteriormente reemplazándolo por

ND0 (solución en el cual se sustituyó el  $\text{Cl}^-$  por un anión impermeable, compuesta por NaOH 96 mM, KOH 2 mM,  $\text{CaCl}_2$  1.8 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, HEPES 5 mM, pH 7.6 con ácido metanosulfónico).

Inicialmente, para saber si había expresión de corrientes, comparamos los resultados obtenidos de ovocitos inyectados con el RNAm y los de ovocitos no inyectados, o inyectados con agua estéril, que utilizamos en este estudio como control negativo. El protocolo de estimulación consistió en una serie de episodios en los que el potencial de membrana fue llevado, de un valor constante de  $-60$  mV, a cambios de voltaje que inician en  $-80$  mV y se incrementan sucesivamente a intervalos de  $+20$  mV hasta llegar a los  $80$  o  $120$  mV. La corriente registrada en cada episodio de voltaje, se almacenó en archivos de computación, de manera que los resultados obtenidos consisten en series de registros de corrientes, cuya magnitud y cinética dependen de las propiedades de los canales que se encontraban en la membrana de los ovocitos, como son su selectividad y su conductancia.

Al comparar las corrientes iónicas obtenidas en las tres condiciones experimentales descritas, encontramos diferencias como se ilustra en la figura 11. Las corrientes expresadas en los ovocitos no inyectados tuvieron una magnitud que fue desde  $-85$  nA (nanoAmperios;  $1 \times 10^{-9}$  Amperios) cuando la membrana se fijó a  $-100$  mV, hasta un máximo de  $34$  nA, cuando se fijó el potencial en  $+20$  mV, este valor incluso se revirtió hasta alcanzar un mínimo de  $-34$  nA a  $+60$  mV. Los ovocitos inyectados con agua tuvieron valores ligeramente superiores, de  $-256$  nA a  $-100$  mV, hasta  $557$  nA a  $+60$  mV. Las

corrientes obtenidas en ovocitos inyectados con RNAm fueron de un mínimo de -60 nA a -100 mV hasta valores de 1200 nA a +60 mV. De este modo encontramos que la inyección del RNAm de *E. histolytica* en efecto induce la aparición de corrientes iónicas distintas a las endógenas. Dichas corrientes, como se puede apreciar en la figura 11, son corrientes predominantemente positivas, o salientes. En la misma figura comparamos las relaciones corriente-voltaje de las tres condiciones experimentales. Se pueden apreciar las diferencias en magnitud de las corrientes. Las que corresponden a los ovocitos inyectados con RNAm se activan a partir de +20 mV, siguiendo una cinética de activación de una sola constante de tiempo.

El hecho de que sean corrientes positivas podría deberse al influjo de aniones, o bien al eflujo de cationes. De manera que era preciso determinar la naturaleza iónica de dichas corrientes. Para esto cambiamos alternativamente el medio extracelular del ovocito. Partiendo del medio ND96 lo reemplazamos por medio ND0, en el cual reemplazamos el  $\text{Cl}^-$  extracelular por metanosulfonato ( $\text{MetSO}_4^-$ ), un anión que por su tamaño es impermeable a través de canales iónicos. Bajo estas condiciones esperábamos que, si las corrientes iónicas se debían al influjo de  $\text{Cl}^-$ , éstas debieran abatirse en ausencia de este ion, sin embargo, como se muestra en la figura 12, las corrientes no se modificaron, ni en su magnitud ni en su cinética, lo cual nos indica que dichas corrientes se deben al eflujo de cationes, probablemente de  $\text{K}^+$ . Por esta razón quisimos saber si el Tetraetilamonio (TEA) tiene efecto sobre estas corrientes, pues este fármaco es un conocido bloqueador de corrientes de  $\text{K}^+$ . Como se puede

apreciar en la figura 13, la adición de TEA 2 mM al medio extracelular disminuye sólo 7.8% de la corriente a +80 mV, mientras que la adición de 10 mM la decrece 31%. Esto podría sugerir que se trata de canales poco sensibles, o bien que se suma la expresión de dos tipos de canales, unos sensibles al TEA y otros insensibles. Otro bloqueador de canales de  $K^+$  que empleamos es la 4-Aminopiridina (4-AP), sin embargo, como se muestra en la figura 14, la adición de 1.5 mM de 4AP no modificó las corrientes iónicas.

Para estudiar las propiedades de selectividad de dichas corrientes hicimos experimentos en los que sustituimos el  $Na^+$  del medio extracelular por  $K^+$  para saber si esto afectaba el potencial de inversión de las corrientes iónicas. Para lograr una estimación más precisa del potencial de inversión de las corrientes, diseñamos un protocolo de estimulación para registro de corrientes “de cola”. El protocolo consistió en una pre-estimulación a +80 mV por un lapso de 1000 mseg, después de lo cual se cambió súbitamente el potencial de fijación a valores que fueron desde -100 hasta +80 mV con incrementos de 20 mV. Con este protocolo se “preactivan” los canales iónicos y después, con el cambio de voltaje, se puede medir la corriente de cola, al inicio del pulso y después de que se apaga la corriente capacitiva. En la figura 15 se muestra una serie de corrientes de “cola “ obtenidas para un ovocito registrado en medio ND96 y se compara con otra serie de corrientes para el mismo ovocito cuando se cambia el medio extracelular por ND2, en el cual 92 mM de  $Na^+$  han sido reemplazados por  $K^+$ . El propósito de esta sustitución iónica es cambiar el potencial de equilibrio del  $K^+$  a valores cercanos a cero milivoltios. En caso de que las

corrientes iónicas se deban en realidad a la presencia de canales selectivos a  $K^+$ , esperaríamos que el potencial de inversión se desplazara de valores negativos hacia el cero. Al estimar el potencial de inversión de las dos condiciones encontramos que en efecto hubo un desplazamiento del potencial de inversión. En presencia de medio ND96 el potencial de inversión fue de  $-13.59$  mV, mientras que para ND2 fue de  $-10.0$  mV, así hubo un desplazamiento de  $4$  mV, lo cual nos indica que, si bien las corrientes son selectivas a  $K^+$ , su selectividad es muy pobre.



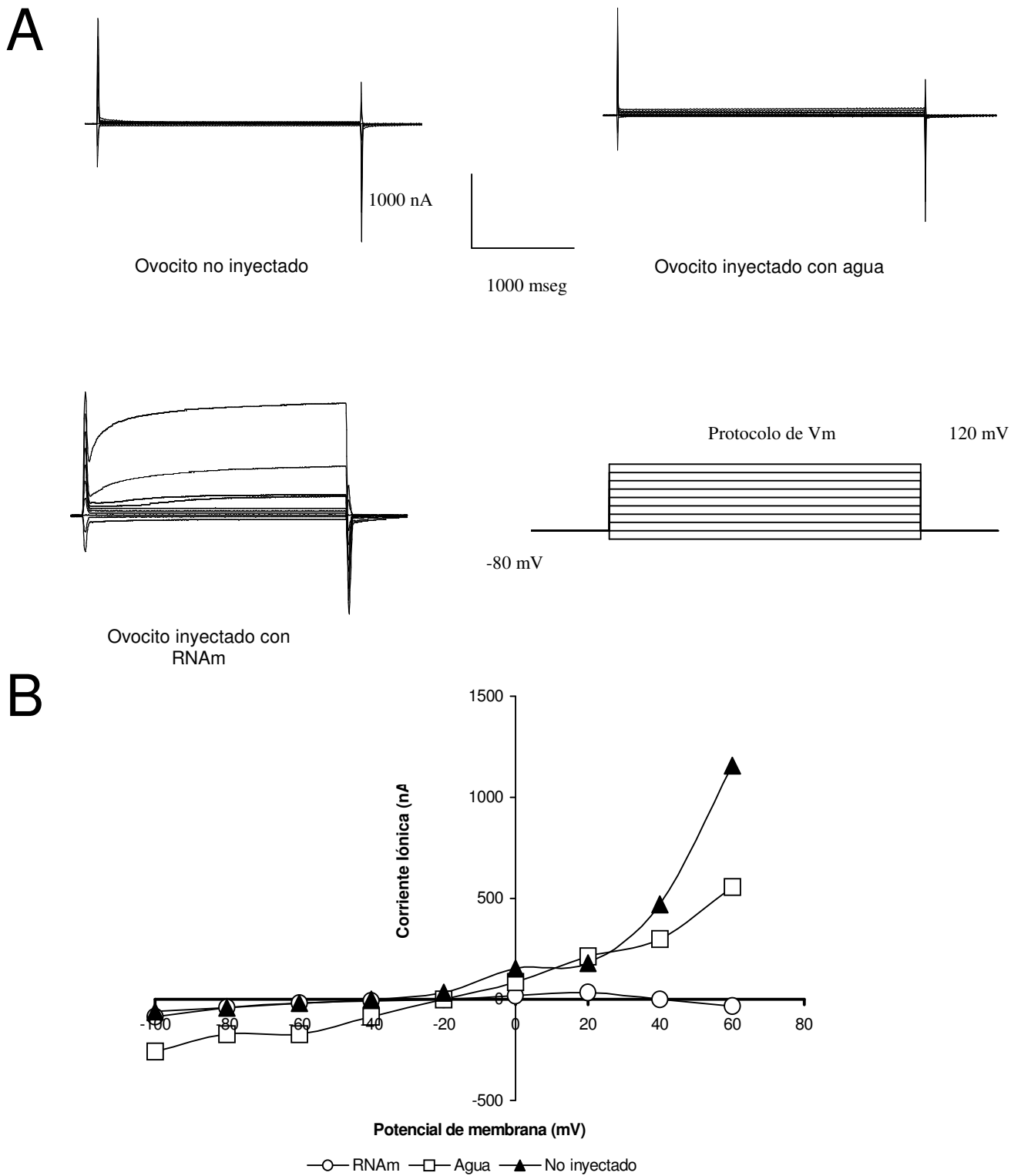


Figura 11. Expresión de corrientes iónicas en ovocitos. **(A)** Ejemplos representativos de corrientes obtenidas de ovocitos no inyectados, inyectados con agua e inyectados con RNAm de *E. histolytica*. Todos con el mismo protocolo de estimulación, que inicia de  $-80$  mV y se incrementa gradualmente, desde  $-100$  mV hasta  $+80$  o  $+120$  mV. **(B)** Gráfica que compara la relación corriente voltaje para cada tipo de registro. La curva I-V se obtiene graficando en las ordenadas la magnitud de la corriente y en las abscisas el voltaje de estimulación, todos a un mismo tiempo después del inicio del pulso. Los triángulos corresponden a ovocitos inyectados con RNAm, los cuadrados a los inyectados con agua DEPC, y los círculos a los no inyectados.

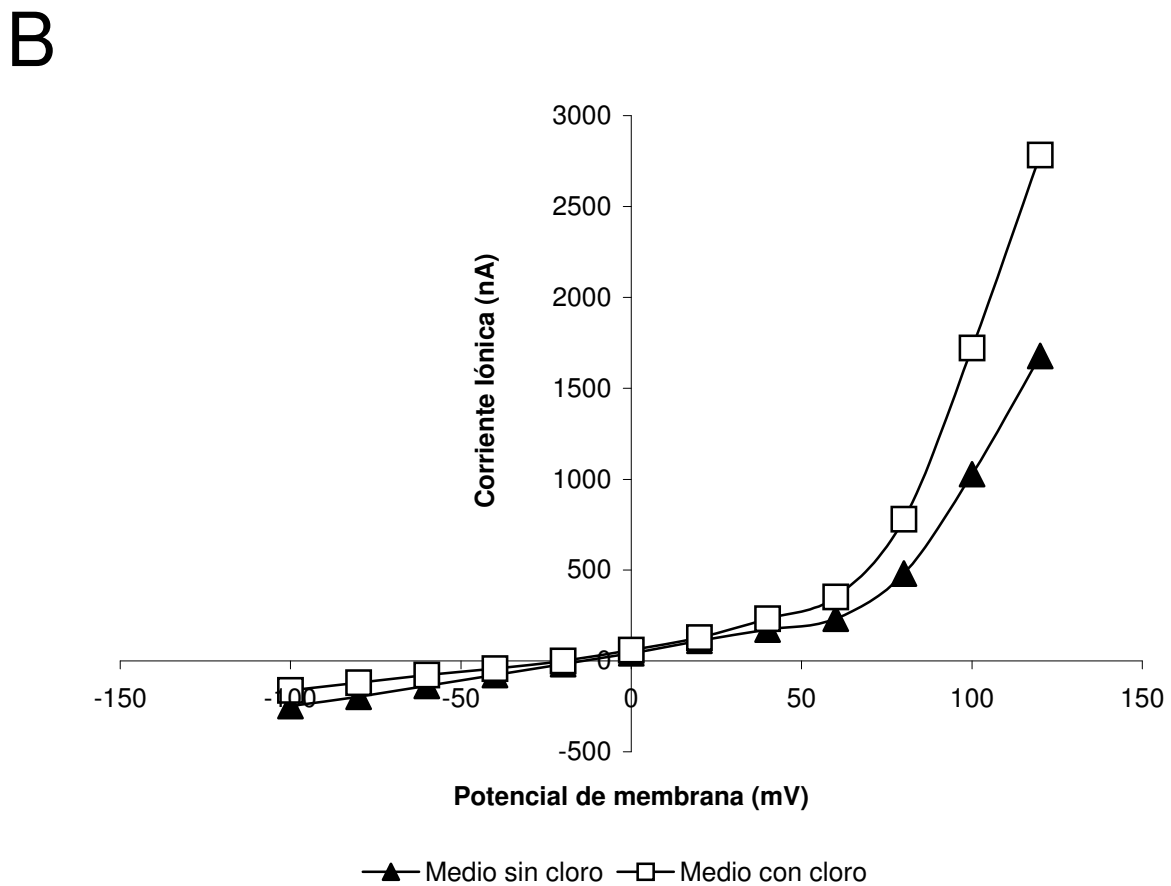
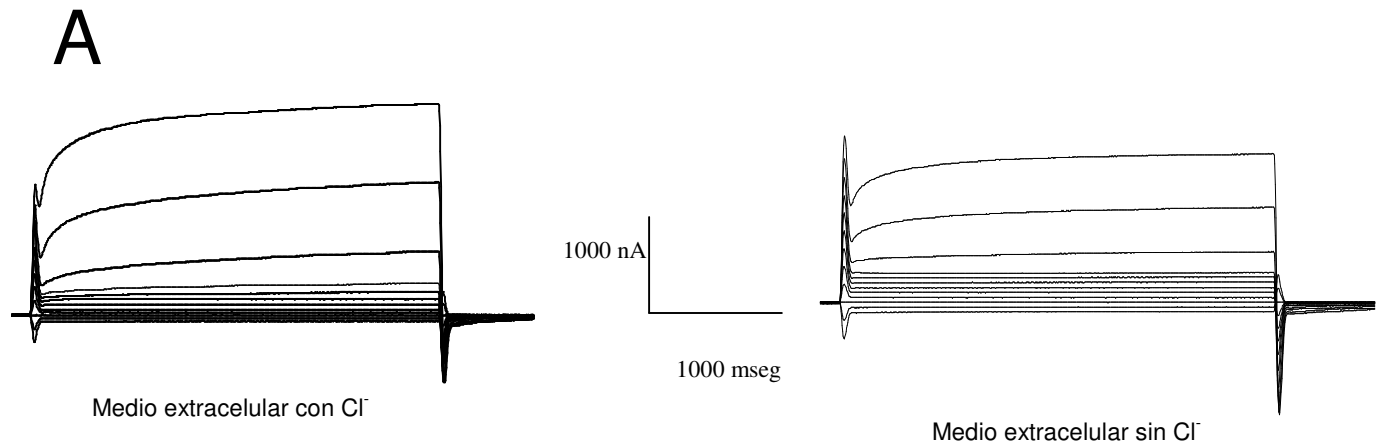
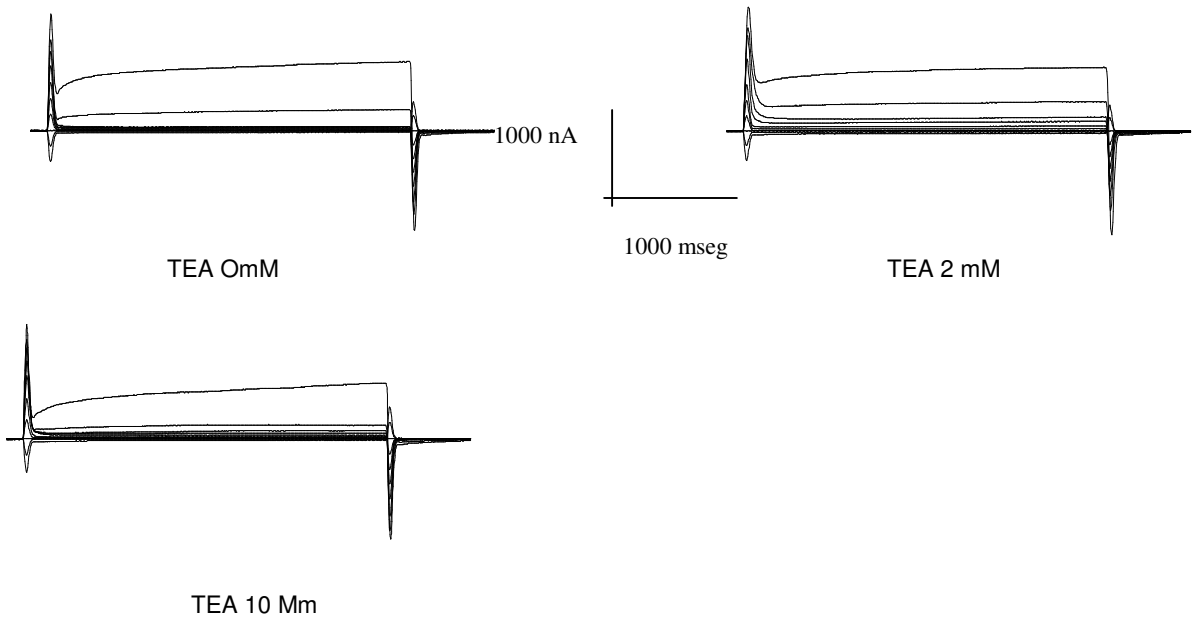


Figura 12. La sustitución de  $\text{Cl}^-$  en el medio extracelular por un anión impermeable (Metanosulfonato) no afecta significativamente, ni la magnitud, ni el potencial de inversión de las corrientes expresadas por la inyección de RNAm. (A) Comparación de corrientes iónicas en un mismo ovocito con un medio extracelular rico en cloro y cuando se sustituye este por un anión impermeable. (B) Relación corriente-voltaje de las dos condiciones experimentales. Los símbolos cuadrados corresponden a los registros del ovocito con  $\text{Cl}^-$  en el medio extracelular y los triángulos cuando el  $\text{Cl}^-$  es sustituido por un anión impermeable.

# A



# B

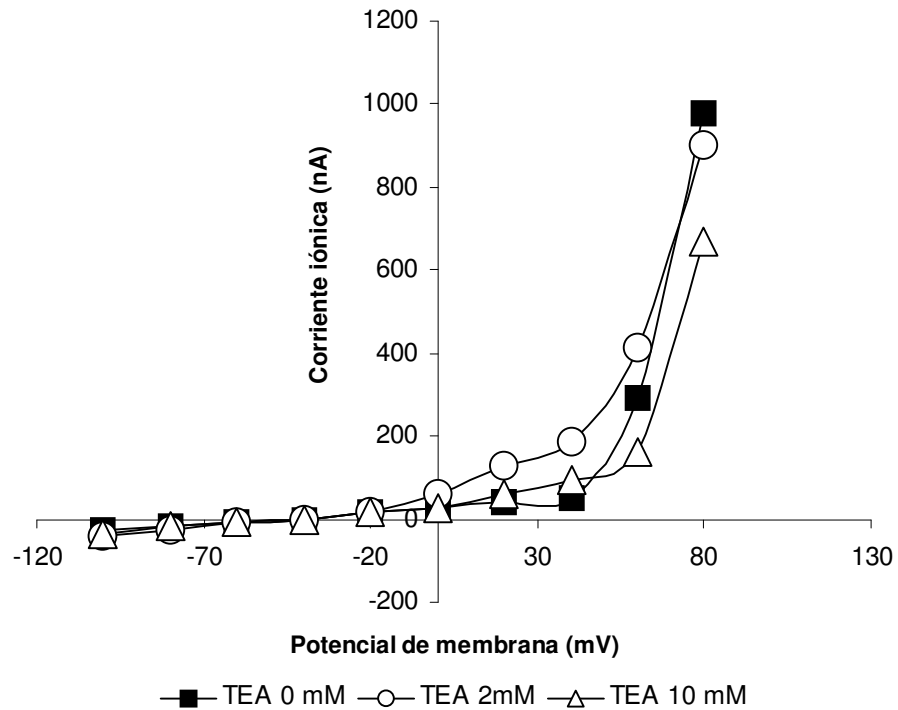


Figura 13. Efecto de TEA sobre las corrientes expresadas. La adición de TEA en el medio extracelular, disminuye parcialmente la magnitud de las corrientes iónicas expresadas. (A) Comparación de series de corrientes iónicas obtenidas en 0, 2 y 10 mM de TEA en el medio extracelular. (B) Relación corriente-voltaje de las tres condiciones experimentales.

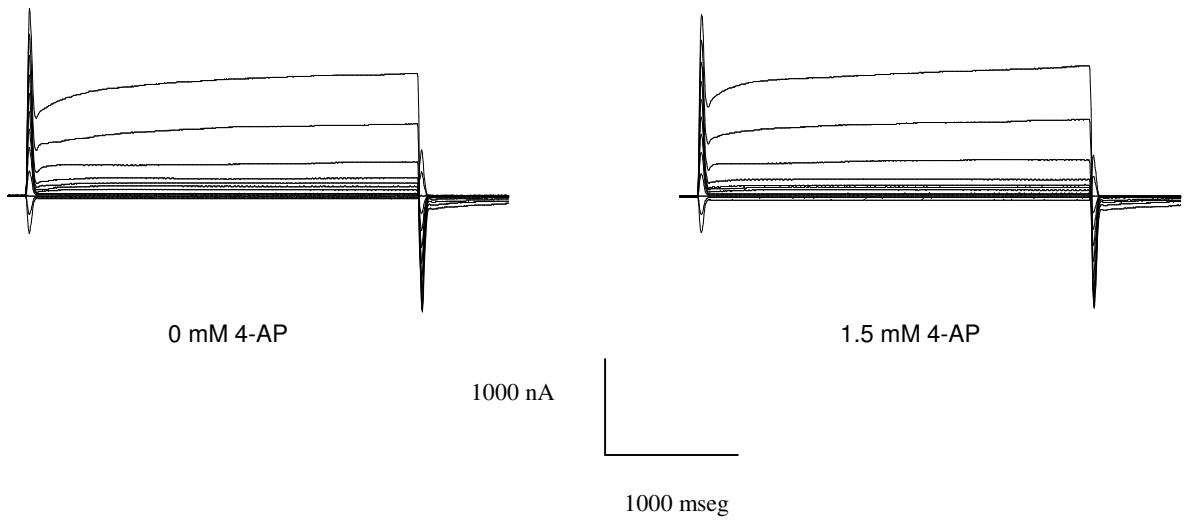
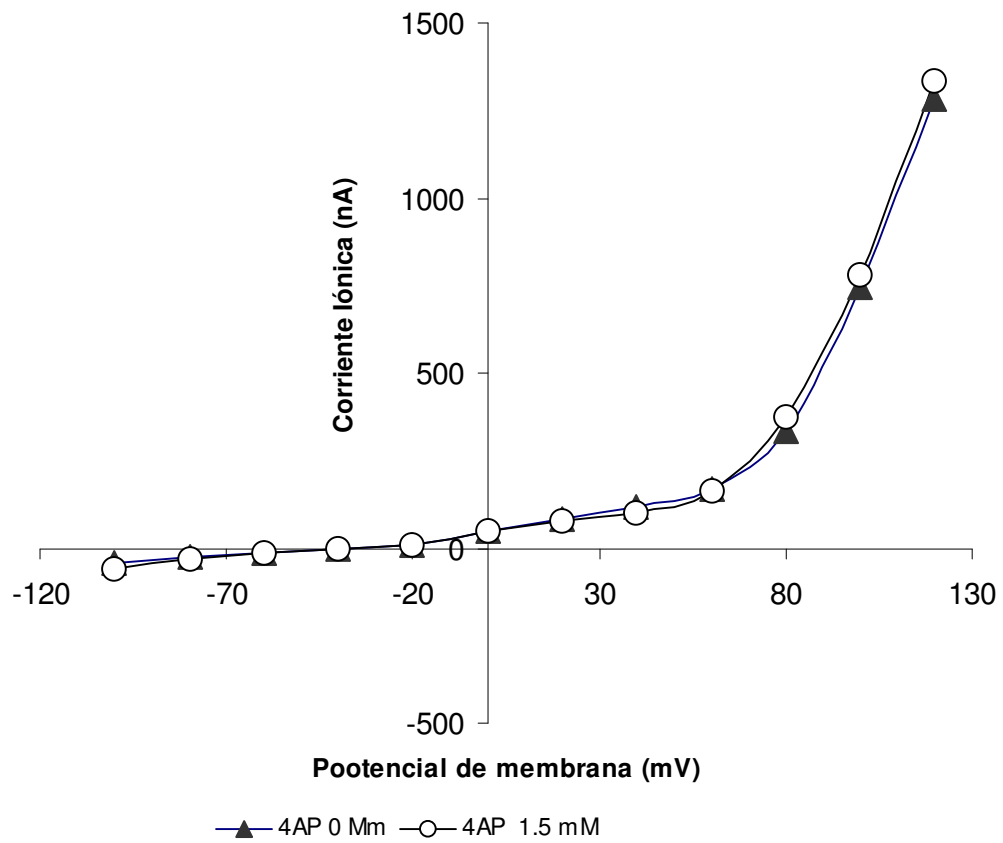
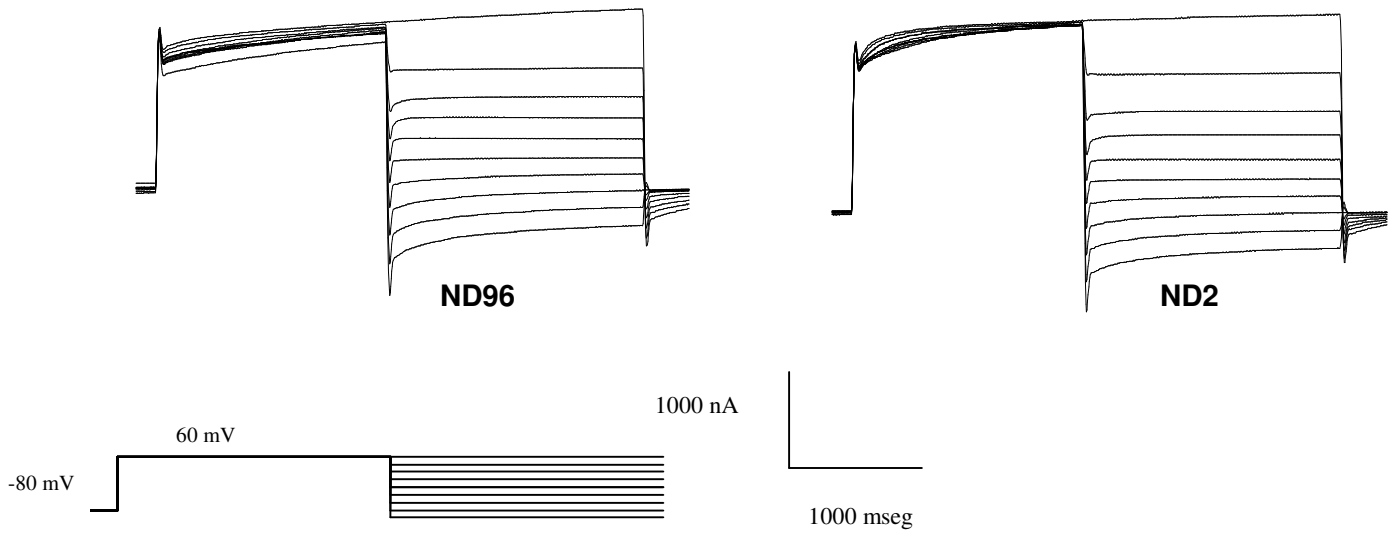
**A****B**

Figura 14. La 4 aminopiridina (4AP), otro bloqueador de canales de  $K^+$ , no produjo ningún efecto sobre la magnitud de corrientes iónicas. (A). Comparación de corrientes en 0 mM y 1.5 mM de 4AP. (B) Relación corriente-voltaje.

A



B

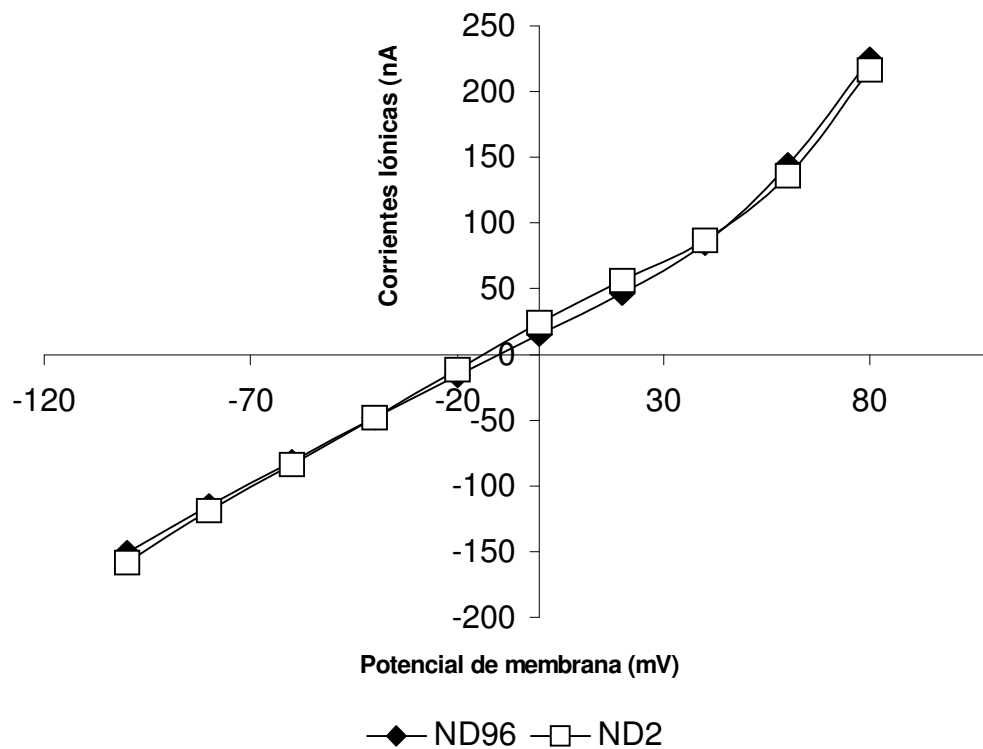


Figura 15. Estudio de selectividad de las corrientes inducidas por RNAm de *E. histolytica*. Se utilizaron protocolos para generar corrientes de "cola", con los cuales se obtuvieron registros como los que se muestran en el panel A. La magnitud de las corrientes se midió, después del prepulso de +80 mV, y justo después de la caída de la corriente capacitiva, para obtener registros de corriente voltaje como se muestran en el panel B. Los círculos llenos corresponden a la condición control (ND96), y los vacíos a la condición en que se reemplazó el  $\text{Na}^+$  del medio extracelular por  $\text{K}^+$ .

Búsqueda “en línea” de secuencias genómicas de *E. histolytica* similares a canales de potasio.

Como se mencionó anteriormente, el segundo objetivo de este trabajo fue utilizar criterios moleculares para saber si existen en *E. histolytica* canales iónicos similares por su secuencia a los ya clonados y secuenciados en otros organismos, principalmente en humano, ratón y rata. Este objetivo se siguió basado en dos circunstancias (1) Existen regiones peptídicas de canales iónicos que se conservan a lo largo de la filogenia, por lo que es probable que, si *E. histolytica* tiene alguno de estos canales, estos tendrán similitud en dichas regiones peptídicas y (2) El genoma de *E. histolytica* se ha clonado parcialmente, fraccionando su DNA genómico en segmentos al azar de entre 0.8 y 2 kilobases, y posteriormente incorporando estos fragmentos en un vector de expresión, ha sido posible describir la secuencia de estos fragmentos. Dicha información se encuentra disponible para su estudio a través de la página del Instituto de Salud de Estados Unidos, o NIH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y es una base de datos que muestra las secuencias de nucleótidos de cada una de los fragmentos secuenciados que se refieren como GSS (Genomic Sequence Survey). En virtud de que la conservación de las regiones de los canales iónicos está dada en los aminoácidos que lo constituyen, es posible encontrar diversas combinaciones de nucleótidos, por lo que hay que considerar todas estas posibles combinaciones y compararlas. Esto se logra a través de un programa de análisis de secuencias de biología molecular (BLAST), que es de acceso

público a través de la página de NIH. Utilizando este procedimiento, primero se seleccionaron los sitios o motivos conservados de canales de potasio dependientes del voltaje. Todos ellos están alrededor de la secuencia de “identidad” de los canales de potasio TVGYG (Doyle et al, 1998), que difieren ligeramente dependiendo de la familia. El motivo H5 de canales tipo *Shaker* (SHFSSIPDAFWVVSMTTVGYGDMYPVTIGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVS NFNY) no arrojó candidatos (Ver tabla II en apéndice). Tampoco el de canales tipo *Shab* (SIPAAFWYTIVTMTTLGYGDMVPSTIAGKI), ni el de canales tipo *Shal* (FGSICSLSGVLVIALPVPVIVSNFSRIYHQN). Sin embargo la secuencia H5 (IPIGFWWAVVTMTTLGYGDMYP) común a canales tipo *Shaw* reveló una secuencia GSS con posible similitud (GSS ENTFN32TR):

```
CATGTGCTGGAAAGGCTTAGTATATTTTTGGGTTGGTGAAAATCAAAAATTATTTTCATATT
GTAGATAAAATATCAAATACTATTGTATTTCTATTGTCTTTACTTTATTTTTCTGCTTCTAT
TTTTCATTTATTAGAAGGATTTAATCCATCAAATAGTTTTTCATCATTTTCATAATTGTTTT
ATTTTTGCGTAGTAACAGTTGTTACAGTTGGATTTGGTGATATGTATCCACAACTAGTCT
TGGAAGAATTTATTGTACATTGTATATATTAGCTTTCTTTTTTATATTTCCAATGAGACTAG
GTCAAATTACTGCTTTAAATCAACGATCACAATCACGATTATTTTATGCTAATAAACA
TGTTCTTTATACTGGTGATTCACATTTACTTCCATATTTTATTCCCTAAAATTAAGAGTGATA
TGGTAGCATTATTACCTAAATTTGATTATCGTGTATTATCAAAAAGAAAATATAAACGTTT
TTTTTATAATGGAGACGCACAAAATGAATTTGATTTACATCAATCTAATTCAGAAAAAGCA
AAACAAGTTATTTTAACATCAGATGGAAATGACCAACTTACTTTTTTTAAGATGTAAAACAT
TATTTCAAATATGTTTCATGTCCAATATTCGTTTATATTAACCACTGATTTATTTAGTGTA
TTTAAACATTAGGAGCAGAAGTATTATGTGAAGAATATGTTAGATTAATGTTAGCTGGT
GAGAATGTGTGTTCCACATTATTTGATGTAATGAGGGTCATTATTTTCAATTAACAC
GCTAAATTCAAATTAATTTATTAAGAAATTTTAAACACCCACATATTTTATTGGGTAAAC
TGGAACAGAAGTTGAAAAAATATTATGAATGAATAAGGATGTGTTATTGTTGGAAATTTT
GTCAGGAGGATAGATTGGATATTTTAATGGTTCAAAACAAT
```

Esta secuencia de nucleótidos, genera la siguiente secuencia de aminoácidos cuando es traducida, utilizando el código estándar, en el marco de lectura +2:

MCWKGLVYFWVGENQKLFHIVDKISNTIVFLLSLLYFSASIFHLLLEGFNPSNSFHFFHNCFYFCVVTVVTVGF  
GDMYPQTSLSGRIYCTLYILAFFIFIPMRLGQIITALNQRSQSRLFYANKHVLYTGDSHLLPYFIPKIKSDMVALL  
PKFDYRVLSKRKYKRFFYNGDAQNEFDLHQSNSEKAKQVILTSDGNDQLTFLRCKTLFQICSCPIFVYIKKPD  
LFSVFKTLGAEVLC EEYVRLMLAGENV CSTLYLM\*\*GSLFSIKTR\*IQINLLRNFKTPTYFYWVNWNRS\*KKYY  
E\*IRMCYCWKFCQEDRLDILMVQNN

Para saber la similitud que tiene esta secuencia de aminoácidos con canales de potasio, se utilizó dicha secuencia como templado para buscar (utilizando el mismo programa de BLAST) a qué proteínas, descritas en la base de datos de SWISS PROT, podría codificar. Como resultado se obtuvieron al menos doscientas secuencias protéicas, las cuales se refieren a canales de potasio dependientes de voltaje. Siendo las más similares las de canales de potasio dependientes de calcio intracelular.

De manera que, es muy probable que esta secuencia de GSS sea parte de un posible canal de potasio dependiente del voltaje y/o del calcio de *E. histolytica*. Sin embargo, como se recordará esta secuencia se obtuvo a partir de la base de datos del genoma de *E. histolytica*. A partir de esta información podremos identificar, aislar y secuenciar el gene completo que codificaría para este posible canal. Para ello es necesario diseñar una sonda que identifique dentro de una librería genómica o de expresión a el o los candidatos, para después poder aislarlo. Para el diseño de la sonda se requiere de ensayos de PCR , basados en la secuencia de DNA de la GSS arriba descrita. De manera que se diseñaron “primers” que pudieran distinguir y amplificar la parte correspondiente al GSS como sigue:



## Diseño de “primers”

Para obtener una sonda que identifique y amplifique la secuencia arriba descrita, se diseñaron los siguientes primers:

Sentido: AATCAACGATCACAATCACGA

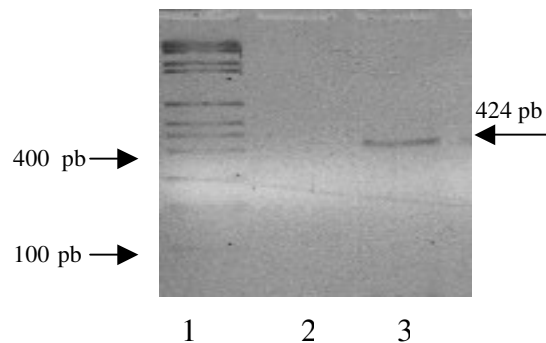
Antisentido: TGGAACACACATTCTCACCCAG

Estos “primers” deben amplificar un segmento de 424 pares de bases (pb) que comprende la zona intermedia de la secuencia GSS ENTFN32TR de 961 pb.

## Producción de la sonda por PCR.

Después de varios ensayos en que se variaron las condiciones de PCR como son la concentración de  $Mg^{2+}$ , la temperatura de alineamiento y la concentración de cDNA, encontramos las condiciones óptimas, con las que pudimos amplificar un segmento de 424 pb, como se esperaba. Figura 16.

Figura 16. El PCR con los “primers” diseñados y usando cDNA de amiba como templado, produce un fragmento de más de 400 pb. En este gel se muestra: En el carril 1 marcador de peso molecular (100 pb ladder, GIBCO) que muestra bandas cada 100 pB. El carril 2 es un control negativo sin cDNA y el 3 muestra el resultado de PCR con los “primers” y cDNA. Se obtiene una banda de poco más de 400 pb.



**Análisis de Restricción Enzimática.** Para confirmar que el segmento amplificado es el esperado, se hizo un análisis de restricción enzimática. Para

saber con qué enzimas debíamos trabajar, ingresamos la secuencia de 424 pb para un análisis en línea de la supercomputadora de la Universidad de San Diego (Molecular Biology Workbench, <http://workbench.sdsc.edu/>) . Por tanto utilizamos Dra I que predice dos fragmentos de 353 y 72 pb y Ssp I, que predice dos fragmentos, de 313 y 112 pb.

La figura 17 muestra que, al incubar el fragmento de PCR separadamente con estas enzimas de restricción se obtienen los fragmentos del tamaño esperado.

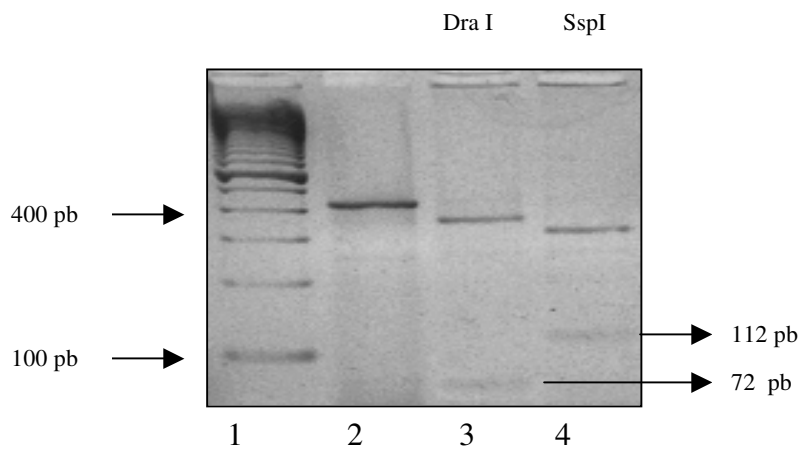


Figura 17. Gel que muestra el Análisis de Restricción Enzimática del fragmento amplificado por PCR. Carril 1 marcador molecular (100 pb ladder), 2 fragmento de PCR sin cortar, 3 fragmento cortado con Dra I, 4 fragmento cortado con Ssp I.

## DISCUSIÓN

*E. histolytica* es un protozoario de gran importancia, no solo por que es considerado un eucarionte primitivo, sino también por el impacto que tiene en la salud pública, particularmente en México. Siendo *E. histolytica* un organismo unicelular, es esperable que tenga una enorme diversidad de canales iónicos, que participen activamente en cualesquiera de sus muchas funciones celulares, como son motilidad, invasividad, regulación de volumen, etc, de manera similar a como se ha descrito para *Paramecium tetraurelia* (Jegla y Salkoff, 1995) o en bacterias (Ruta *et al*, 2003). Los resultados aquí mostrados sugieren que en verdad estos organismos tienen canales iónicos. El hecho de que la inyección de RNA mensajero de *E. histolytica* haya inducido la expresión de corrientes catiónicas en ovocitos favorece esta idea, de manera similar se han hecho estudios en otras especies, como papa (Brandt y Fisahn, 1998) o en testículo de rata (Wu *et al*, 1998), por citar solo algunos ejemplos. Sin embargo, los resultados aquí mostrados deben interpretarse con reservas por las siguientes razones: (1) Como explicamos en antecedentes, en el ovocito de *Xenopus* existen una variedad de corrientes endógenas, de manera que en la expresión de corrientes exógenas, habrá sin duda una mezcla de corrientes endógenas con corrientes exógenas, en algunas ocasiones es difícil discriminar claramente entre ellas, sobre todo cuando la magnitud de las corrientes inducidas no es claramente distinta, ni en magnitud ni en cinética. (2) Se ha demostrado que,

en algunas ocasiones, la inyección de RNAm exógeno induce, mas que la expresión de nuevas corrientes iónicas, la amplificación de corrientes endógenas, por mecanismos no claramente explicados, y que de alguna manera amplifican la magnitud de estas últimas (Tzounopoulos *et al*, 1995). La demostración de las características cinéticas y farmacológicas de una corriente iónica, como en el caso aquí mostrado, podrían llevar eventualmente a la caracterización, y posterior clonación de una especie molecular que da cuenta de estas corrientes, un procedimiento que se conoce como clonación por expresión (Paulmichl *et al*, 1992), y que ha mostrado ser muy útil en una variedad de ejemplos en los que se desconoce enteramente cualquier antecedente molecular de el o los genes que dan cuenta de las corrientes iónicas. Sin embargo, la inyección de RNA mensajero total, es una mezcla de un sin-número de especies moleculares, cada una de las cuales codifica para una especie distinta de proteína, no solamente de canales iónicos, sino de cualquier proteína que la célula utilice, de manera que, como resultado de una inyección de RNAm se puede esperar que las características de las corrientes iónicas revelen, potencialmente la expresión de todo tipo de canales iónicos y, las propiedades cinéticas de dichas corrientes dependerán de la diversidad y de la abundancia de las copias de RNAm que codifiquen para canales iónicos. En el caso de que exista una relativa, enorme abundancia de un tipo de RNAm que codifique para algún tipo en especial de canal iónico, esto se reflejaría por supuesto en una mayor definición de las corrientes iónicas por esta especie de canal. En el caso de que la proporción de canales sea la misma, no

observaríamos una corriente iónica con características especiales, y en este caso tal vez sería más conveniente recurrir a técnicas de disección de corrientes, utilizando bloqueadores específicos, como toxinas, muy selectivas a canales de  $K^+$  o de  $Cl^-$ , aunque esto también dependería de si los canales de *E. histolytica* pudieran ser bloqueables por estas toxinas, que han demostrado ser muy específicas en mamíferos y en anfibios.

De manera que, es probable que las corrientes catiónicas no selectivas observadas en este estudio sean (1) Una mezcla indistinta de corrientes selectivas a distintos iones, lo cual hablaría de una enorme diversidad de canales iónicos en las amibas o (2) En realidad se trata de corrientes catiónicas no selectivas, resultado de la expresión de una especie molecular muy abundante, con estas características en *E. histolytica*. Esto podría bien ser la expresión de un tipo particular de proteína, que las amibas tienen como mecanismo de patogenicidad, y que utilizan para afectar a sus células “blanco”, se trata de el así denominado ameboporo, que ha sido caracterizado en preparaciones de bicapas lipídicas, con proteína de membrana reconstituida a partir de *E. histolytica* (Rosenberg *et al.*, 1989). Si bien, el ameboporo no es propiamente un canal iónico, al no tener ninguna selectividad, produce en las células blanco, que su potencial de membrana decaiga bruscamente, lo que lleva a la muerte de estas células (Gitler *et al.*, 1984). En este sentido es importante notar que, en caso de que se tratara de la sobre-expresión de ameboporos en los ovocitos, esto les habría ocasionado una importante

despolarización, caso que no se observó, pues los ovocitos que registramos, tuvieron potenciales de membrana de alrededor de  $-30$  mV.

Por otro lado, en este trabajo también se identificó una secuencia del genoma parcialmente caracterizado de *E. histolytica* que es similar a la secuencia H5, que constituye el poro de selectividad de los canales de potasio dependientes del voltaje. Se trata de la secuencia GSS ENTFN32TR, que consiste en 961 pb. A pesar de que se utilizó como criterio la región H5 de canales de potasio tipo *Shaw*, al hacer una comparación múltiple de la secuencia peptídica traducida (GSS ENTFN32TR) con la base de datos de proteínas, se encontró que esta secuencia tiene mayor similitud con canales de potasio dependientes de calcio intracelular que con canales de potasio dependientes del voltaje. Las secuencias de proteínas con mayor similitud fueron las siguientes:

1. Canal de potasio activado por calcio de gran conductancia [*Homo sapiens*] AAA85104.1 [U13913]
2. Canal de potasio activado por calcio de conductancia grande [*Homo sapiens*] NP\_002238.2 [NM\_002247]
3. (Q9BG98) Sub-unidad alfa de canal de potasio activado por calcio [*Oryctolagus cuniculus* (Conejo)]
4. Canal de potasio activado por calcio de ratón,
5. Canal de potasio activado por calcio mSlo - ratón
6. (Q9WUI3) Canal de potasio activado por calcio de gran conductancia [*Rattus norvegicus* (Rata)]
7. Canal de potasio activado por calcio de gran conductancia [*Rattus norvegicus*] NP\_114016.1 [NM\_031828]
8. LD16342p [*Drosophila melanogaster*] AAO45232.1 [BT004876]
9. Canal de potasio activado por calcio de gran conductancia [*Rattus norvegicus*] AAA99161.1 [U55995]
10. *Periplaneta americana* Canal de potasio activado por calcio de gran conductancia pSlo spliceform 1-5A (pslo) mRNA.

El estudio de comparación múltiple que se realizó muestra, que el sitio que mayor similitud tiene el posible canal de potasio de *E. histolytica* con otros canales de potasio es el que determina la selectividad del poro, con la siguiente secuencia:

FHNCFYFCVVTVV**TVGFG**DMYPQTSLGRIYCTLYILAFFF

El sitio marcado en negritas en la secuencia anterior es muy similar a la denominada secuencia de identidad, que identifica inequívocamente un canal selectivo a potasio (Doyle *et al*, 1998). Este sitio, sin embargo, en la gran mayoría de los canales de potasio es TVGYG dado que la tirosina (Y) constituye el sitio crucial de selectividad por potasio. Sin embargo, en algunos canales de potasio dependientes de calcio la tirosina está cambiada por una fenilalanina (F) (Jiang *et al*, 2002).

Como se mostró en la parte de Resultados, en este trabajo se diseñó un juego de “primers” con el que mediante PCR se pudo amplificar una secuencia que, por análisis de restricción enzimática, se piensa que se trata de la secuencia descrita por el GSS. Esta secuencia de DNA amplificada servirá como sonda en un trabajo posterior para identificar, aislar y clonar el gene completo del posible canal de potasio en amiba (*Keh*) por técnicas de DNA recombinante. Esta misma estrategia es usada actualmente para clonar otros tipos de canales iónicos de *E. histolytica*, y actualmente se tiene identificado un gene de este organismo muy similar a canales iónicos selectivos a cloro y dependientes de voltaje (EhCIC).

En una exploración posterior, más detallada, ya sea de tipo molecular, o electrofisiológica, seguramente encontraremos canales iónicos, algunos con propiedades similares a los descritos en otros organismos, pero también es probable que, dada la posición evolutiva de las amibas, y que se trata de un organismo unicelular, encontraremos canales completamente novedosos, que podrían llevarnos a entender mejor el papel que desempeñan en el contexto general de la biología celular, así como a entender un poco más de la compleja fisiología celular y molecular de este protozooario parásito.



## CONCLUSIONES

- 1) La inyección de RNAm de *E. histolytica* en ovocitos de rana *Xenopus laevis*, en realidad induce la aparición de corrientes iónicas, que se distinguen de las endógenas por su cinética, magnitud y potencial de inversión.
- 2) El análisis de dichas corrientes sugiere que se trata de corrientes catiónicas no selectivas, debido a que no disminuyen cuando se reemplaza el Cl<sup>-</sup> del medio extracelular, ni cambian apreciablemente su potencial de inversión cuando el Na<sup>+</sup> extracelular es reemplazado por K<sup>+</sup>.
- 3) Existe sin embargo una proporción de corrientes que son inhibidas por TEA, lo cual sugiere que también hay expresión de canales de K<sup>+</sup>.
- 4) Haciendo análisis en línea de secuencias genómicas parciales de *E. histolytica* hemos encontrado una secuencia que, muy probablemente codifica para un canal de K<sup>+</sup>, ya sea dependiente de Ca<sup>2+</sup> intracelular o dependiente de voltaje similar a los de *Drosophila*.
- 5) La sonda amplificada por PCR a partir de cDNA nos confirma que en verdad dicha secuencia existe en *E. histolytica* y, muy probablemente es la secuencia esperada debido a que: (a) tiene el tamaño molecular esperado de 424 pb y (b) la restricción enzimática con Dra I y Ssp I libera los fragmentos del tamaño esperado, aunque esta conclusión tendrá que confirmarse definitivamente al secuenciar dicho fragmento.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aidley DA. The Physiology of Excitable Cells. Cambridge. University Press, 1983.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4a ed. Garland Science Pub. 2002.
- Anderson PA, Greenberg RM. Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2001; 129:17-28.
- Arellano RO, Woodward RM, Miledi R. Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Ion Channels.* 1996;4:203-59
- Brandt S, Fisahn J. Identification of a K<sup>+</sup> channel from potato leaves by functional expression in *Xenopus* oocytes. *Plant Cell Physiol.* 1998;39(6):600-6.
- Cantellano M, Martínez-Palomo A. Recent developments in amoebiasis research. *Curr Opin Infect Dis.* 2000 ;13:451-456.
- Cavalier-Smith T. Archamoebae: the ancestral eukaryotes? *Biosystems.* 1991;25:25-38.
- Cereijido M, Contreras G, Shoshani L, Ponce A. La membrana celular. En *Biología Celular y Molecular.* Prentice Hall. México. 2003.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 ;162:156-9.
- Chung SH, Kuyucak S. Recent advances in ion channel research. *Biochim Biophys Acta.* 2002 ;1565:267-86.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B. Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 868:233-85.
- Conde-Bonfil MC, de la Mora-Zerpa C. *Entamoeba histolytica*, a standing threat. *Salud Publica Mex.* 1992 34: 335-41.

Corliss JO. The kingdom Protista and its 45 phyla. *Biosystems*. 1984;17:87-126.

Covarrubias M, Wei AA, Salkoff L. Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K<sup>+</sup> current systems. *Neuron*. 1991; 7:763-73.

Delgadillo DM, Gomez C, Perez DG, Paz F, Ponce A, Bañuelos C, Mendoza L, Orozco E. Expression of *Entamoeba histolytica* EhPgp5 gene in *Xenopus laevis* oocytes. *Arch Med Res* 2000; 31:S285-7.

Devuyst O, Guggino WB. Chloride channels in the kidney: lessons learned from knockout animals. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002; 283:F1176-91

Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*. 1998; 280:69-77.

Dolmetsch R. Excitation-transcription coupling: signaling by ion channels to the nucleus. *Sci STKE*. 2003; 21:PE4.

Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a Cl<sup>-</sup> chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*. 2002; 415:287-94.

Egee S, Lapaix F, Decherf G, Staines HM, Ellory JC, Doerig C, Thomas SL. A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Physiol*. 2002; 542:795-801.

Eichinger D. Encystation of *Entamoeba* parasites. *Bioessays*. 1997; 19:633-9.

Espinosa-Cantellano M, Martinez-Palomo A. Recent developments in amoebiasis research. *Curr Opin Infect Dis*. 2000; 13:451-456.

Forero ME, Marin M, Corrales A, Llano I, Moreno H, Camacho M. *Leishmania amazonensis* infection induces changes in the electrophysiological properties of macrophage-like cells. *J Membr Biol* 1999; 15;170:173-80.

Ganetzky B. Genetic analysis of ion channel dysfunction in *Drosophila*. *Kidney Int*. 2000; 57:766-71.

Gitler C, Calef E, Rosenberg I. Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1984 Nov 13;307:73-85

Goldin AL. Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. Methods Enzymol. 1992;207:266-79.

Goldin AL. Evolution of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. J Exp Biol. 2002; 205:575-84.

González-Robles A, Martínez-Palomo A. Morphology of trophozoites of *Entamoeba histolytica* on natural substrates. Study using scanning electron microscopy. Arch Invest Med (Mex). 1982;13 Suppl 3:145-57

Gschwentner M, Furst J, Ritter M, Bazzini C, Woll E, Dienstl A, Jakab M, König M, Scandella E, Rudzki J, Botta G, Meyer G, Lang F, Deetjen P, Paulmichl M. ICl<sub>in</sub>, an ion channel-forming protein associated with cell volume regulation. Exp Physiol. 1999; 84:1023-31.

Hediger MA. Membrane permeability. The diversity of transmembrane transport processes. Curr Opin Cell Biol. 1997; 9:543-6.

Hille B. Ion channel of excitable membranes. 2a ed. Sinauer. Sunderland.1992.

Hodgkin, AL and Huxley, AF. A Quantitative Description of Membrane Current and its Application to Conduction and Excitation in Nerve. Journal of Physiology.1952; 117: 500-544.

Huber SM, Uhlemann AC, Gamper NL, Duranton C, Kremsner PG, Lang F. Plasmodium falciparum activates endogenous Cl<sup>-</sup> channels of human erythrocytes by membrane oxidation. EMBO J. 2002; 21:22-30.

Jegla T, Salkoff L. A multigene family of novel K<sup>+</sup> channels from Paramecium tetraurelia. Receptors Channels. 1995;3:51-60.

Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. Physiol Rev. 2002; 82:503-68.

Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. Nature. 2002; 417:515-22.

Katz DE, Taylor DN. Parasitic infections of the gastrointestinal tract. Gastroenterol Clin North Am 2001; 30:797-815,

Katz, B. Nerve Muscle and Synapse. Mc Graw-Hill. 1966. NewYork.

Klein I, Sarkadi B, Varadi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1461:237-62.

Li HL, Sui HX, Ghanshani S, Lee S, Walian PJ, Wu CL, Chandy KG, Jap BK. Two-dimensional crystallization and projection structure of KcsA potassium channel. *J Mol Biol*. 1998; 282(2):211-6.

López-González I, Olamendi-Portugal T, De La Vega-Beltran JL, Van der Walt J, Dyason K, Possani LD, Felix R, Darszon A. Scorpion toxins that block T-type Ca(2+) channels in spermatogenic cells inhibit the sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;300:408-14.

López-Vancell R, Montfort I, Pérez-Tamayo R. Galactose-specific adhesin and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* 2000;86:226-31.

Martínez-Palomo A. Amibiasis. Médica Panamericana. 1989. México

Miledi R, Parker I. Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. *J Physiol*. 1984; 357:173-83.

Morin XK, Bond TD, Loo TW, Clarke DM, Bear CE. Morin XK, Bond TD, Loo TW, Clarke DM, Bear CE. Failure of P-glycoprotein (MDR1) expressed in *Xenopus* oocytes to produce swelling-activated chloride channel activity. *J Physiol*. 1995;486 ( Pt 3):707-14.

Neher E, Sakmann B, Steinbach JH. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch*. 1978 18;375(2):219-28.

Noda M, Ikeda T, Suzuki H, Takeshima H, Takahashi T, Kuno M, Numa S. Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. *Nature*. 1986; 3;322(6082):826-8.

Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Timpe LC, Jan LY. Ion channels in *Drosophila*. *Annu Rev Physiol*. 1988; 50:379-94.

Parker, SP. Synopsis and Classification of Living Organisms, McGraw-Hill, 1982. New York.

Paulmichl M, Li Y, Wickman K, Ackerman M, Peralta E, Clapham D. New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature*. 1992;356:238-41.

Ponce A, Cereijido M. Canales iónicos y enfermedad: bases moleculares. Genética y biomedicina molecular. Colección textos politécnicos 2000. Limusa. Pp 241-243. México.

Preston RR, Saimi Y, Kung C. Calcium current activated upon hyperpolarization of *Paramecium tetraurelia*. J Gen Physiol 1992;100(2):233-51.

Ravdin JI, Sperelakis N, Guerrant RL. Effect of ion channel inhibitors on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. J Infect Dis 1982;146:335-40

Rosenberg I, Bach D, Loew LM, Gitler C. Isolation, characterization and partial purification of a transferable membrane channel (amoebapore) produced by *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol. 1989 Mar 15;33(3):237-47.

Romero MF, Kanai Y, Gunshin H, Hediger MA. Expression cloning using *Xenopus laevis* oocytes. Methods Enzymol. 1998;296:17-52.

Ruta V, Jiang Y, Lee A, Chen J, MacKinnon R. Functional analysis of an archaebacterial voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. Nature. 2003 13;422:180-5.

Saimi Y, Ling KY. *Paramecium* Na<sup>+</sup> channels activated by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin: calmodulin is the Ca<sup>2+</sup> sensor in the channel gating mechanism. J Membr Biol 1995;144:257-65.

Sambrook J, Russell DW, Sambrook J. 2002. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3a Ed. Cold Spring Harbor Press.

Seydel U, Scheel O, Muller M, Brandenburg K, Blunck RA. K<sup>+</sup> channel is involved in LPS signaling. J Endotoxin Res. 2001;7:243-7.

Shih TM, Smith RD, Toro L, Goldin AL High-level expression and detection of ion channels in *Xenopus* oocytes. Methods Enzymol. 1998;293:529-56.

Stuhmer W. Electrophysiologic recordings from *Xenopus* oocytes. Methods Enzymol. 1998;293:280-300.

Terlau H, Stuhmer W. Structure and function of voltage-gated ion channels. Naturwissenschaften. 1998; 85:437-44.

Tzounopoulos T, Maylie J, Adelman JP. Induction of endogenous channels by high levels of heterologous membrane proteins in *Xenopus* oocytes. Biophys J. 1995;69:904-8.

Valenzuela SM, Mazzanti M, Tonini R, Qiu MR, Warton K, Musgrove EA, Campbell TJ, Breit SN. The nuclear chloride ion channel NCC27 is involved in regulation of the cell cycle. *J Physiol.* 2000; 15;529 Pt 3:541-52.

Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Broer S. The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem.* 2000;10:1-12

Wu WL, So SC, Sun YP, Zhou TS, Yu Y, Chung YW, Wang XF, Bao YD, Yan YC, Chan HC. Functional expression of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in *Xenopus* oocytes injected with RNAs from the rat testis. *Biochim Biophys Acta.* 1998 ;1373:360-5.

Zheng YJ, Furukawa T, Ogura T, Tajimi K, Inagaki N. M phase-specific expression and phosphorylation-dependent ubiquitination of the ClC-2 channel. *J Biol Chem.* 2002; 277:32268-73.

## APÉNDICE

Símbolo	3-letras	Significado	Codones
A	Ala	Alanina	GCT,GCC,GCA,GCG
B	Asp,Asn	Aspartico, Asparagina	GAT,GAC,AAT,AAC
C	Cys	Cisteina	TGT,TGC
D	Asp	Aspartico	GAT,GAC
E	Glu	Glutamico	GAA,GAG
F	Phe	Fenilalanina	TTT,TTC
G	Gly	Glicina	GGT,GGC,GGA,GGG
H	His	Histidina	CAT,CAC
I	Ile	Isoleucina	ATT,ATC,ATA
K	Lys	Lisina	AAA,AAG
L	Leu	Leucina	TTG,TTA,CTT,CTC,CTA,CTG
M	Met	Metionina	ATG
N	Asn	Asparagina	AAT,AAC
P	Pro	Prolina	CCT,CCC,CCA,CCG
Q	Gln	Glutamina	CAA,CAG
R	Arg	Arginina	CGT,CGC,CGA,CGG,AGA,AGG
S	Ser	Serina	TCT,TCC,TCA,TCG,AGT,AGC
T	Thr	Treonina	ACT,ACC,ACA,ACG
V	Val	Valina	GTT,GTC,GTA,GTG
W	Trp	Triptofano	TGG
X	Xxx	Desconocido	
Y	Tyr	Tirosina	TAT, TAC
Z	Glu,Gln	Glutamico	

Tabla II. Tabla de aminoácidos. Tomada de <http://www.microbiology.adelaide.edu.au/learn/tables.htm>