



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

“ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN DE LA ENZIMA GLUCOSAMINA 6-
FOSFATO ISOMERASA DE
Entamoeba histolytica Y SU PARTICIPACIÓN EN EL ENQUISTAMIENTO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIOL. JOSÉ HUGO AGUILAR DÍAZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ

MEXICO, D.F. OCTUBRE 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo se realizó mediante el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Comité Tutorial

Dr. Julio César Carrero Sánchez

Dra. Gloria Bertha Vega Robledo

Dr. Pedro Ulises Ostoa Saloma

DEDICATORIA

A los que me dieron la vida y son mis mayor ejemplo a seguir en esta vida... con cariño, amor y respeto, a mis amados Padres Josecito y Lolita, gracias por todo su apoyo y por hacer de mi un hombre de bien, pero sobre todo por todo su amor!

A mis hermanas, Alma, Isabel y Mayra, nunca lo hubiera logrado sin su apoyo y sin su amor, nunca olviden que siempre vere por ustedes, gracias! las amo!!!!!!

A mis sobrinas, Marijose y Tonanzin, por plasmar todo el amor, la inocencia en una sonrisa y por ser la felicidad de toda la familia, la amo!

A Lore (Gusanita), por fin! gracias por todo tu apoyo, por tus desvelos, por tu paciencia, por tu dedicación, por tu bondad, por tu respeto, por tu cariño, por cuidarme y procurarme en cada momento, por enseñarme que todavía existen personas que realmente aman con todo el poder!, pero sobre todo gracias por estar conmigo y compartir risas, lagrimas, felicidad, esta meta también es tuya! Te amo!!!!

A Angel Vera por todo tu apoyo y por velar por mi hermana y mis sobrinas.

A los del Club, Piolo, Engendro, Lorein, Julia, Panda a pesar de todo la banda sigue!!!, UP THE IRONS!!!!, al Piolo pa que no empiece de nena, Te quiero ca., Engendro, hermano menor va por ti!!, Lorein, hermano, ahí vamos!!!!

A la banda de Ciencias, mi carnalita Chela va por ti hasta Inglaterra!, Luis, Denise, Armando, Mau, el Chino, gracias por todo el tiempo compartido!

A mi compa Fercho, gracias por todos tus consejos, tu apoyo pero sobre todo tu amistad, para toda la vida.

A mi hermano Roberto (Huevo), por que a pesar de la distancia siempre seremos los mismos.

A los del Tae, mis brothers Alfonso y César, por siempre estar a mi lado en todo momento alentándome, han sido mis mejores coaches en la vida!!!, a la distancia el George!!!!

A las chicas del Tae Nancy, Brissa, Wendy, Miriam, Liliana, gracias por todas las fiestas y el reencuentro!.

Al mi Bro Evelin, a Norm (la Paloma) a mi Compa Chava y Charlie a Ethel, gracias por alegrar mi vida.

Al Shack y adriancito, por todo su apoyo y los partidos de fut!!!

A Julio Carrero (Joules) gracias por apoyarme y comprenderme, por soportarme pero sobre y todo, gracias por tu amistad! por que antes de mi tutor eres mi amigo!.

A los del Lab María, Claudia, Paty, Prima, Dany, Leo, Julio, Juan Pedro, por todo el apoyo brindado.

Y o todos aquellos que siempre han sido parte importante de mi vida!!!, ahora si que como Soda..... "Gracias totales!!!!"

“SERÉ LO QUE DEBA SER O NADA SERÉ.....”

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Julio César Carrero Sánchez por su excelente dirección para la realización de este proyecto, pero sobre todo por permitirme ser su amigo.

Al Dr. Juan Pedro Laclette, por su apoyo, por todos sus consejos, por su amistad y por permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

A los miembros de Comité Tutorial Dra. Gloria Vega y Dr. Pedro Ostoa, por guiarme, aconsejarme y por todo el apoyo recibido.

A la Dra. Norma Moreno, por todo su apoyo y dedicación en este proyecto.

A la Dra. Esther Ramírez, por su apoyo, dedicación y paciencia, pero sobre todo por su amistad.

A la Biól. Yolanda Ornelas por toda su dedicación, apoyo y paciencia.

Al Dr. Guillermo Pérez y a la Dra. Consuelo Gómez por su gran apoyo, consejos y por abrirme las puertas de su laboratorio

A la M en C Patricia de la Torre por todo su apoyo en este proyecto.

Al Dr. Calcagno y Dra. Laura, por todos sus consejos y apoyo.

Al Biól. Mario Néquiz por su gran amistad y todas las facilidades otorgadas.

A la Dra. Olivia Medel por todo su apoyo y su amistad.

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

Al Dr. Facundo Reynero, por todas las facilidades brindadas.

Y a todos aquellos que fueron parte de este proyecto, mil gracias!!!

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	
1. Antecedentes históricos.....	4
2. Amibiasis.....	8
3. <i>Entamoeba histolytica</i>	8
3.1 Morfología.....	9
3.1.1 Trofozoito.....	9
3.1.2 Quiste.....	11
4. Ciclo de vida.....	14
5. Ubicación taxonómica.....	16
6. Epidemiología.....	16
7. Patología.....	17
7.1 Amibiasis Intestinal.....	20
7.2 Absceso hepático amibiano.....	21
7.3 Factores asociados a la virulencia amibiana.....	23
8. Enquistamiento.....	24
9. Factores asociados al enquistamiento en <i>Entamoeba histolytica</i>	26
10. Enquistamiento <i>in vitro</i> de <i>E. histolytica</i>	27
11. Enquistamiento en otros protozoarios intestinales.....	28
12. Glucosamina-6-fosfato isomerasa.....	30
13. Estrés oxidativo.....	33

II. JUSTIFICACIÓN.....	35
III. HIPÓTESIS.....	36
IV. OBJETIVOS.....	37
V. MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Cultivo de <i>E. histolytica</i>	38
2. Ensayos para inducir el enquistamiento <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	38
3. Tinción con calcoflúor blanco y análisis de fluorescencia.....	39
4. Análisis de viabilidad con diacetato de fluoresceína (FDA)	40
5. Ensayos de ELISA con aglutinina de gérmen de trigo (AGT)	40
6. Ensayos de infección en ratones C3H/HeJ.....	41
7. Extracción de ácidos nucleicos.....	42
8. Diseño de primers y amplificación del gen y promotor de la Gln6Pi..	42
9. RT-PCR.....	43
10. Clonación de fragmentos del promotor.....	44
11. Secuenciación.....	44
12. Alineamiento y análisis estructural del promotor.....	45
13. Ensayos de actividad de la clorafenicol-acetil-transferasa (CAT)	45
14. Microscopia electrónica de transmisión.....	46
15. Microscopia electrónica de barrido.....	47
VI. RESULTADOS	
1. Ensayos para inducir el enquistamiento <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	48
2. Tinción con calcoflúor blanco y análisis de fluorescencia.....	52
3. Ensayos de ELISA con aglutinina de gérmen de trigo (AGT)	53

4. Ensayos de viabilidad con diacetato de fluoresceína (FDA)	54
5. Ensayos de infección en ratones C3H/HeJ.....	56
6. Amplificación del gen y promotor de la Gln6Pi.....	56
7. RT-PCR de la Gln6Pi en trofozoítos tratados y no tratados.....	58
8. Alineamiento y análisis estructural del promotor.....	60
9. Ensayos con el gen reportero.....	61
10. Microscopia de luz y electrónica de transmisión.....	63
11. Microscopia electrónica de barrido.....	64

VII. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

1. Discusión.....	65
2. Conclusiones.....	74

VIII. BIBLIOGRAFÍA.....

76

RESUMEN

Entamoeba histolytica, protozooario causante de la amibiasis en humanos, posee dos estadios en su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste. La forma infectiva, el quiste, es una estructura tetranucleada formada por una cubierta de quitina que le confiere resistencia a condiciones adversas. Los estudios sobre el quiste se han centrado en su obtención *in vitro*; sin embargo, no se ha descrito un proceso reproducible que resulte en las formas maduras infectivas. Existen reportes del enquistamiento *in vitro* de otros protozoarios como es el caso de *Giardia lamblia*, donde se ha observado que la estructura filamentosa de la pared del quiste consiste de un polímero de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) la cual es sintetizada a partir de glucosa endógena. El primer paso en la vía biosintética de la pared de quiste y de la síntesis de GalNAc, es catalizado por la enzima glucosamina-6-fosfato isomerasa (Gln6Pi) que isomeriza y amina de forma reversible a la fructosa-6-fosfato en glucosamina-6 fosfato; por esta razón, es probable que el enquistamiento de *E. histolytica* sea dependiente de su expresión. Basado en estos reportes y con la reciente publicación del genoma de la *E. histolytica* y de sus rutas metabólicas, este proyecto propone evaluar la participación de la enzima Gln6Pi de este parásito durante el formación de la pared del quiste (enquistamiento) inducida mediante estrés oxidativo. Los resultados obtenidos en este trabajo representan un gran avance en la biología del parásito, para establecer las bases y comprender el fenómeno de enquistamiento abriendo la oportunidad de desarrollar nuevas estrategias de control para esta parasitosis de alta incidencia mundial.

ABSTRACT




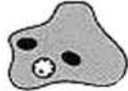
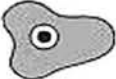







The life cycle of the intestinal protozoan *Entamoeba histolytica*, includes two biological forms: the trophozoite and the cyst. The cyst is the infective form and has a tetranucleated structure surrounded by a chitin wall highly resistant to adverse environment conditions. In spite of the numerous *in vitro* studies focused in obtaining the infective mature forms of *E. histolytica*, a reproducible procedure to get the cyst forms has not yet been obtained. However, the *in vitro* encystment of other protozoan, such as *Giardia lamblia* has been reported. During the encystment process of *G. lamblia*, it has been observed that the filamentous structure of the cyst consists of a polymer of *N*- acetylgalactosamine (GalNAc). This polymer is synthesized from endogenous glucose by a biosynthetic pathway where the rate-limiting enzyme is the glucosamine-6- phosphate isomerase (Gln6Pi). This enzyme isomerizes in a reversible way from fructose- 6- phosphate to glucosamine-6-phosphate, for that reason it is probable that the *E. histolytica* encystment process depends on the controlled expression of the Gln6Pi. Regarding these reports and with the recent publication of the *E. histolytica* genome and its metabolic pathways, the objective of this project was to evaluate the participation of the *E. histolytica*'s Gln6Pi during the cyst wall formation (encystment) induced by oxidative stress. The results obtained in this research represent a great advance in the knowledge of the biology of this worldwide parasite in order to understand the encystment process and develop new control strategies.

I. INTRODUCCIÓN

El parasitismo es la asociación antagónica e inestable entre dos especies distintas, de los cuales el parásito vive de modo temporal o permanente en otro ser, el hospedero, alimentándose a sus expensas y causándole un daño de moderado a grave. El parásito depende metabólica y evolutivamente de su hospedero, estableciendo contacto e intercambio macromolecular, con lo cual de forma potencial ocasiona acciones patógenas o modificaciones en el equilibrio homeostático del hospedero y de su respuesta inmune.

Actualmente se conocen alrededor de 45,000 especies de protozoarios y de éstas, alrededor de 10,000 son parásitas. Los protozoarios pueden dividirse en cuatro grupos principales dependiendo de su modo de locomoción: los flagelados, que se mueven por medio de flagelos; los amiboideos, por pseudópodos; los ciliados, por cilios; y los esporozoos que carecen de medios obvios de locomoción.

Algunos protozoarios pueden causar enfermedades diarreicas en el hombre. Entre ellas la Amibiasis (*Entamoeba histolytica*), Giardiasis (*Giardia lamblia*), Balantidiasis (*Balantidium coli*) y enteritis por coccidios (*Isospora belli*, *Sarcocystis*, *Cryptosporidium*) son de las más comunes. Se conocen cinco especies de amibas que habitan el intestino del hombre: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Iodamoeba butschlii*, *Endolimax nana* y una que coloniza la boca: *Entamoeba gingivalis*. Todas estas amibas son comensales no patógenas a excepción de *E. histolytica*, aunque investigaciones más recientes han demostrado que de hecho no todas las infecciones con *E. histolytica* son patogénicas (Fig 1).

Amibas						
	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Entamoeba hartmanni</i>	<i>Entamoeba coli</i>	<i>Entamoeba polecki*</i>	<i>Endolimax nana</i>	<i>Iodamoeba bütschlii</i>
Trofozoito						
Quiste						

*Extraño, probablemente de origen animal

Fig 1. Amibas del tracto digestivo humano (tomado de www.gsbs.utmb.edu)

1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La amibiasis ha existido probablemente desde que la especie humana se diferenció de sus predecesores inmediatos en el curso de la evolución. Se encuentra referencia escrita relacionada con los síntomas clásicos de la disentería en documentos muy antiguos. Los trabajos de Hipócrates recopilados en el siglo V A.C., la mencionan con frecuencia (Adams 1939), como la manifestación más común de la amibiasis invasora. Actualmente es posible identificar el padecimiento al que Hipócrates se refirió como disentería, ya que este síndrome puede estar relacionado con diferentes patologías, entre ellas la amibiasis, así como infecciones intestinales con otras especies de protozoarios parásitos y ciertas bacterias. Los médicos romanos y los individuos que practicaban el arte de curar durante la Edad Media también dejaron evidencias del

conocimiento de esta entidad clínica. No fue sino hasta la segunda mitad del siglo XIX cuando se estudió un caso de disentería en el que se detectaron amibas de una especie desconocida, en gran abundancia, en las heces del paciente. Estos protozoarios fueron más tarde identificados como los agentes causales de la enfermedad asociada con la disentería y otras manifestaciones de la disentería amibiana (Martínez-Palomo 1989).

En 1875, el doctor Fedor Aleksandrovich Lesh publicó un artículo titulado “Desarrollo masivo de amibas en el intestino grueso” en la revista *Virchows Archiv für pathologisch Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin*, editada por Rudolf Virchow en Berlín. Un historiador ruso opina que Lesh consideró a la infección amibiana como el factor causal básico del padecimiento de Markow (Svanidse 1955). En apoyo a esta suposición, menciona en varios párrafos del artículo, el estrecho paralelismo entre la cantidad de amibas en las heces y la severidad de los síntomas. Lesh escribió que existía “una relación directa entre el número de parásitos y la intensidad de los síntomas, ya que el aumento de los primeros se acompañaba de un incremento en la severidad de los síntomas”.

La publicación de Lesh en la revista editada por el famoso Virchow aseguró su amplia difusión entre los científicos de la época, y más de uno de esos lectores bien puede haber llegado a la interpretación correcta del papel etiológico de las amibas en la disentería. Este fue probablemente el caso de Stephanos Kartulis, médico griego que ejercía en Alejandría, quien publicó un artículo sobre el papel patógeno de las amibas en los *Archives* de Virchow en 1886. Él aseguró haber encontrado amibas en 150 casos de disentería, pero no logró transmitir la infección amibiana a los animales de experimentación. En 1887 hizo un estudio detallado de 20 pacientes con absceso hepático “tropical” y encontró amibas en todos ellos (Martínez-Palomo 1989).

A pesar de esos hallazgos, la duda expresada inicialmente por Lesh en relación al papel etiológico de las amibas en la disentería persistió durante varios años. Si bien Koch encontró amibas en cortes histológicos de úlceras colónicas durante el transcurso de sus estudios sobre el cólera en 1887, no dio importancia a esta observación. En cambio, Hlava, ese mismo año, halló trofozoítos en casos de disentería e inoculó varios gatos, con lo que apoyó la idea del papel patógeno de estos parásitos (Martínez-Palomo 1989)

Quincke y Roos descubrieron la forma quística de la amiba disentérica y propusieron su participación en la diseminación de la enfermedad en 1893 (Martínez-Palomo 1989). Un año más tarde, Kruse y Pasquale produjeron disentería en gatos jóvenes al inocularlos con líquido obtenido de abscesos hepáticos amibianos de humanos. Mostraron que el material era bacteriológicamente estéril, con lo que dieron pruebas adicionales de la patogenicidad de las amibas, en forma independiente de otros factores (Martínez-Palomo 1989). En 1903, Huber describió en detalle los caracteres distintivos de las formas quísticas de las dos especies (*E. coli* y *E. histolytica*) que se encuentran con frecuencia en el intestino humano (Bloomfield, 1957). Schaudinn (1903) precisó aún más los caracteres estructurales y dio a la especie patógena su nombre técnico de *Entamoeba histolytica*, todavía en uso. Musgrave y Clegg, crearon el término “amibiasis” para la infección con *E. histolytica* independientemente que este acompañada o no de síntomas (Bloomfield 1957). Sin embargo, Walter y Sellards (1913) demostraron la patogenicidad de *E. histolytica* y la inocuidad de *E. coli* en un estudio cuidadoso en el que inocularon voluntarios con quistes de esas especies. Enfatizaron también el papel importante de los quistes en la transmisión de la amibiasis, con lo que facilitaron el desarrollo de futuras medidas de prevención.

Se sabe desde hace tiempo que muchas personas aparentemente infectadas con *E. histolytica* nunca desarrollan síntomas y eliminan sus infecciones espontáneamente. Esto fue interpretado por muchos investigadores como un dato de que el parásito tenía una virulencia variable. Sin embargo, en 1925 Emile Brumpt sugirió como explicación alternativa que existían dos especies: una capaz de causar enfermedad invasora y otra que nunca causa enfermedad, a la que él llamó *Entamoeba dispar*. La hipótesis de Brumpt no fue reconocida por otros investigadores. Sin embargo, en la década de los 70 se empezaron a acumular observaciones que daban apoyo a esta hipótesis, hasta que datos bioquímicos, inmunológicos y genéticos llevaron en 1993 a una redescrición formal de *E. histolytica*, separándola de *E. dispar*, donde se hizo alusión a que *E. histolytica* puede causar enfermedad invasora intestinal y extraintestinal, contrario a *E. dispar*.

En la actualidad existe gran interés por la amibiasis debido a su impacto en la salud pública y están en curso muchos estudios sobre tópicos tan diferentes como la estructura y la composición química del parásito, la clonación de genes específicos relacionados con virulencia, y la epidemiología de la infección. Ahora se cuenta con varios protocolos que nos permiten el estudio de este patógeno, de los cuales sobresalen los inmunológicos y moleculares, que nos acercan cada vez más al desarrollo de una vacuna (Martínez-Palomo 1989).

2. AMIBIASIS

La amibiasis se define como la infección causada por el parásito protozooario *E. histolytica* con o sin manifestaciones clínicas. Este protozooario parasita al ser humano y puede vivir como comensal en el intestino grueso ó causando infecciones generalmente sintomáticas que llegan a adquirir importancia clínica. En la mayoría de los casos está confinada a la mucosa intestinal, sin embargo, algunas veces puede llegar a diseminarse a otros órganos, principalmente el hígado (Stanley, 2003).

Esta enfermedad ataca al ser humano en cualquier edad, siendo más frecuente en niños y adultos jóvenes. Se manifiesta de diferentes formas produciendo: diarrea sanguinolenta/mucoide (llamada disentería amibiana), llegando a causar un malestar abdominal leve, que se alterna con períodos de estreñimiento o disentería aguda/fulminante con fiebre y escalofríos que incluso puede provocar la muerte. Otra entidad clínica que ocurre en menor incidencia es el absceso hepático amibiano.

3. *Entamoeba histolytica*

Este protozooario entérico es capaz de colonizar el intestino grueso de un gran porcentaje de la población mundial y posee la capacidad de destruir prácticamente cualquier tejido del organismo hospedero debido a su alta capacidad citolítica y fagocítica (Martínez Palomo 1989).

3.1 Morfología

E. histolytica posee dos estadios en su ciclo de vida: la forma de trofozoíto y el quiste (Fig 2).

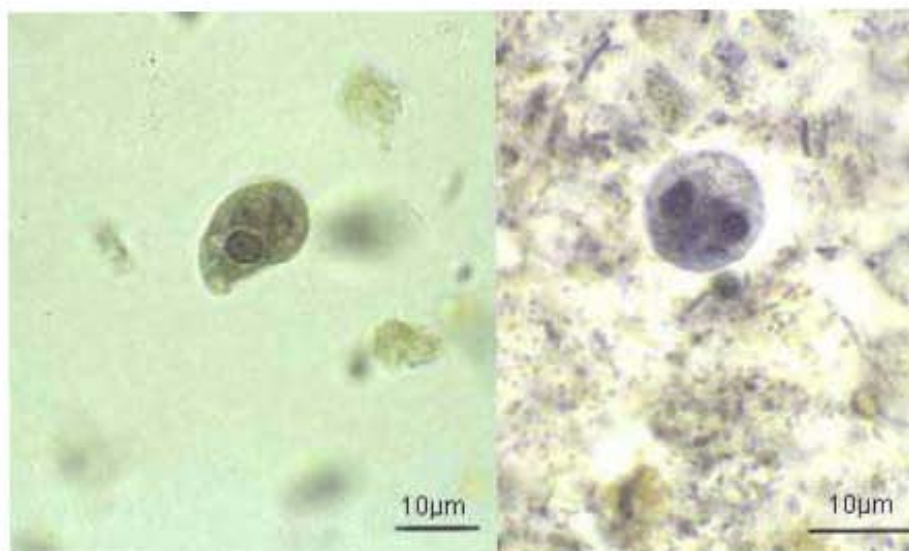


Fig 2. Trofozoíto (izquierda) y quiste de *E. histolytica* (derecha) en muestra de heces.

3.1.1 Trofozoíto

Los trofozoítos habitan las criptas del colon ascendente del hospedero, en donde se alimentan del moco y del contenido intestinal viviendo probablemente en simbiosis con las bacterias de la flora local. El trofozoíto es la forma móvil del parásito, mide de 9-30 µm y puede presentar una forma elongada o irregular. La actividad dinámica y el pleomorfismo de los trofozoítos están basados en una disposición citoplasmática sencilla que carece de los siguientes componentes: citoesqueleto estructurado y microtúbulos citoplasmáticos (no existen prácticamente filamentos de actina), un sistema de membranas equivalente al complejo de Golgi y al retículo endoplásmico de los eucariontes superiores, así como un sistema de lisosomas primarios y secundarios semejante al que se encuentra en otros eucariontes (Martínez-Palomo 1989). Se divide por fisión binaria. Posee un núcleo redondo u ovalado característico, casi indistinguible al microscopio si no se tiñe, con un cariosoma central y cromatina periférica en forma

de gránulos finos; la membrana nuclear es muy delgada. El citoplasma tiene dos zonas: un ectoplasma externo transparente y un endoplasma interno con un citoplasma granular, a menudo lleno de vacuolas. Los trofozoítos vivos desarrollan enérgicos movimientos del protoplasma con pseudopodios protráctiles que se componen principalmente de ectoplasma (Fig 3 y 4). En las cepas virulentas, los trofozoítos ingieren eritrocitos, los cuales pueden ser observados en el endoplasma, tanto en organismos teñidos como en los no teñidos. Ocasionalmente también pueden ingerir bacterias.

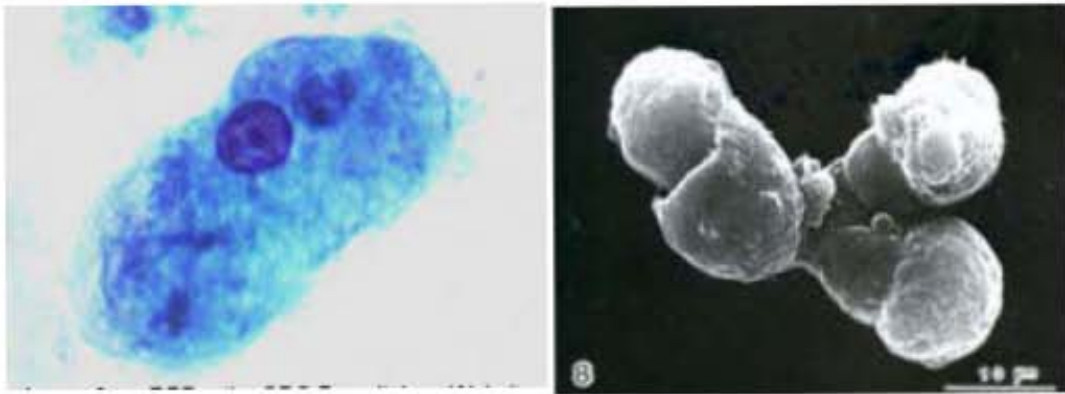


Fig 3. Trofozoito de *E. histolytica*, tinción tricrómica (izquierda) y microscopía electrónica de barrido CDC, Parasitology Website (derecha)

Desde finales del siglo pasado se ha avanzado rápidamente en cuanto al estudio de la biología del trofozoíto; por el contrario, casi no ha habido progreso en el estudio del quiste desde que se describió por primera vez en 1893 (Radvin 1988).

Entamoeba histolytica
Trofozoito

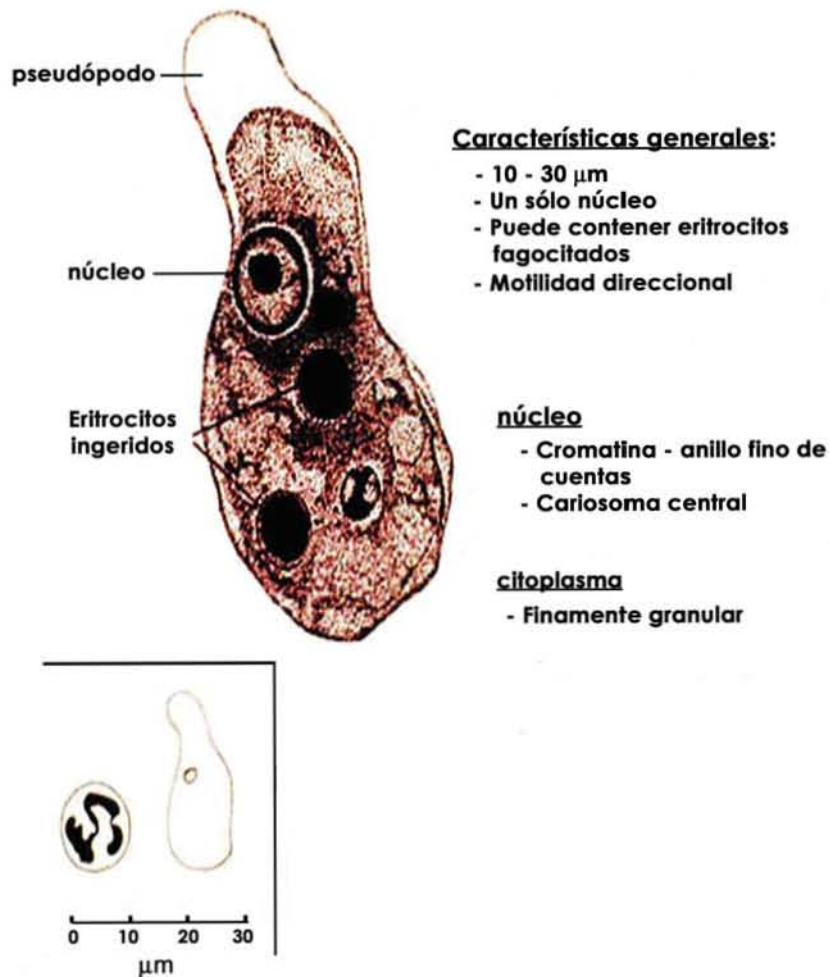


Fig. 4 Características morfológicas del trofozoíto de *E. histolytica*.

3.1.2 Quiste

Conforme los trofozoítos viajan a través del colon, las condiciones son menos favorables y la materia fecal se vuelve más seca. Para protegerse, y bajo la influencia de la flora bacteriana adecuada, los trofozoítos se enquistan.

El quiste, estadio infeccioso de la amiba, es una estructura esférica tetranucleada resistente a los ácidos del tracto digestivo, tiene un tamaño aproximado de 9 a 25 μm y es responsable de la transmisión de la enfermedad de hospedero a hospedero. Los quistes de *E. histolytica* son ricos en carbohidratos y proteínas, poseen pared extracelular rígida formada principalmente por quitina, lo cual le da un contorno distintivo y le confiere una gran resistencia a condiciones ambientales adversas como aquellas a las que se enfrenta el parásito cuando es expulsado en las heces al medio ambiente (Mc Connachie, 1955). El quiste contiene gránulos finos, cuerpos cromatoides que al teñirse con hematoxilina toman una coloración negra y una distintiva masa difusa de glucógeno; pueden tener de uno a cuatro núcleos dependiendo de su grado de madurez. Los recién formados sólo tienen un núcleo; al madurar, el núcleo se divide por mitosis produciendo dos y luego cuatro, los cuales, aunque de menor tamaño, tienen las mismas características que el núcleo del trofozoíto. (Fig 5 y 6).

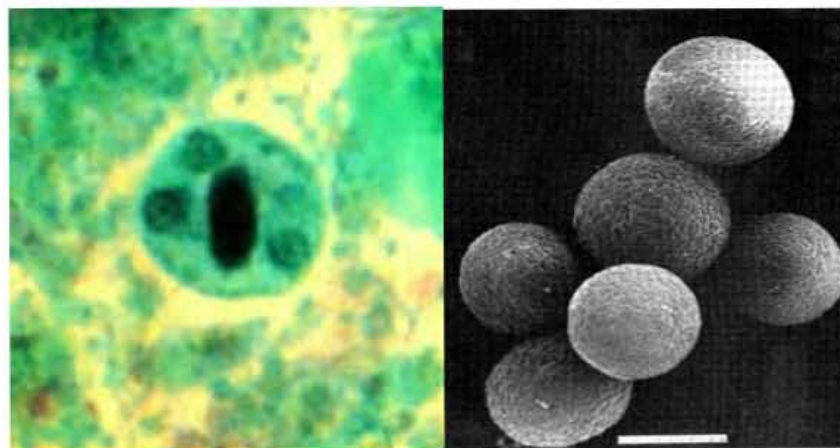


Fig. 5 Quistes de *Entamoeba histolytica* con tinción tricrómica (tres núcleos y cuerpos cromatoides) (izquierda) y quistes en microscopia electrónica de barrido (derecha). (Tomado de oregon.conevyt.org.mx).

En los quistes recién formados también se observan depósitos de glucógeno. Los quistes liberados en las heces son los responsables de la transmisión de la infección y pueden sobrevivir cuando menos 8 días a 20-34 °C y durante 40 días a 2-6 °C. Aunque resisten las concentraciones de cloro presentes en el agua purificada, son eliminados por filtración y destruidos por calentamiento arriba de 50 °C (o ebullición) o por tratamiento con ácido acético al 5-10 % a 30°C durante 15 minutos. También se destruyen por desecación o por superclorinación o iodinación (200 ppm). Para poder observar los núcleos y los depósitos de glucógeno se utilizan preparaciones húmedas teñidas con iodo; la masa de glucógeno se tiñe de café (Manual de parasitología 2002).

Entamoeba histolytica **Quiste**

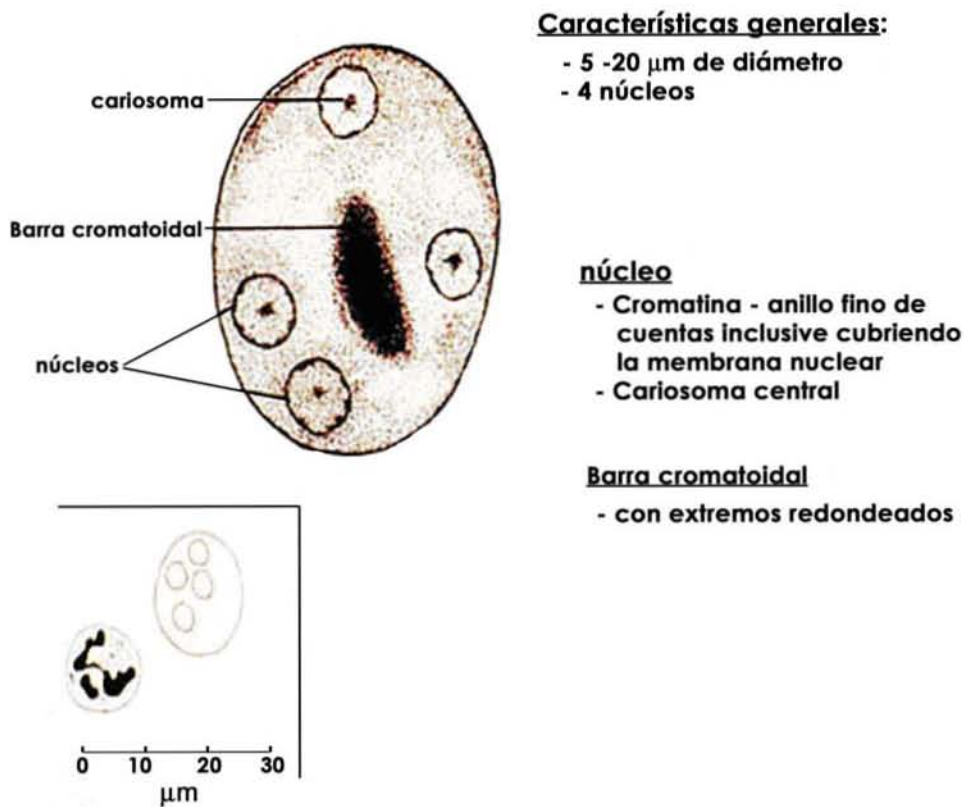


Fig 6. Características morfológicas del quiste de *E. histolytica*

4. CICLO DE VIDA

La infección comienza con la ingestión de agua o comida contaminada con quistes maduros provenientes de materia fecal de humano. Gracias a su cubierta de quitina, los quistes ingeridos son capaces de resistir el efecto de los jugos gástricos hasta alcanzar la parte baja del intestino delgado donde ocurre el desenquistamiento perdiendo su cubierta, liberando una amiba tetranucleada que duplica sus núcleos

seguida de divisiones citoplasmáticas que resultan en la formación de 8 pequeñas amebas llamadas amébulas metaquísticas (Eichinger (b) 2001). Estas amébulas migran al intestino grueso en donde se transforman en trofozoítos maduros que se adhieren a la mucosa y la colonizan. Allí, los trofozoítos se alimentan de bacterias y restos celulares, se reproducen por fisión binaria, y a diferencia de *Entamoeba dispar* que vive como comensal, *E. histolytica* puede penetrar la mucosa causando lesiones de diferente magnitud que en contadas ocasiones llevan a la migración de los trofozoítos a otros órganos, principalmente el hígado. En cualquier caso, los trofozoítos que alcanzan la parte baja del colon se enquistan completando el ciclo de vida cuando éstos son excretados en la materia fecal al ambiente (OMS, 1997) (Fig 7).

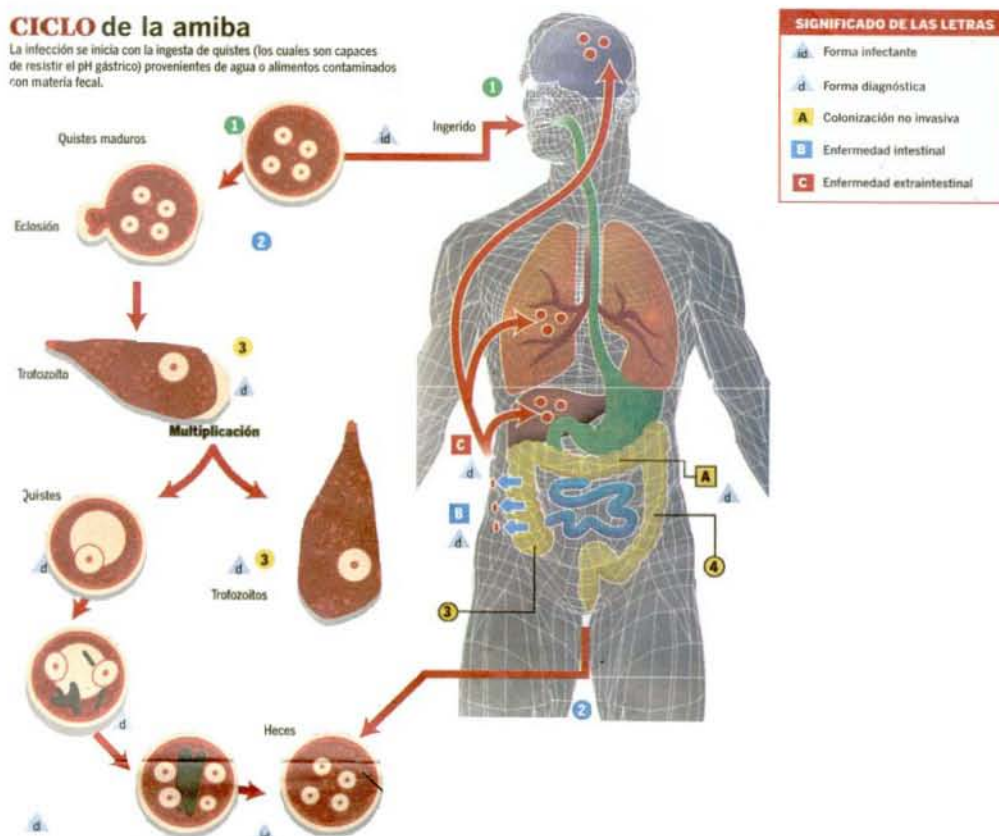


Fig.7 Ciclo de de vida de *Entamoeba histolytica* (Carrero y Cols. 2006).

5. UBICACIÓN TAXONOMICA

La clasificación de *E. histolytica* según Cavalier-Smith (1998) es la siguiente:

Reino Protozoa

Subreino Neozoa

Superclase Sarcomastigota

Phylum Ameobozoa

Subphylum Conosa

Género *Entamoeba*

Especie *histolytica*

6. EPIDEMIOLOGÍA

A pesar de su distribución mundial, la infección por *E. histolytica* varía de un lugar a otro siendo las comunidades pobres y con mal saneamiento ambiental las de mayor incidencia. Generalmente las tasas de prevalencia son más altas en algunas zonas del trópico, donde el saneamiento es deficiente (Fig 8). La mayoría de los individuos infectados son portadores asintomáticos de este protozooario (Sepúlveda y Martínez-Palomo 1984).

La amebiasis es la tercera enfermedad parasitaria más importante del mundo; sólo la malaria y la esquistosomiasis superan el nivel de mortalidad mundial causado por este protozooario (Walsh 1986). Por otra parte, *E. histolytica* es responsable de unas 100.000 muertes por año, lo que la coloca en segundo lugar después de la malaria en mortalidad por parásitos protozoarios (OMS 1997).

Se estima que cerca del 10% de la población mundial está infectada con este parásito, de los cuales entre el 10 al 15% enferman cuando la amiba invade la mucosa del intestino grueso produciendo diarrea y disentería. Aproximadamente en el 10% de este último grupo, la amiba invade otros tejidos (amibiasis invasora), resultando entre 40,000 a 100,000 muertes anuales (Eichinger (a) 2001).

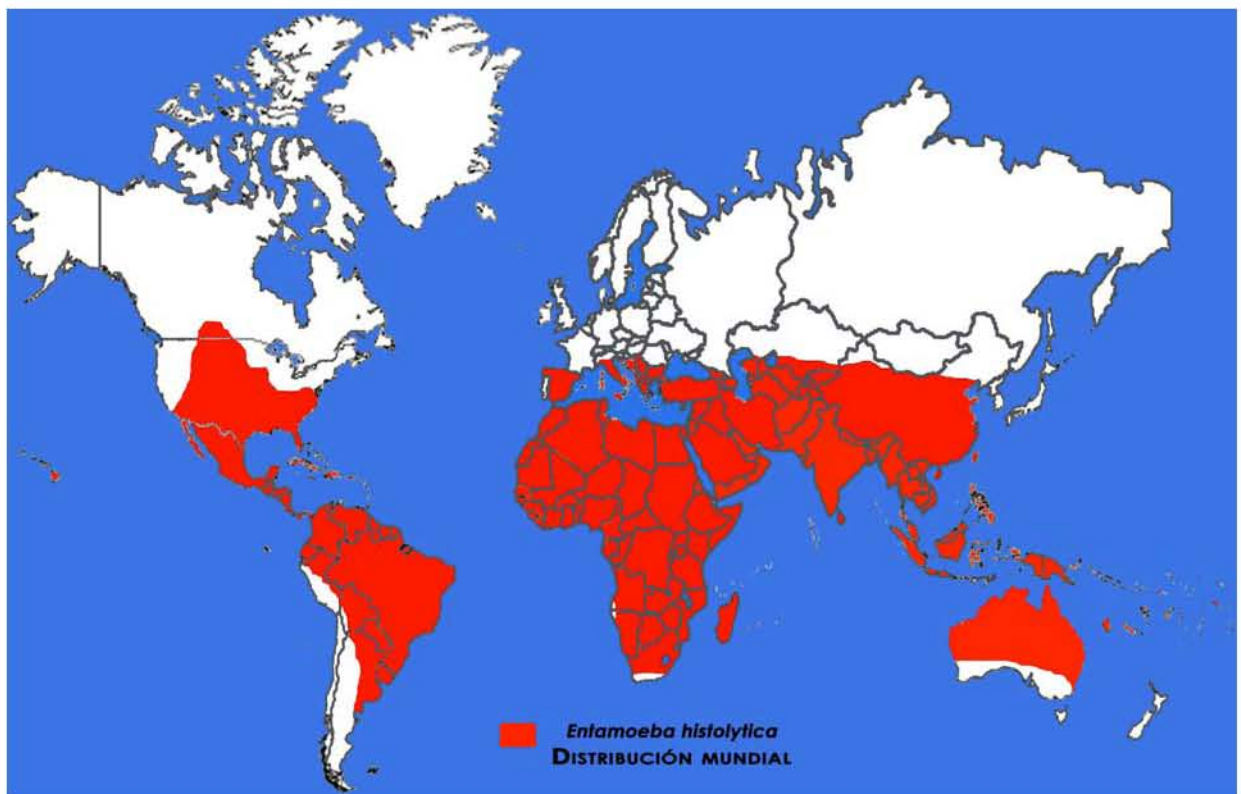


Fig.8 Distribución mundial de la amibiasis (Eichinger (a) 2001).

7. PATOLOGÍA

E. histolytica deriva su nombre de la gran capacidad que posee de destruir casi todos los tejidos del ser humano, tales como la mucosa intestinal, el hígado y en menor grado, cerebro, piel, cartílago y hueso. Para esto es esencial que los trofozoítos se adhieran a las células epiteliales y a las células inflamatorias de la respuesta inmune mediante una lectina de adherencia inhibible por galactosa, que es una proteína de

superficie de 250 kDa (Said-Fernández 1986 y 1990). De acuerdo a Said-Fernández, la lisis de las células blanco puede producirse mediante una citólisis directa dependiente del contacto y mediada por fosfolipasas amibianas y otra indirecta en la que intervienen citolisinas leucocitarias resultantes de la lisis de leucocitos por las amibas. La actividad citolítica directa depende de la función de los microfilamentos de la amiba, iones de calcio, y una fosfolipasa A calcio-dependiente. La adherencia de los trofozoítos de *E. histolytica* es seguida de una elevación sostenida de calcio intracelular que contribuye a la muerte de la célula (Said-Fernández 1990). Los ésteres de forbol y la proteína-cinasa aumentan la actividad citolítica de la amiba. El parásito también contiene una proteína formadora de poros, de 77 aminoácidos, que induce la salida de Na^+ , K^+ y en menor grado Ca^{2+} en las células blanco, pero no hay evidencia directa de que esta tenga una función importante en la lisis de estas células (Said-Fernández 1990). Recientemente, se han encontrado en las cepas más virulentas de la amiba diversas hemolisinas con actividad citotóxica demostrada en líneas de cultivos celulares. *E. histolytica* contiene además numerosas enzimas proteolíticas incluyendo la catepsina B, una proteinasa ácida, colagenasa y una proteinasa neutra (Fig 9). Las proteinasas parecen estar implicadas en la destrucción de la matriz extracelular que fija las células. Los leucocitos polimorfonucleares que constituyen la respuesta inicial del huésped a los trofozoítos de *E. histolytica* son invariablemente destruidos por ésta y sus productos de la lisis aumentan el daño a los tejidos (Said-Fernández 1990).

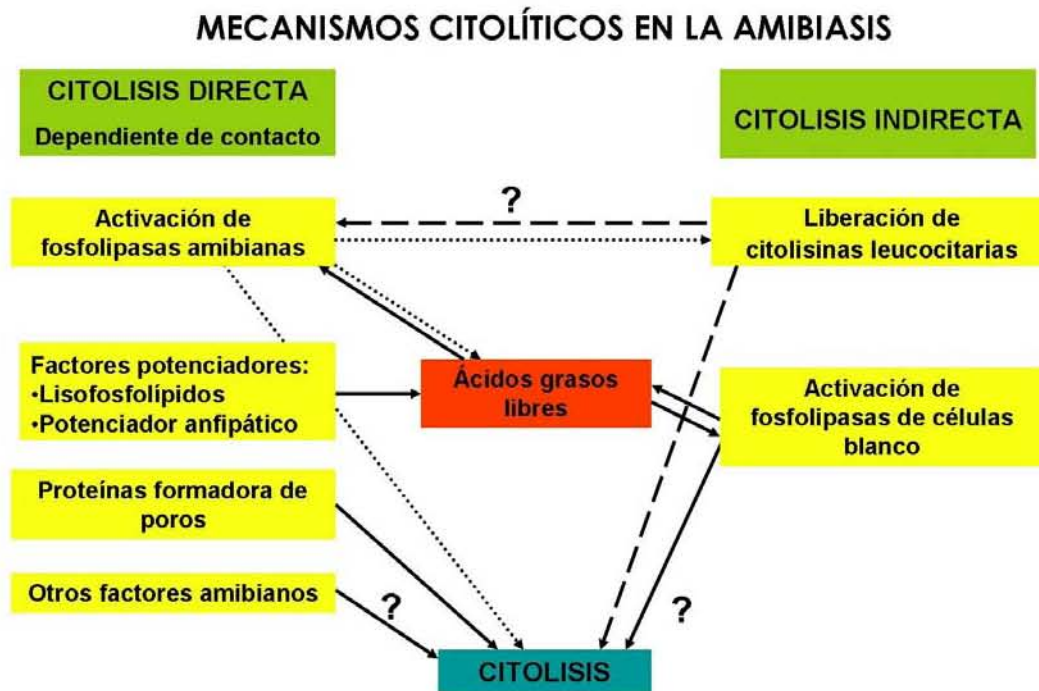


Fig. 9 Mecanismos citolíticos de *Entamoeba histolytica* durante la amibiasis.

Las manifestaciones clínicas varían desde el portador asintomático a la colitis fulminante con perforación. Los portadores asintomáticos del parásito son de suma importancia en la transmisión de la enfermedad ya que además de portadores son también reservorios de la infección (Martínez Palomo, 1987). Una diarrea acuosa puede transformarse en síndrome disentérico con diarrea acompañada de moco, sangre y dolor abdominal intenso. Las formas menos frecuentes de amibiasis intestinal invasora incluyen el ameboma, la apendicitis amibiana y la colitis fulminante (con mortalidad superior al 60%). Por otra parte, el absceso hepático amibiano (Fig 10) es la forma más frecuente de amibiasis invasora extraintestinal, el cual se presenta comúnmente en hombres entre los 20-60 años de edad. Otras formas de amibiasis extraintestinal menos frecuentes son lesiones amibianas en piel, pulmón y cerebro.

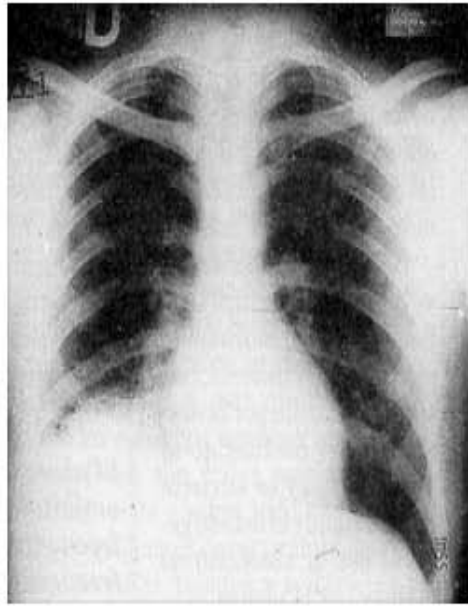


Fig 10. Placa radiográfica del tórax de un paciente con absceso hepático amibiano (AHM). Nótese la elevación del diafragma.

7.1 Amibiasis Intestinal

La invasión de la mucosa colónica por *E. histolytica* causa la amibiasis intestinal (Fig 11). Esta se presenta con dolor abdominal agudo, evacuaciones constantes o diarrea que puede ir acompañada de moco, sangre, tenesmo y fiebre. En algunas ocasiones forma úlceras de 3-5 mm que con frecuencia están en el ciego, el recto, el colon y ocasionalmente involucran al íleon en su parte final. Las úlceras son inicialmente superficiales, con bordes hiperémicos y una base necrótica cubierta de un exudado amarillento. En raras ocasiones, los vasos sanguíneos asociados a la base del epitelio intestinal son dañados por la úlcera provocando sangrados severos. La úlcera puede llegar a perforarse causando peritonitis y en casos extremos la muerte (Radvin 1988).

La colitis amibiana fulminante resulta de una ulceración confluyente y necrosis del colon. El intestino se dilata, particularmente en la porción transversal, los pacientes presentan fiebre y muestran signos de hipovolemia y desbalance electrolítico. El ameboma o granuloma amibiano es causado por invasiones repetidas del colon que pueden

complicarse con una infección piogénica. Las lesiones regularmente son únicas e involucran pequeños segmentos del colon. Histológicamente el ameboma no es fibroso y contiene tejido granuloso con linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y células gigantes. Hay una ligera inflamación y es difícil demostrar la presencia de amibas. El tejido fibroso se forma después en un intento de cicatrización (Radvin 1988).

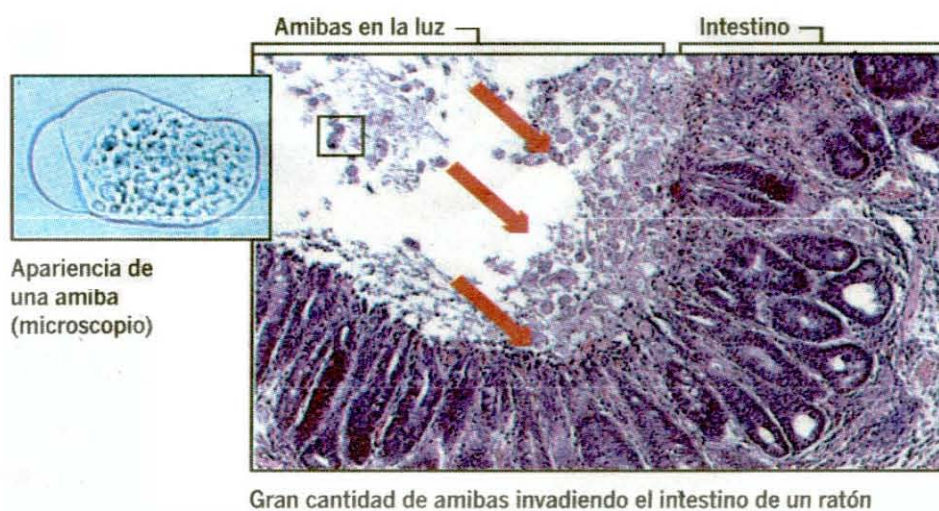


Fig 11. Modelo de la amibiasis intestinal en ratón. Corte histológico de un intestino de ratón infectado con trofozoítos de *E. histolytica* (Carrero y cols 2006)

7.2 Absceso hepático amibiano (AHA)

Es la forma extraintestinal más común de la amibiasis, está causada por la migración de trofozoítos desde el intestino al hígado a través de la vena porta; es la causa de la mayoría de los casos letales por infección con este parásito. Se puede encontrar en todas las edades, pero es más frecuente en adultos que en niños y dentro de los adultos es más común en hombres que en mujeres. Prevalece en sectores pobres y en poblaciones urbanas (Hughes y Petri 2000).

Cuando se diagnostica a pacientes con AHA, aproximadamente el 20% ya tiene un historial de disentería previa y alrededor del 10% presenta diarrea o disentería en ese momento. Entre los síntomas más comunes del AHA se encuentran: i) dolor localizado en la región del absceso. El dolor es intenso y constante, irradiado a la región escapular; ii) fiebre con variaciones desde 38°C hasta 40°C que permanece por periodos de días; iii) se pueden presentar otros síntomas como anorexia, pérdida de peso, náuseas, vómitos y fatiga.

En el absceso, el parénquima hepático es completamente sustituido por restos necróticos de hepatocitos con la presencia de escasos trofozoítos y células inflamatorias (OMS, 1997). Las lesiones son únicas y muchas de ellas se localizan en el lóbulo derecho en la región posterior, externa y superior (Hughes y Petri 2000). En casos extremos, la formación de un AHA de grandes dimensiones pueden llegar a perforar la cavidad peritoneal, pericárdica y pleural. Cuando se perfora el diafragma, la infección amibiana llega a invadir el parénquima pulmonar o los bronquios, resultando en la formación de abscesos en pulmones, e incluso, en algunos casos, esta diseminación puede alcanzar órganos tan lejanos como el cerebro. Estos casos ocurren con muy poca frecuencia, así como aquellos en los que se han encontrado trofozoítos en tejidos como la piel y las mucosas asociadas a los órganos genitales (Abuabara 1982).

Los hámsters son los animales más empleados como modelo experimental para reproducir la amibiasis hepática, mediante la inoculación directa al hígado o intraportal de trofozoítos axénicos, produciendo absceso caracterizado por necrosis y reacción inflamatoria en el 80% de la superficie del hígado (Tanimoto 1973). Los análisis microscópicos indican que durante las primeras 12 h pos-inoculación se observa un infiltrado celular agudo de polimorfonucleares alrededor de la amiba; posteriormente

aparecen cambios necróticos y degenerativos en los hepatocitos cercanos a las lesiones. El contacto directo de los trofozoítos con los hepatocitos es poco común, lo que sugiere que la destrucción de los hepatocitos es ocasionada por los productos líticos de los polimorfonucleares y los macrófagos lisados por los trofozoítos (Tanimoto 1973 y Tsutsumi 1984). En fases tardías ocurre un incremento en la necrosis del tejido hepático, los macrófagos y células epiteliales son sustituidas, y se desarrollan granulomas (Tsutsumi 1984).

7.3 Factores asociados a la virulencia amibiana

Para la amibiasis invasiva se requiere que los trofozoítos se adhieran a la superficie luminal del intestino, que se desencadenen efectos citolíticos y proteolíticos sobre los tejidos, a lo que se sumaría la resistencia del parásito los mecanismos de defensa del hospedero. La unión de los trofozoítos a la mucina colónica, bacterias, células epiteliales y células de la respuesta inflamatoria, está medida por una lectina específica a la galactosa/*N*-acetilgalactosamina (Mann 2002). Esta adherencia es seguida por un aumento en la concentración de calcio intracelular en la célula blanco, lo que contribuye a su muerte (Pinilla 1998 y Braga 1992). Una vez adheridas las amibas liberan proteasas de cisteína que están directamente implicadas en la invasión e inflamación del intestino; estas proteasas lisan las proteínas de la matriz extracelular, facilitando la invasión de los trofozoítos dentro del tejido de la submucosa (Que y Reed 2000) y favoreciendo la evasión de la respuesta inmune del hospedero debido a la degradación de la anafilotoxina C3a lo que limita la respuesta inflamatoria del hospedero (Radvin 1986 e Hidalgo 1990).

La gran mayoría de los efectos citolíticos de la amiba son atribuidos a pequeños péptidos conocidos como ameboporos, que son capaces de formar poros en la bicapa

lipídica de las células blanco. Estos juegan un papel importante en la destrucción de células epiteliales, intestinales, hepatocitos y células del sistema inmune (Leippe 1997). Sin embargo existen otros factores de virulencia como las fosfolipasas, los fosfoglicanos, las hemolisinas y hialuronidasas además de una amplia variedad de enzimas hidrolíticas, todas implicadas en la patología causada por la amiba (Long-Krug 1985 y Bailey 1990).

Por otra parte, los trofozoítos de *E. histolytica* pueden matar a las células de mamífero a través de la inducción de muerte celular programada (apoptosis) (Ragland 1994). Los mecanismos por los cuales los trofozoítos inducen la apoptosis están comenzando a investigarse. Se sabe, a partir de un modelo murino de absceso hepático, que la apoptosis del hepatocito requiere de la activación de las caspasas, pero es independiente de Fas/FasL y del receptor 1 del factor de necrosis tumoral α (Seydel y Stanley 1998).

Igualmente los trofozoítos pueden causar alteraciones en la permeabilidad intestinal que es independiente de su actividad citolítica; así, trofozoítos adheridos a la superficie apical de células Kaco-2, originan una rápida disminución en la resistencia transepitelial de la monocapa, pudiendo afectar de ésta manera al epitelio intestinal y con ello la captación de nutrientes para el hospedero (Li 1994).

8. ENQUISTAMIENTO

Los parásitos entéricos como *E. histolytica*, utilizan ciertas estrategias para sobrevivir en condiciones adversas a través de la formación de estructuras quísticas, estadio infeccioso cuadrinucleado resistente a los ácidos estomacales (Eichinger (b) 2001). El mayor componente de la pared rígida del quiste es la quitina, un homopolímero de *N*-acetil-D-glucosamina de uniones β -(1,4), similar a la quitina

descrita en hongos, insectos y algunos nemátodos, formando parte de su pared celular y/o exoesqueleto (Campos-Góngora 2004). La polimerización de la quitina requiere la presencia de enzimas específicas llamadas quitina sintasas que pertenecen al grupo de la familia de las β -glicosil-transferasas (Campos-Góngora 2004).

Además de la quitina, la pared del quiste contiene ácido neuramínico y diferentes proteínas. Reportes recientes han identificado una proteína rica en cisteína que se encuentra en abundancia en la pared del quiste de *Entamoeba invadens* un parásito de reptiles similar a *E. histolytica*, que se ha utilizado como modelo del fenómeno de enquistamiento *in vitro* (Eichinger (b) 2001). Esta proteína llamada de Jacob posee dominios de unión a quitina, como las proteínas de matriz peritrópica de los insectos (Eichinger (b) 2001). Samuelson y colaboradores proponen que durante el proceso de formación de la pared del quiste, la quitina se deposita directamente sobre las proteínas de Jacob (Frisardi 2000). Esto sugiere un modelo del ensamble de la pared del quiste en el cual las Gal-lectinas en la superficie de los trofozoítos enquistándose se encuentran unidas a las proteínas de Jacob, las cuales a su vez, se van uniendo a los polímeros de quitina en la superficie del trofozoíto mediante dominios específicos. (Frisardi 2000).

La pared del quiste además, incluye glicoproteínas de 100 a 150 kDa, las cuales son capaces de unirse específicamente a la aglutinina de germen de trigo (WGA) y a algunos antígenos de superficie no caracterizados que pueden reaccionar con anticuerpos monoclonales anti-quiste (Frisardi 2000, Chayen, 1985, Walderich 1998).

En el parásito intestinal *Giardia lamblia*, el quiste está compuesto por una cubierta externa y una membrana interna con un espacio peritrópico entre ambas y finalmente otra membrana interna recubre a los trofozoítos contenidos. La pared

filamentosa del quiste consiste de un polímero de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), un carbohidrato que es sintetizado a partir de glucosa endógena por medio de una vía de biosíntesis asociada al proceso de enquistamiento. Este carbohidrato representa el 86 % de la pared del quiste en peso seco (Eichinger (b) 2001, Manning 1992) (Fig 12). El mayor componente proteico de la pared del quiste incluye a las proteínas CWP-1 y CPW-2.

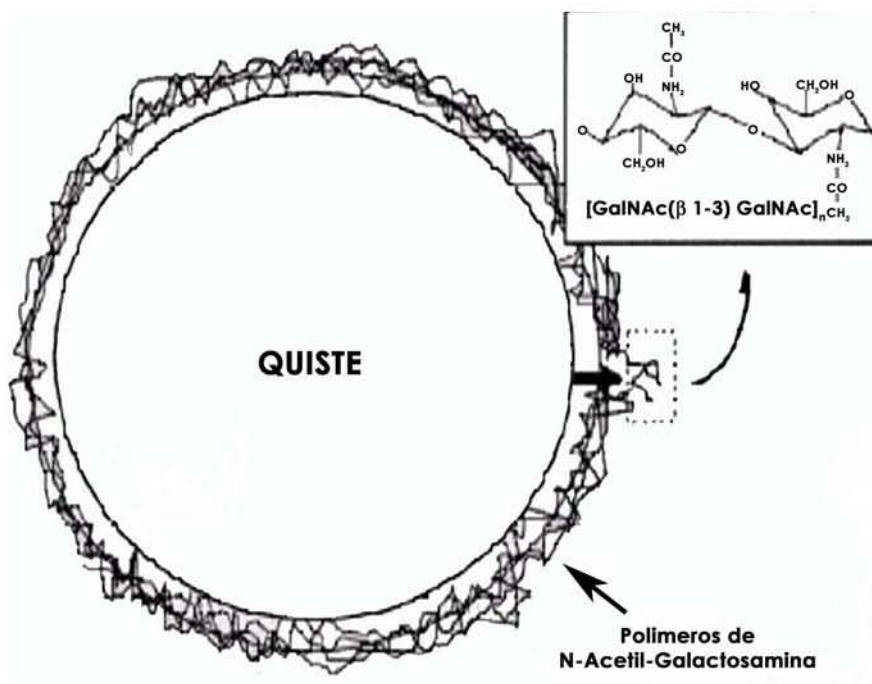


Fig.12 Estructura de la pared quística en *Giardia lamblia*, Jarroll y cols, J. Eukaryot. Microbiol, 48 (1):22-26, 2001

9. FACTORES ASOCIADOS AL ENQUISTAMIENTO EN *Entamoeba histolytica*

Se conocen algunos de los mecanismos por los cuales los trofozoítos de *E. histolytica* poseen la habilidad de invadir la capa de moco del colon intestinal de su hospedero (Eichinger (a) 2001), sin embargo, el mecanismo por el cual estos trofozoítos son capaces de llevar a cabo el proceso de desenquistamiento y enquistamiento, base de la transmisión de la enfermedad, aún permanece desconocido.

El estímulo que desencadena el proceso de enquistamiento posiblemente sea el resultado del cambio en las condiciones locales (Eichinger (a) 2001). Las condiciones lumbinales se desconocen pero Eichinger propone que podría deberse en parte a la presencia de un gran número de bacterias y de la expresión en la superficie del trofozoíto de galactosa/*N*-acetilglucosamina, lectina que posee gran afinidad por macroagregados de azúcares que forman la capa de mucinas en el epitelio colónico (Eichinger (a) 2001).

Cuando la viscosidad del moco disminuye, permite la difusión de una mayor cantidad de bacterias de las cuales la amiba se alimenta en el sitio de multiplicación. Probablemente la lectina Gal/GalNAc de *E. histolytica* no sólo esté relacionada con la adherencia de los trofozoítos en el intestino, sino también con monitoreo de la integridad de la capa de mucinas, que al ser detectado provoque la diferenciación (Eichinger (a) 2001).

10. ENQUISTAMIENTO *IN VITRO* DE *E. histolytica*

En *E. histolytica* la mayoría de los estudios dirigidos al quiste se han centrado en lograr su obtención *in vitro*; sin embargo, lamentablemente no se ha descrito un proceso reproducible y convincente que resulte en las formas maduras infectivas.

En 1991 Das y Gillin describieron una enzima quitina-sintasa dependiente de dos cofactores (cationes divalentes) el Mn^{2+} y el Co^{2+} en el parásito protozoario de reptiles *E. invadens*, (Campos-Góngora 2004, Das-Gillin 1991). Ahora se sabe que en otros organismos que sintetizan polímeros de quitina, la enzima encargada de este proceso utiliza estos y otros cofactores como el Mg^{+2} (Campos-Góngora 2004, Das-Gillin). Con base a estos reportes Campos-Gongora y cols., analizaron la expresión y

actividad enzimática de las quitina-sintasas de *E. histolytica* bajo diversas concentraciones de estos cationes divalentes (Mg^{+2} , Mn^{+2} y Co^{+2}), en un medio axénico, obteniendo estructuras con una pared de polisacáridos y con organelos intracelulares no definidos (núcleos, cuerpos cromatoides), característicos de los quistes maduros de *E. histolytica* (Campos-Góngora 2004). Por otra parte Morales y cols., intentaron inducir el enquistamiento de *E. histolytica*, mediante el tratamiento de trofozoítos con CO_2 gaseoso y concentraciones bajas de glucosa en medios de cultivo, observando la formación de una pared gruesa de polisacáridos pero con ausencia de estructuras internas características de un quiste maduro (Morales-Vallarta 1997).

Existe otro estudio realizado por González-Salazar en donde evalúan el efecto de diez factores sobre el enquistamiento: suero bovino, glucosa, tetraborato de sodio, $MnCl_2$, $CoCl_2$, extracto de hígado y páncreas, vitaminas de Diamond, fosfatos y $CaCl_2$, que fueron utilizados como una sola mezcla, ensayando diferentes concentraciones en un medio de cultivo axénico. El resultado de estos tratamientos culminó con la obtención de estructuras que presentan una pared rígida de polisacáridos con presencia de un solo núcleo (González- Salazar 2000). No existen en la literatura mas reportes sobre intentos de enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica* por lo que el estudio de las condiciones que resulten en quistes maduros es aún un campo de sumo interés que debe analizarse con mayor profundidad.

11. ENQUISTAMIENTO EN OTROS PROTOZOARIOS INTESTINALES

La mayoría de los intentos por obtener quistes maduros e infectivos de *E. histolytica*, se han basado en reportes previos de enquistamiento *in vitro* de otros protozoarios, como es el caso de *E. invadens* y *G. lamblia*.

El parásito de reptiles *E. invadens* ha sido tomado como modelo alternativo para el estudio del proceso de enquistamiento en *E. histolytica* debido a que presenta gran similitud en cuanto a patrones morfológicos y bioquímicos (Barrón-González 2005). La ventaja de utilizar este modelo radica en la facilidad que posee *E. invadens* para crecer en medio de cultivo axénico, así como de su capacidad de formar estructuras de resistencia (quistes) *in vitro* bajo el influjo de diferentes estímulos (Chayen 1985).

Son dos los métodos comúnmente utilizados en el laboratorio para un enquistamiento eficiente de *E. invadens*. El primero consiste en la deprivación de la fuente de carbono, específicamente de glucosa en el medio (Vázquez-Cisneros y Arroyo-Begovich 1984); el segundo es un método de dilución que lleva a un choque hiposmótico (Avron 1986), o bien la combinación de los dos estímulos (Sánchez et al. 1994). Usando este mismo modelo *in vitro*, se ha observado que para el desarrollo del quiste se requiere la presencia de moléculas multivalentes con terminales de galactosa, así como de catecolaminas o norepinefrina (Coppi y Eichenger 1999). De igual forma, se ha observado que el suero bovino o equino es un componente esencial en los medios de enquistamiento de *E. invadens* (Barrón-González 2005). En otros estudios se ha descrito que simples soluciones tales como amortiguadores, sales o azúcares, pueden inducir el enquistamiento de *E. invadens* mediante una presión osmótica adecuada (en un rango de 60-160 mOs/Kg) (López-Romero 1993). En contraparte, se ha observado que la citocalacina D, inhibidor específico de los microfilamentos celulares, bloquea el enquistamiento y crecimiento de trofozoítos de *E. invadens* en medio de cultivos axénico, evidencia que muestra la participación activa de los microfilamentos en el proceso de enquistamiento (Makioka 1999). Estudios posteriores muestran que la β -lactona derivado de la Lactacistina, inhibidor del proteosoma al unirse covalentemente a

los grupos hidroxilo o a los sitios activos de la treonina de las subunidades beta, es un potente inhibidor del enquistamiento de *E. invadens* (Makioka 2002).

En el caso del parásito entérico *G. lamblia*, el incremento en la concentración de bilis y/o sales biliares en el medio de cultivo junto con el cambio en el pH de 7 a 7.8, están implicados en la inducción del enquistamiento (Luján 1999). Sin embargo, el mismo grupo también ha reportado que se puede inducir la formación del quiste en ausencia de bilis (deprivación de nutrientes y de colesterol) (Luján 1996). Desde que comienza el fenómeno de enquistamiento, los componentes de la pared del quiste son rápidamente sintetizados y ordenados en gránulos secretores característicos. Las vesículas secretoras específicas (VSE's) transportan el material formado hacia el exterior de la célula para culminar con la formación de una pared rígida, formada por polímeros de *N*-acetil-galactosamina, y que proporciona protección a condiciones ambientales adversas (Luján 1996).

A pesar de la similitud en cuanto al ciclo de vida y la formación de estructuras tipo quiste que *E. histolytica* presenta con *E. invadens* y con *G. lamblia*, los ensayos para inducir su enquistamiento *in vitro* han sido infructuosos.

12. GLUCOSAMINA-6-FOSFATO ISOMERASA

Las reacciones en los seres vivos se realizan gracias a las enzimas, catalizadores biológicos que aceleran una reacción con un pH y temperatura estable, dando como resultado el producto más la enzima.

Los amino-azúcares, tales como la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) y ácido acetil-murámico, forman un pilar estructural primordial en las cadenas de polisacáridos y azúcares en algunos los organismos. En

bacterias, la formación de nucleótidos de amino-azúcares resulta en la formación de la pared de peptidoglicanos (Vincent 2005). En algunos organismos, el metabolismo de estos azúcares, la conversión de la fructosa-6-fosfato (Fru6P) en glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) es la clave en esta vía (Tanaka 2005). Esta reacción es catalizada de forma reversible mediante la acción de una enzima llamada Glucosamina-6-fosfato isomerasa-deaminasa (2- amino-2-deoxy-D-glucosa-6-fosfato ketol isomerasa (deaminasa) EC 5.3.1.10) (Gln6Pi) (Calcagno 1984). La enzima cataliza una reacción de deaminación e isomerización de Glucosamina-6-fosfato a Fructosa-6-fosfato y amonio, que puede revertirse en presencia de altas concentraciones de amonio (Tanaka 2005).

Estudios en bacterias y algunos tejidos de animales muestran que la Glucosamina-6-fosfato isomerasa-deaminasa posee un activador alostérico (*N*-acetilglucosamina-6-fosfato [GlcNAc6P]) que actúa en ambas direcciones de la reacción. Esta es una propiedad inusual reportada para la enzima Gln6Pi en esta vía metabólica y no se presenta en algunos organismos como *C. albicans* y *Proteus vulgaris* (Calcagno 1984).

En *G. lamblia*, como se mencionó anteriormente, la estructura de la pared del quiste consiste de un polímero de *N*-acetil-galactosamina (GalNAc) que es sintetizado a partir de glucosa endógena por una vía inducida cuando los trofozoítos de *G. lamblia* entran en proceso de enquistamiento. El primer paso en esta vía biosintética, y por lo tanto en la síntesis de GalNAc, consiste en la conversión de la Fructosa-6-fosfato a Glucosamina-6-fosfato, reacción catalizada por la Gln6Pi (Steimle 1997, López 2002).

Otras enzimas involucradas en la síntesis de la GalNAc son la Glucosamina-6-fosfato *N*-acetilasa, la fosfoacetilglucosamina mutasa, UDP-GlcNAc pirofosforilasa y la UDP-GlcNAc 4'-epimerasa (Sener 2004) (Fig. 13). Durante el proceso de

enquistamiento todas estas enzimas, incluyendo la Gln6Pi, se encuentran localizadas en el citosol. Cuando se induce el enquistamiento en trofozoítos de *G. lamblia* mediante la adición de bilis, éstas enzimas se activan transcripcionalmente y las actividades específicas de cada una se incrementan (Sener 2004). Particularmente, evaluaciones de la actividad enzimática durante el enquistamiento muestran un aumento en la concentración de la Gln6Pi en un orden de hasta tres veces con respecto a la expresión basal de la enzima (Sener 2004).

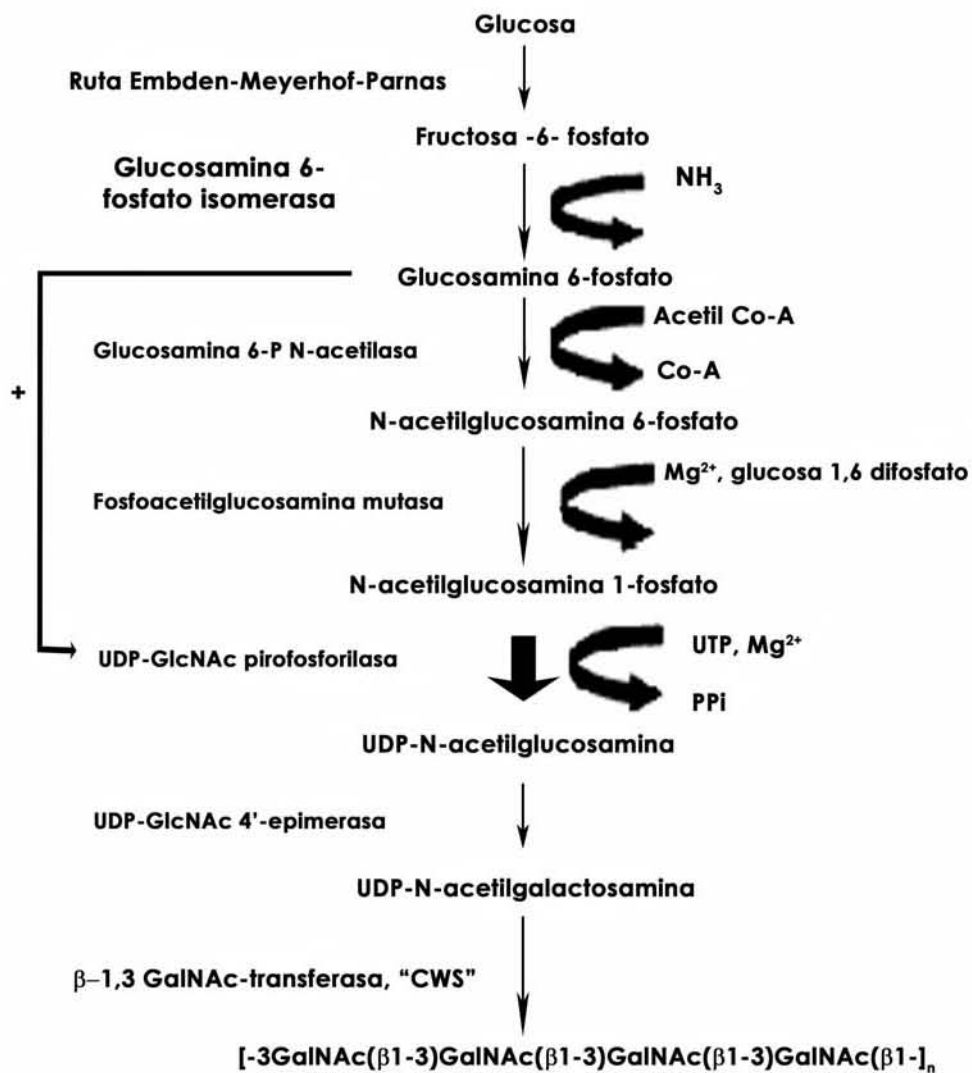


Fig 13. Síntesis del polímero que forma la pared del quiste en *G. lamblia*. J. Eukaryot. Microbiol., vol. 48, No. 1, 2001.

13. ESTRÉS OXIDATIVO

El colon del hospedero humano, lugar donde se alojan los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, es una región con una baja densidad de O_2 . Al invadir los tejidos, la amiba se enfrenta a un aumento en la tensión de O_2 , lo cual resuelve con un grupo de enzimas que poseen actividad detoxificadora (superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasa) (Chen 1997). Se sabe que *Entamoeba histolytica* posee microcuerpos con un sistema oxidativo independiente que contiene oxidasa y catalasa. Cuando los trofozoítos se encuentran con altas densidades de O_2 la oxidasa lo cataliza y produce H_2O_2 . Por otra parte la catalasa es capaz de transformar el H_2O_2 en O_2 intracelular que es uno de los más importantes aceptores de electrones en los organismos. Este O_2 es capaz de aceptar un electrón y reducirse al radical anión superóxido (O_2^-) que es extremadamente tóxico (Chen 1997). Por su parte la enzima superóxido dismutasa puede catalizar al O_2^- y producir H_2O_2 . En *Entamoeba histolytica* la peroxidasa y la catalasa pueden catalizar la reacción que forma O_2 y H_2O , a partir de H_2O_2 . El lumen del intestino grueso es esencialmente anaeróbico y mantiene un potencial de redox bajo lo que permite el establecimiento de los trofozoítos de *E. histolytica*; esta condición es obligatoria para el crecimiento adecuado *in vitro* del parásito (Babu y Rajeev 1999). Aunque se ha considerado a *E. histolytica* como un organismo anaerobio, se ha observado que este patógeno es tolerante a cierta tensión de oxígeno, y que inclusive, bajo ciertas condiciones, es capaz de consumirlo (Weinbach y Diamond 1974). Así, se ha observado que los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de soportar hasta 5% de oxígeno en fase gaseosa detoxificando los productos de la reducción del oxígeno en el medio (Band and Cirrito 1979).

Durante la invasión tisular los trofozoítos de *E. histolytica* se exponen a cantidades elevadas de especies reactivas de oxígeno (ROS) exógenas tales como los aniones radicales de superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los cuales son altamente tóxicos y por lo consiguiente deben de ser inactivados (Murray y cols., 1981; Clark y cols., 1986; Nathan y cols. 1979). Además, los trofozoítos de *E. histolytica* deben eliminar los ROS producidos por enzimas endógenas. La actividad de por lo menos dos enzimas, la dismutasa del superóxido que contiene hierro y la NADPH: flavina oxidoreductasa (Eh 34), resultan en la formación de H_2O_2 (Lo y Reeves 1980; Tannich y cols. 1991; Bruchhaus y Tannich 1995).

Con la finalidad de bloquear los ciclos de vida de algunos patógenos humanos, múltiples grupos han comenzado a estudiar a la Gln6Pi y el control de su expresión génica, como en el caso de *Giardia lamblia*. Con base en este tipo de estudios, se pueden realizar inferencias que ayuden a entender el proceso de enquistamiento en los patógenos, entre ellos *E. histolytica* dentro de su ciclo biológico, para encontrar la manera de bloquearlo y evitar su propagación. En este proyecto se propone la caracterización del gen de la Gln6pi de la amiba, así como su implicación en el proceso de enquistamiento en este parásito que tiene gran impacto en salud pública.

II. JUSTIFICACIÓN

Uno de los aspectos que aún continúa sin esclarecerse en el estudio de la amibiasis y de su agente causal, *E. histolytica*, es el relacionado con el enquistamiento y desenquistamiento de los trofozoítos. Actualmente no existe un método convincente y reproducible que resulte en la formación de quistes maduros e infectivos de este parásito. Debido a su papel esencial en la transmisión de la enfermedad, resulta de suma importancia el estudio de este proceso, de los aspectos relacionados a la ruta biosintética que culmina en la formación de la pared del quiste y del desarrollo de una metodología mediante la cual se puedan obtener quistes maduros de *E. histolytica in vitro*. Por otra parte, tampoco existe un modelo experimental *in vivo* donde se pueda reproducir la infección de manera natural y que nos ayude a entender la dinámica de la transmisión de la enfermedad. Por esta razón, en este trabajo se basa en el estudio del fenómeno de enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica* y de la participación de la enzima Gln6Pi en este proceso, ya que este tipo de estudios podría constituir la base para el desarrollo de nuevas estrategias que ayuden al control y erradicación de esta parasitosis.

III. HIPÓTESIS

La exposición *in vitro* de trofozoítos de *E. histolytica* a un estrés oxidativo en combinación con oligoelementos necesarios para la actividad de algunas enzimas en la ruta de enquistamiento, resultará en la formación de estructuras quísticas.

Ya que el enquistamiento de algunos protozoarios intestinales patógenos como *G. lamblia*, se inicia con la expresión de la Gln6Pi, es probable que este proceso en *E. histolytica* también sea dependiente de la expresión de esta enzima.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Inducir enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica* y evaluar a nivel molecular la participación de la enzima Gln6Pi de la amiba en la vía biosintética de la pared del quiste.

Objetivos particulares

- 1) Realizar ensayos de inducción del enquistamiento *in vitro* en trofozoítos de *E. histolytica*.
- 2) Evaluar la morfología de las estructuras obtenidas después de la inducción.
- 3) Evaluar la participación de la Gln6Pi durante el proceso de enquistamiento.
- 4) Caracterizar molecularmente el gen de la Gln6Pi.

V. MATERIAL Y METODO

ENQUISTAMIENTO

1.- Cultivo de *Entamoeba histolytica*

Trofozoítos axénicos de la cepa HM-1:IMSS, se cultivaron a 37°C en medio de cultivo TYI-S-33 suplementado con 10% de suero bovino adulto, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina (Diamond et al, 1978). Trofozoítos en la fase logarítmica de crecimiento (72 h), se desprendieron de la pared de las cajas de cultivo por enfriamiento en hielo durante 5 min, se contaron en un hematocitómetro y se ajustó el número de células para resembrar en presencia de los diferentes tratamientos (ver abajo).

2.- Ensayos para inducir el enquistamiento *in vitro* de trofozoítos de *E. histolytica*

Los trofozoítos cosechados se lavaron 3 veces con amortiguador PBS y su número se ajustó a 1×10^4 /ml en 20 ml de medio TYI-S-33 modificado para los ensayos de enquistamiento (Tabla-1) y se incubaron a 37°C.

Tabla 1. Medios TYI-S-33 modificados usados para la inducción de enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica* (*reportado para *G. lamblia*, **reportado para *E. invadens*).

Modificación al TYI-S-33	CONDICION
Bilis bovina*	Concentración desde 10^{-3} a 7.5% *
Depleción de Glucosa**	Medio sin glucosa
Variación del pH	5.0, 6.0, 6.2, 6.5, 7.0, 7.2, 7.5, 8.0

A continuación, algunos de los cultivos de trofozoítos en los medios modificados, se sometieron además a una serie de estímulos externos (Tabla 2) y en todos los casos, se observó la integridad y los cambios morfológicos de las amibas por microscopia de luz a diferentes tiempos post-cultivo (30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 16, 24, 48 y 72 h).

Tabla 2. Tratamientos adicionales para inducir enquistamiento *in vitro* en trofozoitos de *E. histolytica*.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN (ml / 1×10^5 cel)
Arginina	1, 10 y 100 μ g
Materia fecal (humano)	0.1, 1 y 10 mg
Peróxido de hidrógeno con oligoelementos ^a	1, 10 y 100 mM
Cloruro de Sodio	35, 70, 105, 140, 280, 560 y 700 mM

^a Peroxido de hidrógeno 30%, Cadmio 0.02 ppm, cobalto 0.02 ppm, cobre 0.02 ppm, fierro 0.1 ppm, niquel 0.02 ppm, plomo 0.02 ppm, zinc 0.02 ppm, Ac. Sulfurico libre 40 ppm, cloro 0.5 ppm, fosfato 5 ppm, SO₄ 2 ppm. (1 l= 1.11 kg)

Los trofozoítos post-tratados se sometieron a ensayos de resistencia a Sarcosil al 0.1%, Tritón al 0.5% y SDS al 0.5%, todos en PBS, durante lapsos de 10-15 min. Inmediatamente después del tratamiento con detergentes, se determinó la viabilidad de las estructuras obtenidas mediante tinción con Azul Tripano.

3.- Tinción con Calcoflúor blanco y análisis de fluorescencia

Los trofozoítos tratados que presentaron resistencia al tratamiento con los diferentes detergentes, se concentraron mediante centrifugación a 150 x g, durante 8 min y se lavaron tres veces con PBS. Del botón celular obtenido se tomó una gota y se colocó en

un portaobjetos. Inmediatamente después, se le colocaron unas gotas de hidróxido de sodio al 10% mezclando suavemente y finalmente se les añadieron algunas gotas de Calcoflúor Blanco M2R (Fluorescent Brightener 28-SIGMA, USA). La muestra se dejó reposar durante 10 min y se observó al microscopio de epifluorescencia con filtro BP350-460.

4.- Análisis de viabilidad con diacetato de fluoresceína (FDA)

Los trofozoítos tratados que presentaron resistencia al tratamiento con los diferentes detergentes, se concentraron mediante centrifugación a 150 x g, durante 8 min y se lavaron tres veces con PBS. A partir del botón obtenido se realizó un conteo en el hemocitómetro y se ajustó el número de trofozoítos tratados a 1×10^6 en 100 μ l de PBS. Posteriormente a estos trofozoítos tratados se les añadió 1.6 μ l de solución stock de diacetato de fluoresceína (10 mg FDA en 1 ml de acetona) y se incubaron durante 8 min. Para evaluar la incorporación del FDA al interior de las células se realizaron observaciones en un microscopio de epifluorescencia cada 2, 4, 6, 8 y 24 h.

5.- Ensayos de ELISA con aglutinina de gérmen de trigo (AGT)

Tiras de microtitulación de poliestireno se sensibilizaron con 100 μ l de una solución stock de AGT diluida en agua (50 μ g/ml) a 4°C toda la noche. Terminada la incubación se desechó el contenido de los pozos y se lavaron cinco veces con 300 μ l de PBS-Tween (0.05%) para remover los remanentes de la solución AGT. Los pozos se bloquearon con 300 μ l de 0.4 % de albúmina sérica bovina (ASB) en Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente. El contenido de los pozos se desechó y se lavaron tres veces con 300 μ l de PBS-Tween. Se agregaron a los pozos

100 µl de trofozoítos completos previamente tratados (tratamiento para inducir el enquistamiento, ver arriba) o extracto total de dichos trofozoítos obtenidos por sonicación, las placas se taparon y se colocaron en agitación lenta durante 2 h a temperatura ambiente y al término de la misma, se lavaron tres veces con 300 µl de PBS-Tween. Los pozos se incubaron con 100 µl de solución buffer de bloqueo conteniendo 1 µg/ml del conjugado AGT-HRP (Sigma L-3892) durante 15 min a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se vació el contenido de los pozos y se lavaron cinco veces con 300 µl de PBS-Tween. El revelado se realizó añadiendo 100 µl de TMB (5,5'-tetramethylbenzidine) (Aldrich 860336) y dejándose incubar durante algunos min en la obscuridad. La reacción se paró agregando 100µl de H₂SO₄ 1N. Esta reacción produce una coloración amarillenta que se monitoreó en un espectrofotómetro a 430 nm.

6.- Ensayos de infección en ratones C3H/HeJ

Trofozoítos tratados (inducidos al enquistamiento), se utilizaron para infectar vía oral a 10 ratones de la cepa C3H/HeJ de 4 a 6 semanas de edad, cepa que se conoce que es susceptible a la infección intestinal por amibas (Gosh, 1994). Los ratones se monitorearon diariamente durante 7 d pos-infección a través de la observación bajo microscopia de luz de muestras fecales en busca de trofozoítos o quistes de *E. histolytica*. El séptimo día post-infección, todos los ratones fueron sacrificados y se les analizó las características macroscópicas del ciego e intestino grueso (inflamación, neovascularización, moco, sangre, aerocolia), además de observaciones microscópicas del contenido intestinal. Fragmentos del ciego y de los intestinos gruesos extraídos se colocaron en medio TYI-S-33 para intentar recuperar trofozoítos.

7.- Extracción de ácidos nucleicos

El DNA genómico se extrajo a partir de trofozoítos de *E. histolytica* en fase log. Las células adheridas a la paredes de las cajas con medio de cultivo se desprendieron mediante enfriamiento en hielo durante 5 min y concentradas por medio de centrifugación a 200 x g durante 8 min. Seguido de la centrifugación, las células se resuspendieron en solución de lisis UNSET (Urea 8 M , Sarcosil 2 %, NaCl 0.15 M, EDTA 0.0001 M, Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5). Posteriormente, se agregó al extracto un volumen de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1) y se centrifugó a 850 x g durante 10 min; esta etapa se repitió dos veces pero utilizando un volumen de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1). La fase líquida obtenida se transfirió a un tubo limpio y se precipitó añadiendo 0.6 del volumen inicial de una solución de isopropanol (15:9). El DNA se concentró por centrifugación a 8000 x g durante 20 min. Al término de la centrifugación, se desechó el sobrenadante y el botón (DNA) se secó y se resuspendió en 1 ml de TE con 5 µg/ml de RNAsa, por cada 250 ml del cultivo original. El DNA se almacenó a -20°C.

La extracción de RNA de trofozoítos tratados (inducción de enquistamiento) y de trofozoítos no tratados, se realizó utilizando el reactivo de TRIZOL siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Invitrogen, USA).

8.- Diseño de primers y amplificación del gen y del promotor de la Gln6Pi

La secuencia de nucleótidos del gen de la enzima Gln6Pi, así como 2000 pb río arriba de su inicio, se identificaron en la base de datos del proyecto de secuenciación del genoma de *E. histolytica* en TIGR (The Institute of Genomic Research), mediante la comparación con secuencias de Gln6Pi de otras especies.

La secuencia completa del gen de la Gln6Pi se amplificó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con una $T_M=58^\circ\text{C}$ durante 35 ciclos en un Mastercycler gradient de Eppendorf, utilizando una DNA polimerase Platinum Taq (Invitrogen), a partir de DNA total de trofozoítos de *E. histolytica*, usando los primers: F-Bam-HI (5' AAGTGGATCCATGTCATCCACAAACGAAAATATTC) y R-Not-I (5' ATATGCGGCCGCAATAGACATGGATTATCATATC). Fragmentos de 280, 470 y 680 pb río arriba del inicio del gen (región promotora), fueron amplificados por PCR con una $T_M=52^\circ\text{C}$ durante 35 ciclos en un Mastercycler gradient de Eppendorf, utilizando una DNA polimerase Platinum Taq (Invitrogen), a partir de DNA total de trofozoítos de *E. histolytica*. Para la amplificación se diseñaron cuatro primers (Tres Forward y un Reverse) río arriba del inicio del gen: -280 con un sitio Pst-I (5' AAAACTGCAGGACATTATCAAGTTCATCAA); -470 con un sitio Pst-I (5' AAAACTGCAGGTTGAATAGGTTGACTTTTT); -680 con sitio Pst-I (5' AAAACTGCAGTTCACCTCTCTTCGTC) y un primer reverse con un sitio de restricción Hind III (5' CCAAGCTTAATATTTTCGTTTGTGGATGACAT).

9.- RT-PCR

Los niveles de RNAm de la Gln6Pi se determinaron a partir de RNA total extraído de trofozoítos tratados (inducción de enquistamiento) y trofozoítos no tratados, mediante RT-PCR, utilizando el Kit Super Script III One-Step (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En breve, se utilizó 0.4 μg de RNA total para la reacción de RT-PCR, utilizando un Mastercycler gradient by Eppendorf, con una $T_M=58^\circ\text{C}$ durante 35 ciclos y los amplificados resultantes se corrieron en un gel de agarosa al 1%. Como control de contaminación con DNA, se corrió una amplificación

con los mismos primers (ver arriba), usando un DNA polimerasa en ausencia de la transcriptasa reversa.

10.- Clonación de fragmentos del promotor

Los productos obtenidos del PCR de la secuencia promotora, fueron digeridos utilizando las enzimas de restricción Pst I y Hind III como lo indica el fabricante (Invitrogen, USA). Los productos digeridos se clonaron en el vector pBSCAT con cassettes de resistencia a neomicina y ampicilina mediante ligación (T4 ligasa) a los sitios PstI/Hind III del plásmido cortado con dichas enzimas. Las construcciones obtenidas (pBSCAT:280, pBSCAT:470 y pBSCAT:680) fueron utilizadas para transformar células competentes BL-21 (Invitrogen, USA) mediante choque térmico (42°C por 1 min). Las células transformadas se plaquearon en cajas petri con medio LB-agarosa conteniendo antibiótico (100 µg/ml ampicilina). Una colonia de bacterias transformadas de cada construcción se picó y se sembró en 50 ml de medio LB (150 µg/ml ampicilina). Para la obtención de una gran cantidad de copias de los plásmidos, los cultivos iniciales se expandieron en 4 L de medio LB (150 µg/ml ampicilina) y se colocaron en agitación constante a 37°C toda la noche. La purificación de los plásmidos, se realizó utilizando el Kit QIAprep Plasmid Mega (Qiagen) como lo describe el fabricante (lisis alcalina). La determinación de la concentración de los plásmidos se hizo a 260 nm en un espectrofotómetro y por corrimiento en geles de azarosa.

11.- Secuenciación

La secuenciación de todas las construcciones y de la secuencia completa de la Gln6Pi se realizó utilizando un equipo ABI PRISM 310, Applied Biosystems.

12.- Alineamiento y análisis estructural del promotor

El grado de homología de la enzima (Gln6Pi), con respecto a las de otros organismos se determinó mediante un alineamiento de secuencias con los programas Blastn, Blastp y LALIGN (EXPASY, Molecular Biology tools).

Para iniciar la búsqueda de elementos relacionados con la transcripción del gen de la Gln6Pi de *E. histolytica*, se realizó un análisis computacional del promotor (-680pb) utilizando el programa TF-SCAN. Los factores transcripcionales *cis* involucrados en la expresión del gen de la Gln6Pi se determinaron por homología con aquellas secuencias consenso conocidas.

13.- Ensayos de actividad de la clorafenicol acetil transferasa (CAT)

Trofozoítos en fase logarítmica cultivados en medio TYI-S-33, se desprendieron de las paredes de la caja de cultivo por medio de enfriamiento en hielo durante 10 min y fueron centrifugados a 300 x g a 4°C durante 10 min. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con PBS pH 6.8, una vez con buffer citomix incompleto (KCl 120 mM, CaCl 0.15 mM, K₂HPO₄ 10 mM pH 7.6, Hepes 25 mM, EGTA 2 mM) y centrifugadas a 270 x g durante 5 min. Después de la centrifugación, el botón de trofozoítos se resuspendió en 0.8 ml de citomix suplementado con ATP 10 mM y glutatión 4 mM. A partir de esta mezcla se tomaron 1 x 10⁶ trofozoítos y se colocaron con 100 µg de las construcciones plasmídicas (pBSCAT:280, pBSCAT:470 y pBSCAT: 680) por separado en una cubeta de electroporación (4-mm) (ECU-104, EQUIBIO). Las electroporaciones se realizaron con un equipo BioRad Gene Pulser II a 1.2 KV (25 µF) con un tiempo constante de 0.4 mseg. Las células (transfectadas) se

resuspendieron en medio fresco TYI-S-33 en presencia de G418 (neomicina) (150 µg/ml) y se incubaron a 37°C para la selección durante 48 h.

Obtención del extracto celular: después de la selección con neomicina, los trofozoítos transfectados se lavaron dos veces por centrifugación y el botón resultante se resuspendió en 100 µl de amortiguador de lisis (Triton 0.5% y Tris HCl 0.5 mM pH 7.6). El lisado obtenido fue diluído con 100 µl de Tris HCl 0.25 M pH 7.6 y centrifugado a 16000 x g durante 5 min. El extracto clarificado obtenido se incubó durante 10 min a 67°C y se centrifugó a 16000 x g durante 5 min; la concentración de proteínas totales se determinó mediante un ensayo de Bradford.

Ensayo de difusión en dos fases: un total de 100 µg del extracto clarificado se incubó con 200 µl de cloranfenicol 1.25 mM, 10 µl de Butiril coenzima A marcada con ¹⁴C (4.15 mCi/mM NEN) y líquido de centelleo (PPO 3 g, POPOP 0.15 g y 500 ml de Tolueno). Las mediciones se realizaron en un contador de centelleo Wallac 1409 DSA (Pekín Elmer) a 0, 4, 6 y 8 h pos-incubación a 37°C.

14.- Microscopía electrónica de transmisión

Los trofozoítos tratados (inducidos al enquistamiento) se lavaron tres veces con PBS pH 7.4. Las células lavadas y concentradas se resuspendieron en Karnowsky (Formaldehído y Paraformaldehído) y se incubaron durante 72 h a 4°C. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron con solución de cacodilato de sodio 0.1 M y se dejaron incubando durante 1 h. Al término de la incubación se agregaron unas cuantas gotas de Tetróxido de Osmio 1% en solución amortiguadora de Zelterqust. Las células se deshidrataron mediante tratamiento con alcoholes graduales (70, 80, 90, 95 y 100%), dos cambios durante 10 min cada uno; los cambios de 100% en lapsos de 20 min y los dos últimos

cambios se realizaron con acetronitilo durante 20 min c/u. Las muestras se incubaron con EPON : óxido de propileno (1:1 y 2:1) durante 1 h (c/u). Se añadió EPON puro y se colocó las muestras en moldes adecuados a 60 °C durante 24 h. Los cortes finos se realizaron utilizando navaja de diamante en microtomo.

15.- Microscopia electrónica de barrido

Trofozoítos tratados (inducidos a enquistamiento) se lavaron tres veces con PBS pH 7.4. y se fijaron añadiendo formaldehído al 10 % e incubando durante tres días. Las células se deshidrataron utilizando alcoholes graduales 50, 60, 70, 80 y 90% (24 h c/u) y 100% (48 h c/u); al termino de las incubaciones, las células se resuspendieron en acetona pura. Por último, las muestras se colocaron en un secador a punto crítico, se montaron en laminillas y se impregnaron con oro durante 20 min para realizar las observaciones correspondientes.

VI. RESULTADOS

1. Ensayos para inducir el enquistamiento *in vitro* de trofozoítos de *E. histolytica*

Con la finalidad de inducir enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica*, trofozoítos fueron cultivados en medios modificados y en presencia de múltiples estímulos, como esta reportado para *G. lamblia* y *E. invadens*. El cultivo de los trofozoítos en medio depletado de glucosa, con bilis, con variaciones de pH y concentración de sales, así como el cultivo de los mismos en presencia de asparagina y materia fecal humana, no mostró ningún indicio de transformación de los trofozoítos a estructuras quísticas, aunque cabe resaltar que un bajo porcentaje de trofozoítos sometidos a estos tratamientos, mostraron un ligero aumento en el número de vacuolas presentes en el citoplasma, en una proporción menor al 20% en el caso de la asparagina y los tratamientos con heces, mientras que en los tratamientos con bilis bovina, este porcentaje fue mayor al 60% con respecto al total de los trofozoítos tratados (Tablas I a III). Por otra parte, en la mayoría de estos tratamientos, se observó que los trofozoítos mueren rápidamente, indicando que son altamente sensibles a variaciones en el medio de cultivo. Así mismo, los trofozoítos tratados bajo estas condiciones, cuando son expuestos al sarcosil 0.1%, triton 0.5% y al SDS 0.5%, se lisan inmediatamente por la acción de dichos detergentes (Tablas I, II y III). Sin embargo, el tratamiento con 100 mM peróxido de hidrógeno, mas los oligoelementos presentes en el preparado (reactivo conteniendo peróxido de hidrógeno 30%, cadmio 0.02 ppm, cobalto 0.02 ppm, cobre 0.02 ppm, fierro 0.1 ppm, níquel 0.02 ppm, plomo 0.02 ppm, zinc 0.02 ppm, Ac. sulfúrico libre 40 ppm, cloro 0.5 ppm, fosfato 5 ppm, SO₄ 2 ppm. (1 L= 1.11 kg) resultó en la formación de estructuras redondeadas, con refringencia parcial y que mostraron ser resistentes al tratamiento con los diferentes detergentes (Tabla IV, Fig 14) a partir de

las 2 h de tratamiento. El índice de transformación, concebido como el porcentaje de los trofozoítos resistentes a los tratamientos con detergentes, fue de 10% a las 2 h post-tratamiento, mostrando un aumento gradual en las siguientes tres horas hasta llegar a un máximo de 30% entre 4 y 8 h, y posteriormente decaen de manera gradual hasta llegar a 1% a las 24 h (Tabla IV, V y VI). El análisis de la integridad de la cubierta realizado mediante la incorporación de azul de tripano, no se pudo realizar en los ensayos donde se utilizó la bilis, la asparagina y las heces, ya que los trofozoítos obtenidos post-tratamiento, fueron lisados en presencia de los detergentes (como se mencionó anteriormente); sin embargo, los ensayos realizados con 100 mM de peróxido de hidrógeno más los oligoelementos, muestran que solo algunas de las estructuras obtenidas después del tratamiento incorporaron el colorante en su interior. La incorporación del colorante que fue del 10% a las 2 h post-tratamiento y aumentó en función del tiempo hasta llegar a 90% a las 72 h. Los tratamientos que incluyeron el peróxido de hidrógeno y los oligoelementos (150 y 200 μM), mostraron un comportamiento similar, aunque con un mayor índice de células que incorporaron el azul de tripano en función del tiempo; los porcentajes fueron de 15% (2 h) a 100% (72 h) y de 10% (2 h) a 100% (72 h) respectivamente (Tabla IV), sugiriendo que la exposición prolongada de las estructuras al H_2O_2 resulta, después del enquistamiento, en la degeneración de la pared quística y muerte celular.

Tabla I. Efecto del tratamiento con bilis sobre parámetros morfológicos y de resistencia relacionados con enquistamiento en *E. histolytica*.

Tratamiento	Tiempo	Morfología	Resistencia a detergentes	Daño en la cubierta (azul tripano)	Índice de Transformación (%)
Bilis 1 µg/ml	1-72 h	Aumento en la vacuolaridad (>60 % de los trofozoítos)	No	0% (1h) 100% (72h)	0
Bilis 10 µg/ml	1-72 h		No		0
Bilis 100 µg/ml	1-72 h		no		0

Tabla II. Efecto del tratamiento con aspargina sobre parámetros morfológicos y de resistencia relacionados con enquistamiento en *E. histolytica*.

Tratamiento	Tiempo	Morfología	Resistencia a detergentes	Daño en la cubierta (azul de tripano)	% de Transformación
Aspargina 1 µg/ml	1-72 h	Trofozoítos normales, aumento en el # de vacuolas (<10% con respecto al total)	no	0% (1h) 100% (72h)	0
Aspargina 10 µg/ml	1-72 h		no		0
Aspargina 100 µg/ml	1-72 h		no		0

Tabla III. Efecto del tratamiento con heces sobre parámetros morfológicos y de resistencia relacionados con enquistamiento en *E. histolytica*.

Tratamiento	Tiempo	Morfología	Resistencia a detergentes	Daño en la cubierta (azul de tripano)	% de Transformación
Heces 0.1 mg/50ml TYI-S33	1-18 h	Trofozoítos agregados con forma redonda, aumento en el # de vacuolas (<20% con respecto al total)	No	0% (1h) 100% (18h)	0
Heces 1 mg/50 ml TYI-S33	1-18 h		No		0
Heces 10 mg/50 ml TYI-S33	1-18 h		No		0

Tabla IV. Efecto del tratamiento con peróxido de hidrógeno mas oligoelementos sobre parámetros morfológicos y de resistencia relacionados con enquistamiento en *E. histolytica*.

Tratamiento	Tiempo	Morfología	Resistencia a detergentes	Daño en la cubierta (azul de tripano)	% de Transformación
100 μM	1-72 h	Redondos, refringentes, aumento de vacuolas (>60% de trofoz) y algunos multinucleados	Si	10% (2h) 90% (72h)%	10-30 %
150 μM	1-72 h	Redondos, refringentes, aumento de vacuolas (>60% de trofoz) y algunos multinucleados	Si	15% (2h) 100% (72h)	5-10%
200 μM	1-72 h	Redondos, refringentes, aumento de vacuolas (>80% de trofoz) y algunos multinucleados	Si	10% (2h) 100% (72h)	1-5%

*Oligoelementos: Cadmio 0.02 ppm, cobalto 0.02 ppm, cobre 0.02 ppm, fierro 0.1 ppm, níquel 0.02 ppm, plomo 0.02 ppm, zinc 0.02 ppm, Ac. Sulfurico libre 40 ppm, cloro 0.5 ppm, fosfato 5 ppm, SO₄ 2 ppm (1 ppm=1mg/L).

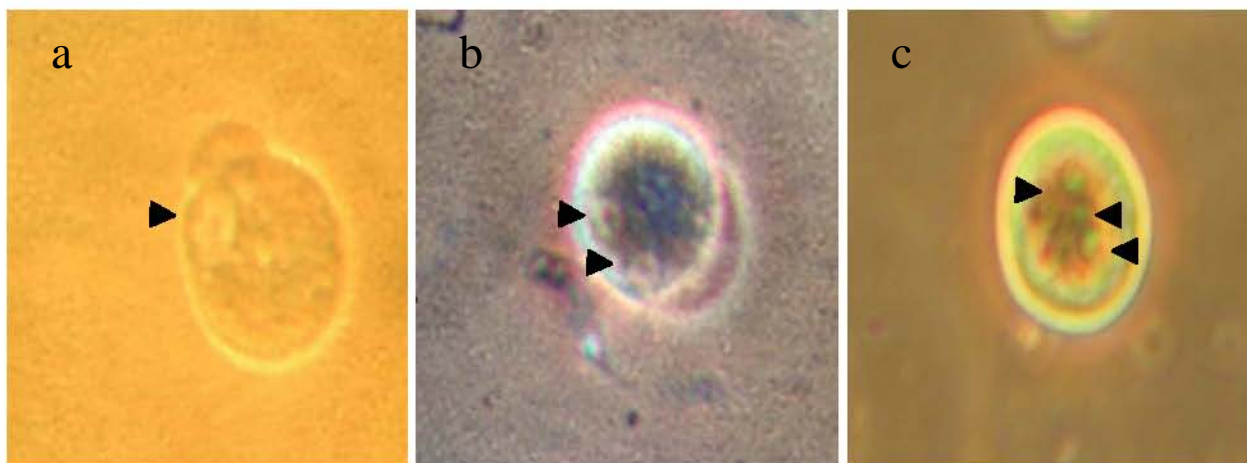


Fig 14. Microscopía de luz de trofozoítos de *E. histolytica* tratados con peróxido de hidrógeno mas oligoelementos y resistentes al tratamiento con diferentes detergentes (Sarcosil 0.1 %, Triton 0.5% y SDS 0.5%). Se observa estructuras redondeadas, refringentes y con uno (a), dos (b) y tres (c) núcleos (Cabeza de flechas). b y c fueron tratados con azul de tripano.

2. Tinción con Calcoflúor blanco y análisis de fluorescencia

Para determinar la presencia de quitina en las estructuras tipo quiste obtenidas, los trofozoítos tratados y resistentes al tratamiento con detergentes se tiñeron con Calcoflúor blanco M2R (Fluorescent Brightener 28-SIGMA), una sal disódica del ac. 4,4-bis-[4-anilino-bis-dietilamino-5-triazino-2-ilamino]-2,2 estilbeno-disulfónico, capaz de unirse a los polisacaridos con enlace β 1-3 y enlace β 1-4 (p. ejemplo la celulosa y la quitina), produciendo fluorescencia verde o blanco azulado al exponerse a la luz ultravioleta de longitud de onda corta.

Se observó que las estructuras tipo quiste se tiñen con una marcada fluorescencia blanco azulado, similar a la hifas de *Aspergillus sp*, usado como control positivo. Por el contrario, trofozoítos sin tratar (control negativo) no mostraron fluorescencia alguna. Los mejores resultados en cuanto a fluorescencia, lo presentaron las muestras que fueron tratadas con peróxido de hidrógeno más los oligoelementos durante 4 h (Fig. 15).

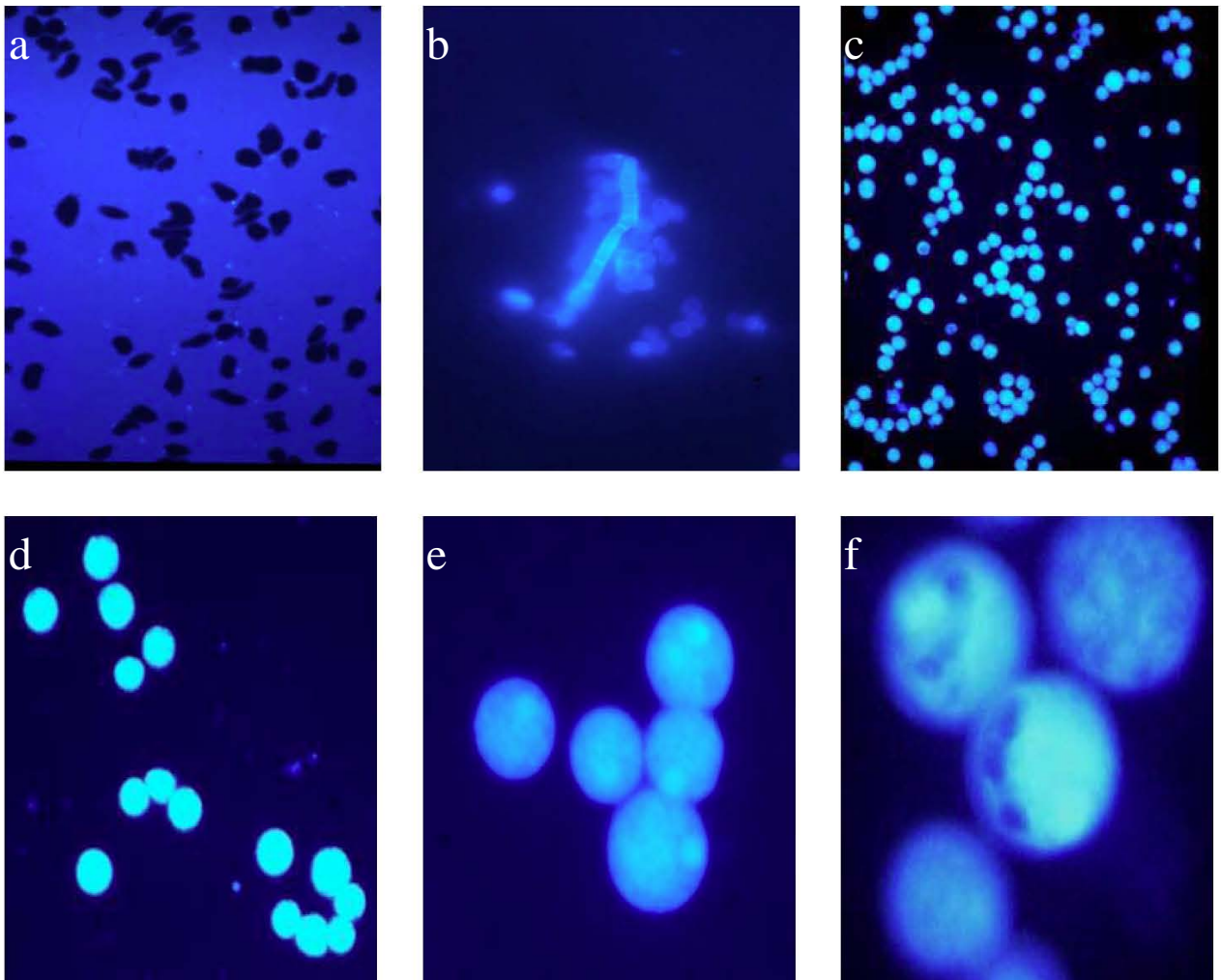


Fig 15. Trofozoítos de *E. histolytica* teñidos con calcoflúor blanco después del tratamiento con peróxido de hidrógeno mas oligoelementos y detergentes. a) trofozoítos sin tratar (control negativo); b) *Aspergillus* sp. (control positivo); c-f) trofozoítos tratados y teñidos (10, 20, 40 y 100 X, respectivamente).

3. Ensayos de ELISA con aglutinina de gérmen de trigo (AGT)

Para evaluar de manera semicuantitativa la presencia de quitina en las estructuras obtenidas resistentes al tratamiento con los diferentes detergentes, se realizó un ELISA tipo sándwich utilizando la aglutinina del germen de trigo AGT (germ agglutinin wheat, WGA-Sigma L-9640), lectina que tiene alta afinidad específica por los polímeros de *N*-acetil-glucosamina que forman la quitina. El análisis de los resultados mostró que cuando se compara el control (CN) versus trofozoítos tratados (TTI) y cuando se compara el control (CN) contra los trofozoítos tratados sonicados (TTS), existen

diferencias significativas entre los grupos comparados (Mann-Whitney U Test, Statistica V6), $p=0.000001$ (< 0.05000). Cabe resaltar que los trofozoítos tratados íntegros, presentan un mejor rendimiento a diferencia de los trofozoítos tratados sonicados. (Fig 16).

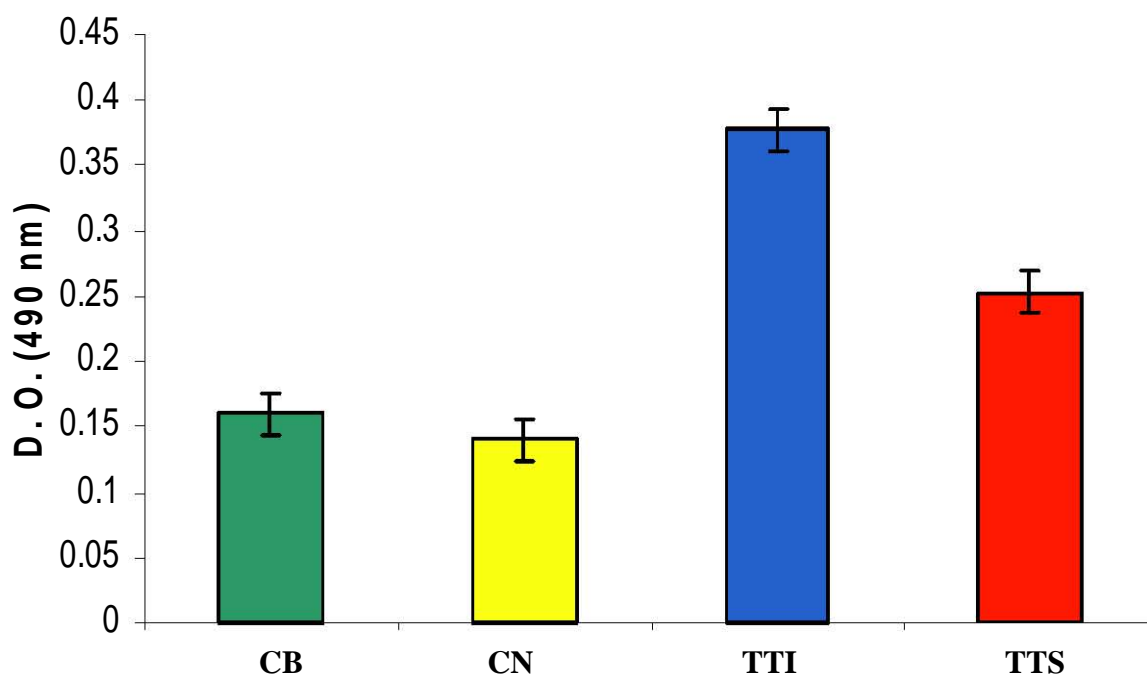


Fig 16. Resultados del ELISA con la AGT de trofozoítos tratados con peróxido de hidrógeno más oligoelementos. CB: control de reactivos; CN: trofozoítos sin tratamiento; TTI: trofozoítos tratados íntegros; TTS: trofozoítos tratados sonicados ($P < 0.005$).

4. Ensayos de viabilidad con Diacetato de fluoresceína FDA

Para determinar la viabilidad de las estructuras tipo quíste obtenidas después del tratamiento con peróxido de hidrógeno más oligoelementos, las células se trataron con diacetato de fluoresceína (FDA), reactivo que produce una coloración (fluorescencia), producto de la actividad de enzimas estererasas dentro de la célula; este compuesto no polar penetra hasta el citoplasma donde se lleva a cabo la reacción enzimática (Huang 1986), además ha sido utilizado por varios grupos para determinar la viabilidad en quistes de *Giardia* (Smith 1989 y Tiritá 1998). Este análisis reveló que las estructuras

tipo quiste obtenidas, presentan fluorescencia positiva a las 2, 4 y 6 h post-tratamiento, hasta de 90 % del total de las células (Fig 17); sin embargo, en las revisiones después de transcurridas 8 h se observó una caída en el número de células con fluorescencia a 95%, caso similar a las 24 h donde definitivamente no se observó fluorescencia en el 100% de las células (Fig 17). Estos resultados sugieren al igual que los de incorporación de azul de Tripiano, que las estructuras tipo quiste obtenidas, permanecen viables alrededor de las primeras 6 h post-tratamiento, pero que la exposición prolongada al H_2O_2 daña su cubierta y les induce la muerte a partir de las 8 h (Fig 17).

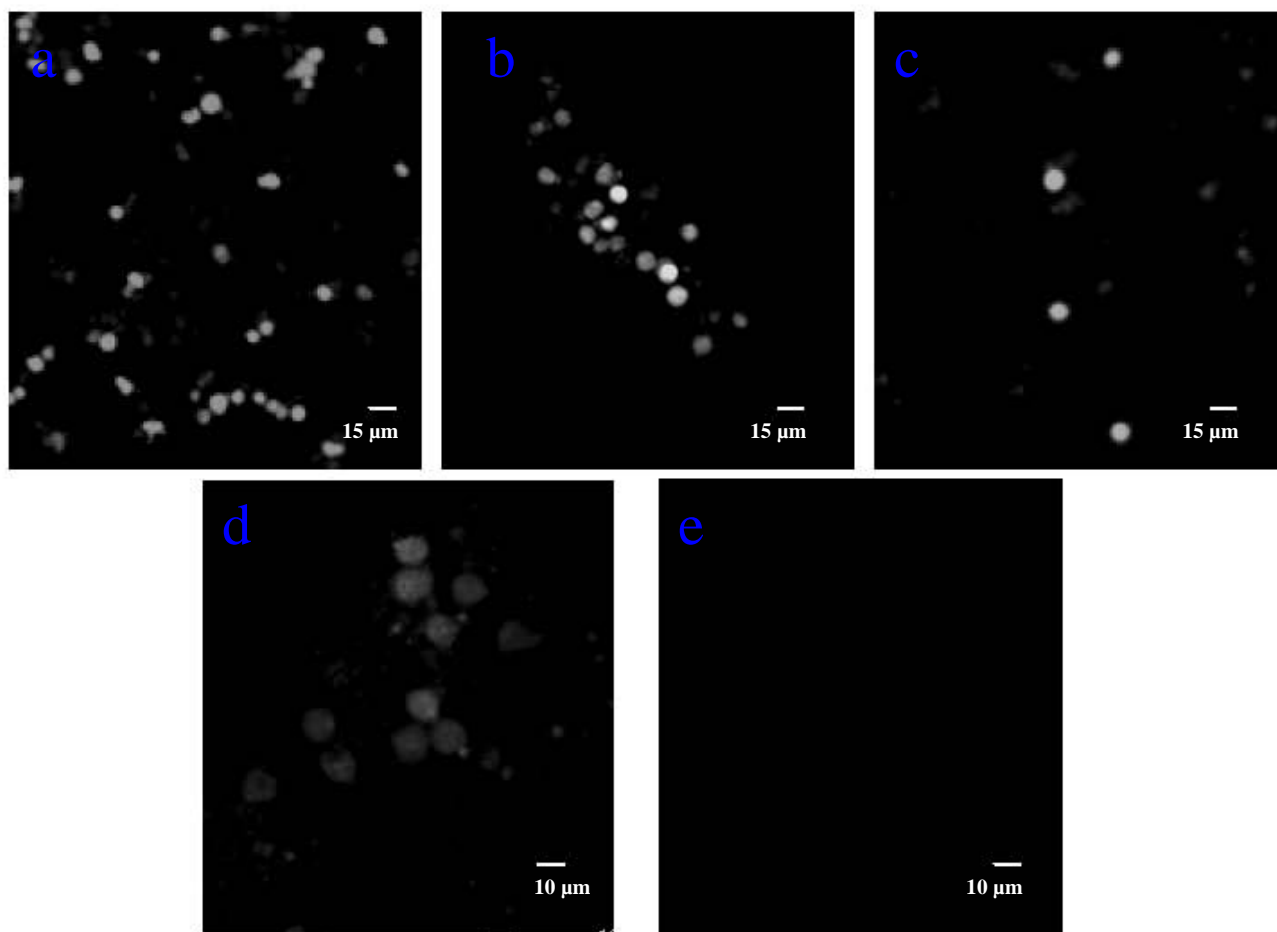


Fig 17. Ensayo de viabilidad (FDA) en trofozoítos tratados con peróxido de hidrógeno más oligoelementos. a) 2 h; b) 4 h; c) 6 h; d) 8 h; e) 24 h.

5. Ensayos de infección en ratones C3H/HeJ

Para determinar la capacidad infectiva de las estructuras tipo quiste obtenidas mediante los tratamientos con peróxido de hidrógeno mas los oligoelementos, se infectaron vía oral ratones de la cepa C3H/HeJ, que se ha observado son susceptibles a la infección con *E. histolytica*, cuando los trofozoítos son inoculados intracecalmente en el ratón (Gosh 1994). El análisis por microscopía de luz de las muestras de materia fecal obtenidas cada 24 h a partir del primer día de inoculación, no mostraron indicios de trofozoítos y/o quistes que se hubieran establecido en el intestino del animal. Por otra parte, el análisis *post-mortem* del contenido intestinal al microscopio (ratones sacrificados 7 días post-infección), no mostró presencia de trofozoítos; sin embargo, algunas de las secciones del intestino evaluadas, mostró ligera inflamación así como flatulencia. Además, los intentos de recuperación de trofozoítos a partir de fragmentos del intestino de los ratones infectados en medio de cultivo para la amiba resultaron infructuosos (datos no mostrados). En general, todos estos datos sugieren que la infección intestinal con las estructuras de resistencia no se pudo establecer en el modelo animal utilizado.

6. Amplificación del gen y del promotor de la Gln6Pi

El corrimiento del producto de PCR obtenido de la amplificación de la secuencia codificadora de la Gln6Pi resultó en una banda de aproximadamente 2019 pb, que corresponde al peso teórico esperado para la Gln6Pi de *E. histolytica* (Fig.18). De igual forma, se amplificaron los fragmentos correspondientes a -280, -470 y -680 pb de la región promotora del gen de la Gln6Pi (Fig 19). El análisis de la secuenciación del producto de PCR de la secuencia completa de la Gln6Pi, así como de los fragmentos de

la región promotora (-280,-470 y -680 pb) mostraron que todas la secuencias obtenidas corresponden a la Gln6Pi de *E. histolytica* de acuerdo a lo reportado en la base de datos de la amiba.

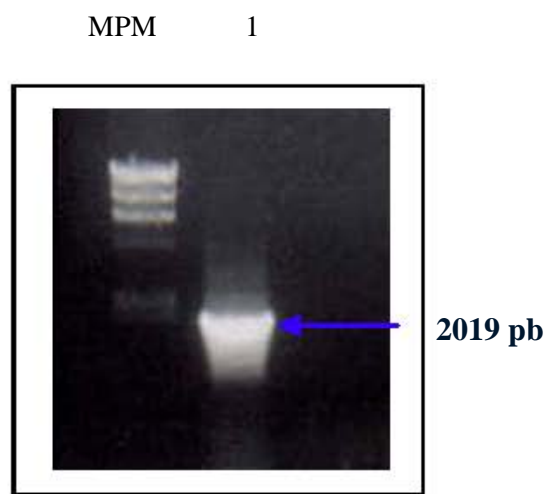


Fig 18. Producto de PCR obtenido de la amplificación de la Gln6Pi de *E. histolytica*. MPM. Marcador de pesos moleculares; carril 1: Gln6Pi (2019 pb).

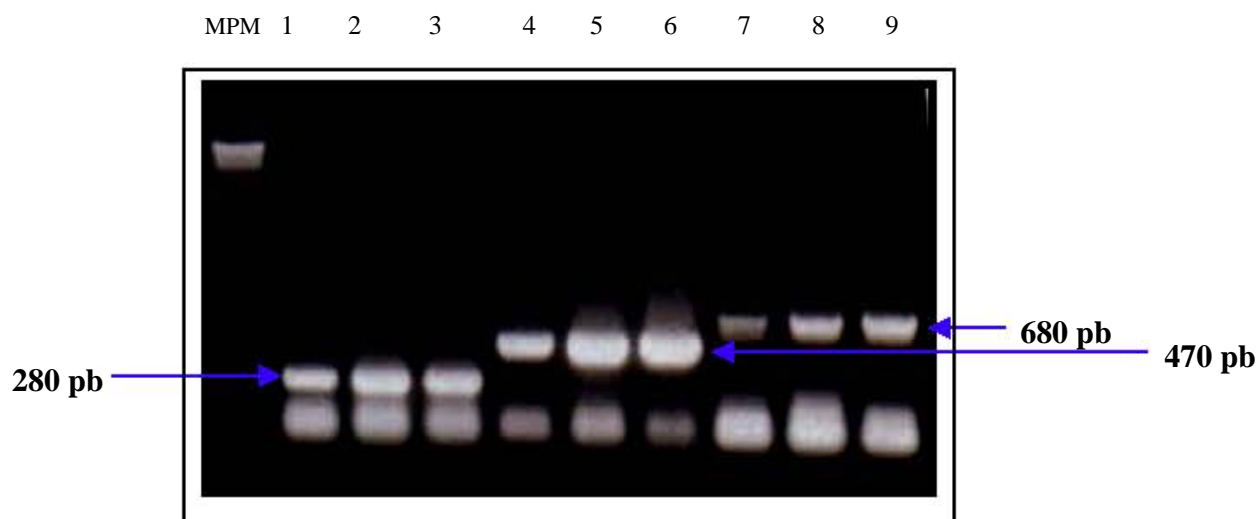


Fig 19. productos de PCR obtenidos de la amplificación de la secuencia promotora de la Gln6Pi de *E. histolytica* MPM. Marcador de pesos moleculares; carriles 1- 3 secuencia promotor Gln6Pi 280; carriles 4- 6 secuencia promotor Gln6Pi 470; carriles 7- 9 secuencia promotor G6Pi 680

7. RT-PCR de Gln6Pi en trofozoitos tratados y no tratados

El nivel de expresión basal de la Gln6Pi se determinó mediante RT-PCR en trofozoitos no tratados, a partir de RNA total obtenido de los mismos. Los resultados muestran una banda de aproximadamente 2019 pb que corresponde a la banda obtenida por PCR del gen de la enzima utilizada como control (Fig 20) y que demuestra que la enzima se expresa de manera basal en el estado de trofozoito de *E. histolytica*.

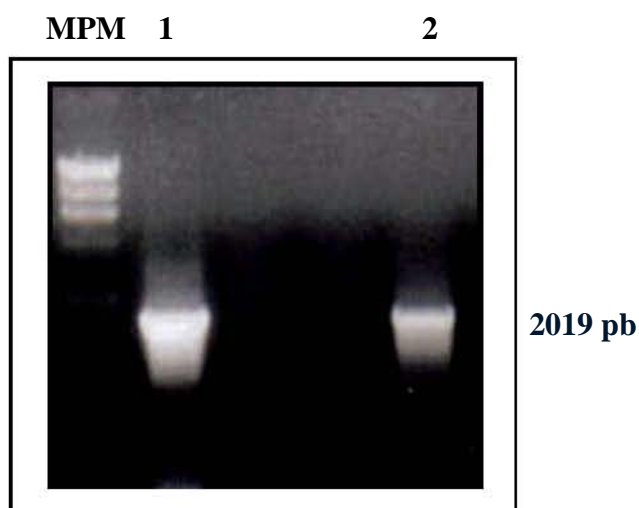


Fig 20. RTPCR de la secuencia completa de la Gln6Pi de *E. histolytica*. MPM: marcadores de pesos moleculares; carril 1: PCR Gln6Pi; carril 2: RT PCR Gln6Pi.

Para evaluar la sobre-expresión del RNAm del gen de la Gln6Pi en trofozoitos tratados con peróxido de hidrógeno y oligoelementos, se realizó un RT-PCR a partir de RNA total de las estructuras obtenidas postratamiento. Los resultados del análisis de densitometría, muestra un incremento de 1.5 veces en los niveles de mensajero del gen de la Gln6Pi en el RNAm total extraído de las estructuras obtenidas después del tratamiento con peróxido de hidrógeno y oligoelementos, en comparación con el RNAm de quistes maduros de *E. histolytica* aislados de materia fecal humana y de 5.15 veces, en comparación con los niveles de expresión basal de los trofozoitos no tratados (Fig 21 y Tabla V).

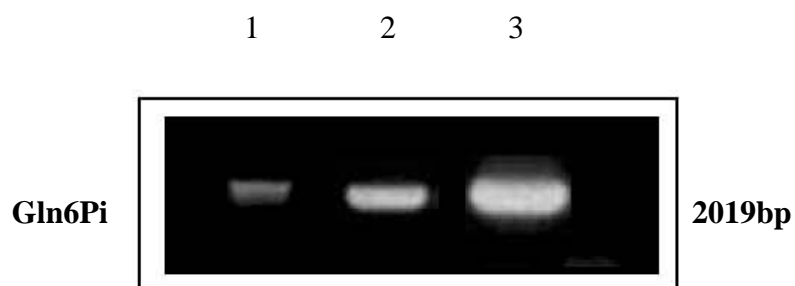


Fig 21. Evaluación de los niveles de expresión de la Gln6Pi de *E. histolytica*. Carril 1; Trofozoítos no tratados; carril 2: quistes, carril 3; trofozoítos tratados.

Tabla V. Análisis densitométrico de la expresión del mensajero de la Gln6Pi de *E. histolytica* en trofozoítos tratados con peróxido de hidrógeno y oligoelementos, comparado con la expresión en quistes y trofozoítos no tratados.

	Densidad Óptica	Niveles de Expresión
Trofozoitos Tratados	2.42	5.15 X
Quistes	1.58	3.3 X
Trofozoitos no Tratados	0.47	1 X

El gen del factor de ribosilación dependiente de ADP (ARF) utilizado como control de expresión constitutivo, mostró una expresión basal similar en trofozoítos tratados y no tratados, en cambio en quistes maduros no hay expresión (Fig 22).

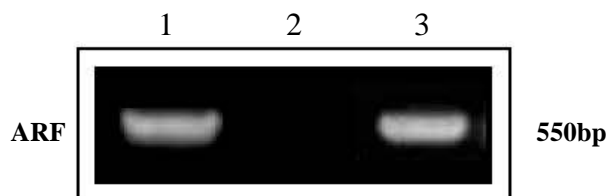


Fig 22. Expresión del gen constitutivo. 1. trofozoítos no tratados, 2. quistes, 3. trofozoítos tratado.

8. Alineamiento y análisis estructural del promotor

El análisis de alineamiento de la secuencia de aminoácidos (deducido de la secuencia de nucleótidos) realizado mediante el programa LALIGN-Expasy (ch.EMBnet.org) revela que la Gln6Pi de *E. histolytica* posee alta homología con las enzimas de otros organismos, procariontes y eucariontes uni y pluricelulares. Esta homología va desde el 89.7% con *Entamoeba moshkovskii* hasta un 39.9% de homología con la enzima de *Escherichia coli* (Tabla VI).

Tabla VI. Análisis de alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la Gln6Pi de *E. histolytica* con enzimas de otros organismos

	<i>Entamoeba moshkovskii</i> (Emb CAI 11391.1)	<i>Entamoeba invadens</i> (Emb CAI 11390.1)	<i>Giardia lamblia</i> (Ref XP 778828.1)	<i>Typanosoma cruzi</i> (Ref XP 812288.1)	<i>Trichomona vaginalis</i> (Emb CAI 11393.1)	<i>Mus musculus</i> (Ref NP 752683.1)	<i>Escherichia coli</i> (Ref NP 752683.1)
<i>Entamoeba histolytica</i> (Ref XP 653317.1)	89.7%	74.8%	43.8%	42.3%	45.6%	40.8%	39.9%

El análisis computacional de la región promotora mediante el programa TFSCAN muestra varios elementos en *cis* que posiblemente estén involucrados en la transcripción del gen. En los primeros 200 pb río arriba del ATG, encontramos el YY-1 a -5 pb del ATG, el GATA-1 a -26 pb y el AP-1 a -57 pb, además, también se presentan elementos clásicos de control transcripcional como las cajas TATA (-187 y -199 pb del ATG respectivamente) y por encima de las 500 pb río arriba del ATG, encontramos elementos como son el C/EBP, que se encuentra a -592 pb del ATG, el GATA, que se encuentra a -26 y el elemento SRY-1 hallado a -658 pb río arriba del ATG (Fig 23).

TTCAC TTCCTTCGTTCTTCCTTTTTCCGAATTTGTCTATACAACGATCATCAATTTCTTCGTTTTCTTTTATTCCTTTTTGTGTTGAGACATTAAT
 CTTCAATTGTTTTTTCTGTTGAGCAACAAACATTTCTCATTAAATTTGTTGTCATTTTCAGGTGTTAAATTGGAAAATTTGGGTTTGTGAATATTTGATACTGATT
 GTTGAATAGGTTGACTTTTTCCAACATTAACCTGTTCACTTTCTTTGGGTTGTTGTTAAGTTTTGTACTTTTTCTCAATATTCTTAGACACTTTTTCTAATTG
 TTCTTGATATGATTTCTTCATGTTTCGTTGTTTCATCTAAAACATAATCATTATTTCTTTTATTCCTTTTCTTTTAAATACTTTTCAAGATTAATAAATAACATGAATA
 GACATTATCAAGTTCATCAAAACTCAAAAATAAAAATTTGTTATAAATAACAATTTATAAACTAAACGAAGACGTGGTTAAAAATAATGATGAGTTGTAATCTATCA
 TAAAACAGAAAATAAGAGAAGGAATTTGAAGTAAAAAGAATATAAGGAAATTAAAAAAAGACTTCTAATCATTCTAGTGAGTCACCTCCAAAACCTAAGAGGG
 TTTTGGATAAAAAGAAATATACCTTATTTGCAAAACATGTCATCCACAAACGAAAATATCCCAACCAATAGTTCGTGACATTAAGTTATGTCAAAACGAAC
 ATATCCAACAAAAGTCTATAAAAACAAGTAATGAAGCAAGTATAGCTGCTGCACATGAAATTATTGATTTAATCAAAGCTAAAAATGGACATGCAGTATTAGGA
 TTAGCTACAGGATCAACTCCAACCTGC

Fig 23. Análisis computacional del promotor de la Gln6Pi utilizando el programa TFSCAN. Los elementos encontrados fueron: YY1 (Ying-Yang); GATA-1 (caja GAGATA); AP-1 (Activador de la proteína 1); TATA (Caja TATAA); C/EBP (CCATT/enhancer binding protein); Oct-3 (Octamer binding protein-3); SRY- 1 (caja: sex-región- chromosome Y)

9. Ensayos con el gen reportero (actividad de CAT)

Para determinar a groso modo la presencia de elementos necesarios para llevar a cabo la transcripción del gen de la Gln6Pi, se realizaron delecciones por PCR (Δ -680/-470; Δ -680/-280) de la región promotora y se clonaron en presencia del gen reportero de la cloranfenicol acetil transferasa CAT. Los resultados obtenidos mostraron que la región de -680 pb y la de -470 pb clonadas a partir del promotor, poseen actividad en trofozoítos tratados y no tratados (Fig 23, 24), sin embargo se observó que esta actividad se encuentra aumentada en los trofozoítos tratados, ya que las cuentas por minuto (CPM) fueron en un rango aproximado de 13 000 a 20 000 (Fig 25), en cambio en los trofozoítos no tratados fue de 800 a 1000 CPM (Fig 24). Por otra parte el fragmento de 280 en ambos casos (tratados y no tratados), no mostró actividad (Fig 24, 25).

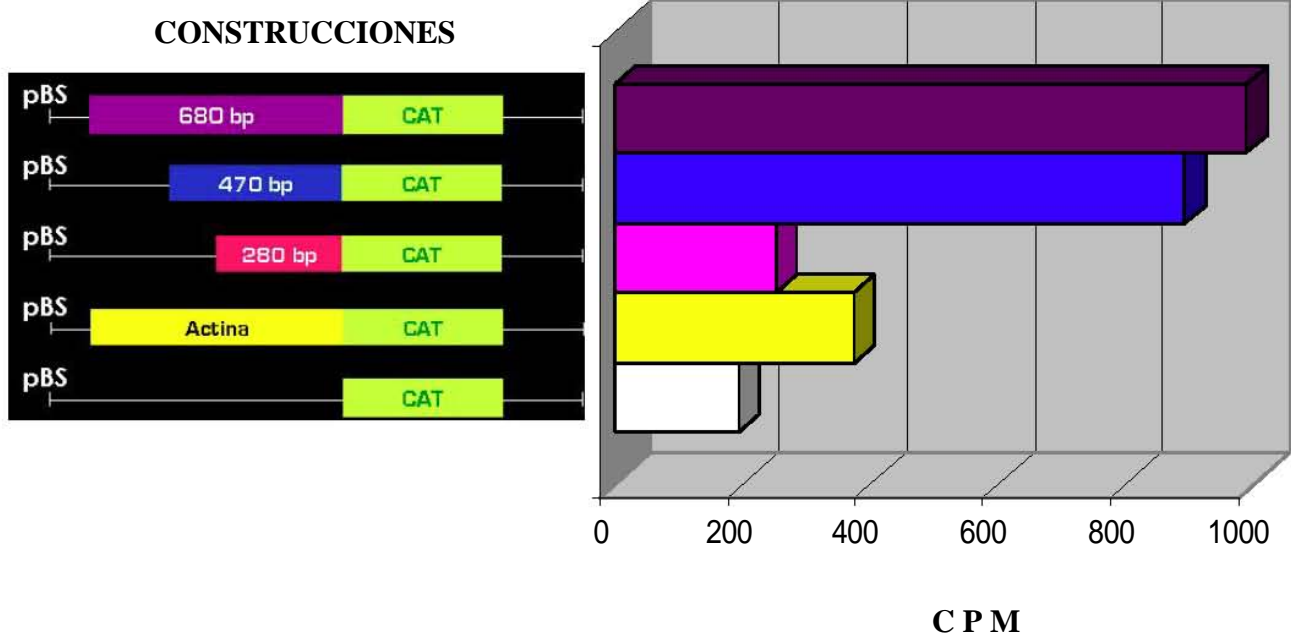


Fig 24. Actividad de CAT bajo el control de fragmentos del promotor de la *Gln6Pi* de *E. histolytica* en trofozoítos de no tratados clonados en el vector Pet Blue Scrip.

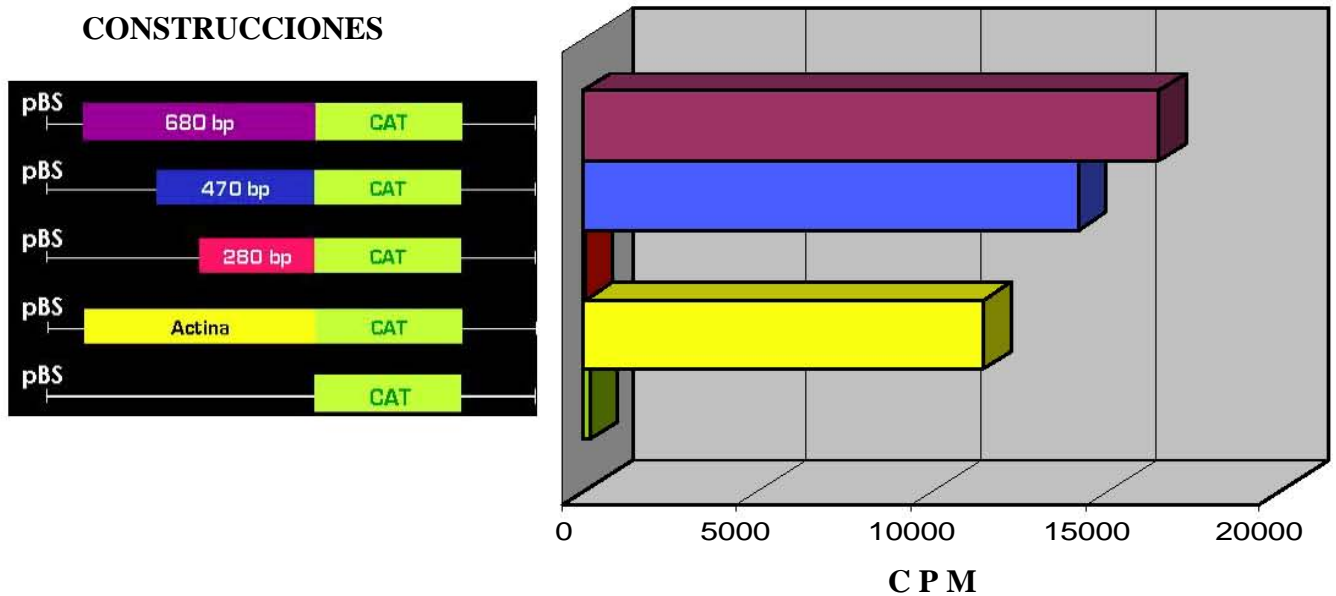


Fig 25. Actividad de CAT bajo el control de fragmentos del promotor de *Gln6Pi* de *E. histolytica* en trofozoítos tratados con peróxido de hidrógeno mas oligoelementos clonados en el vector Pet Blue Scrip.

10. Microscopía de luz y electrónica de transmisión

La determinación del número de núcleos se realizó mediante cortes de secciones de trofozoítos tratados. En los cortes obtenidos de trofozoítos tratados con peróxido de hidrógeno mas oligoelementos, se observó la presencia de dos y tres núcleos en microscopia de luz, mientras que por microscopía electrónica de transmisión se determinó la presencia de hasta cuatro núcleos. Por su parte, las secciones de trofozoítos no tratados mostraron en su mayoría ser uninucleados, con presencia ocasional de algunos trofozoítos binucleados, pero nunca con 3 ó 4 núcleos (Fig 26).

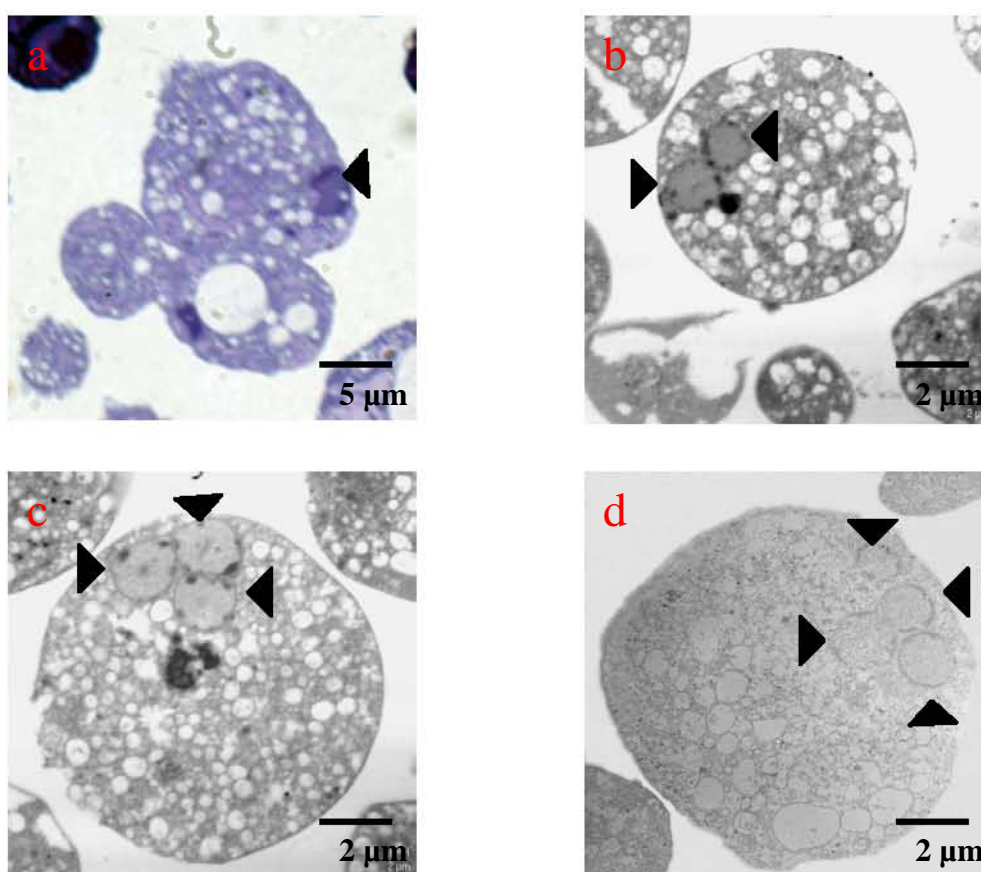


Fig 26. Secciones de trofozoítos tratados con peróxido de hidrógeno mas oligoelementos y detergentes. a) Trofozoíto sin tratar (CTR); b, c, y d) estructuras tipo quiste con 2, 3 y 4 núcleos respectivamente

11. Microscopía electrónica de barrido

La morfología externa de las estructuras obtenidas después del tratamiento con peróxido de hidrógeno y oligoelementos (trofozoítos tratados), se realizó mediante microscopía electrónica de barrido. Los resultados de las observaciones mostraron que los trofozoítos tratados poseen forma redondeada, con un tamaño que va de 10 a 20 μm , que se asemeja mucho al tamaño y forma de un quiste maduro de *E. histolytica* (Fig 27). Por otra parte, los trofozoítos no tratados utilizados como controles, presentaron la forma clásica ameboide, con un tamaño aproximado de 40 μm , es decir casi lo doble de tamaño que el de los trofozoítos tratados. (Fig. 27)

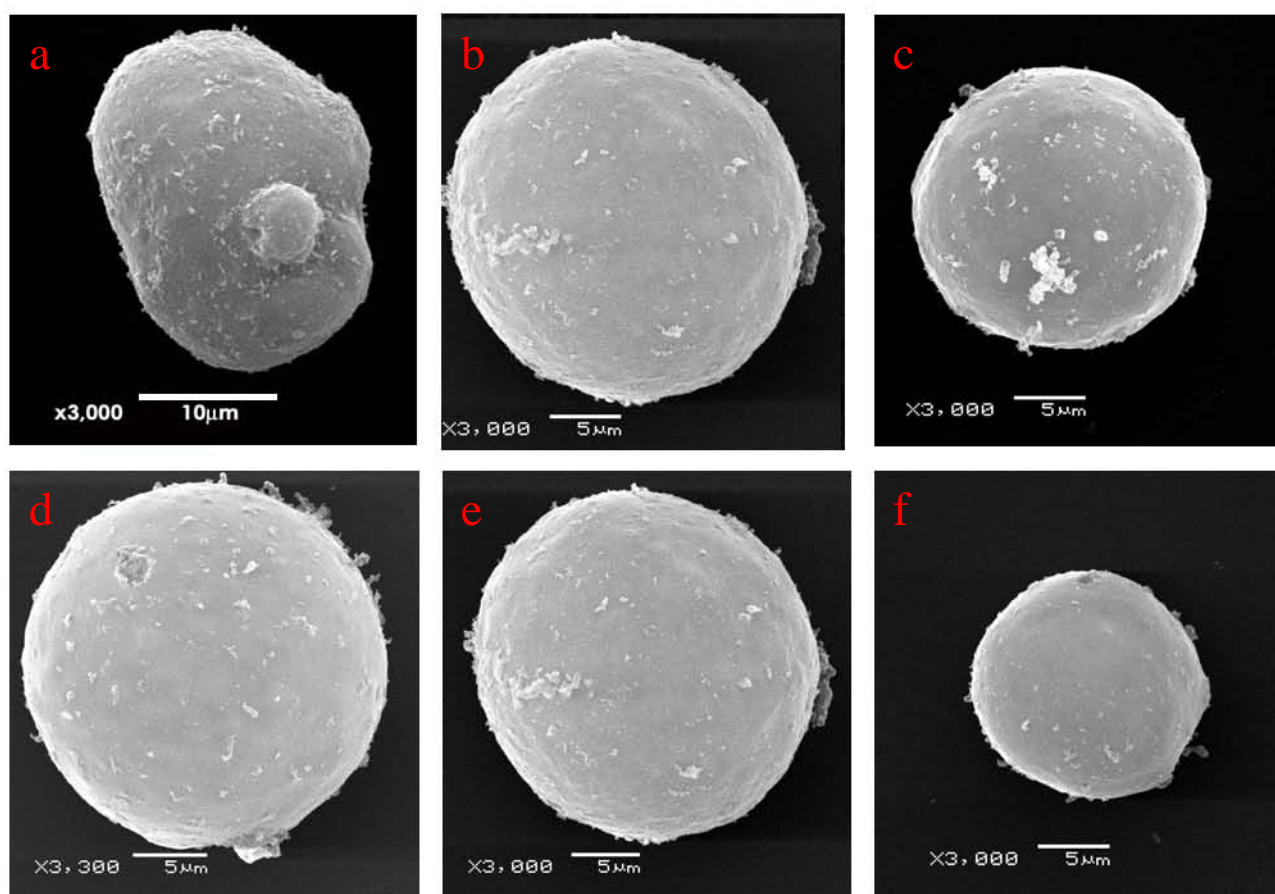


Fig 27. Microscopía electrónica de barrido. a) Trofozoíto sin tratar (CTR); b) Quiste de Entamoeba histolytica; c, d, e y f) Trofozoítos tratados con peróxido de hidrógeno mas oligoelementos.

VII. DISCUSION Y CONCLUSIONES

1. DISCUSION

Actualmente no existe un método convincente que resulte en la formación de quistes maduros del parásito entérico *E. histolytica*. Las publicaciones que existen en este campo están basados en otros protozoarios parásitos similares a *E. histolytica*, como el caso de *G. lamblia* y *E. invadens* (Vázquez 1984, Luján 1996, Morales 1997). Por otro lado, grupos de trabajo han abordado el fenómeno de enquistamiento probando una serie de condiciones que probablemente estén relacionadas con el microambiente generado en el intestino (Morales 1997, González 2000). En este trabajo, utilizamos éstas condiciones ensayándolas de manera individual y en combinación, tratando de encontrar sinérgia entre ellas. Sin embargo, se observó que las condiciones utilizadas para inducir el enquistamiento de trofozoítos de *E. histolytica*, basadas en estos reportes, resultaron infructuosas, probablemente debido a que estas condiciones no son las idóneas para inducir la formación de estructuras quísticas en *E. histolytica*, no obstante de estar relacionadas con el hábitat de la amiba.

Sabemos que todas las células *in vitro* son capaces de responder a las condiciones externas a las que son sometidas, incluido el estrés. Con base en esto, pensamos que dentro de los múltiples factores involucrados en el fenómeno de enquistamiento, quizá uno de los más importantes es el de la tensión de oxígeno, la cual debería aumentar conforme se avanza por el colon ascendente y el colon descendente, lugar donde se enquistan los trofozoítos de *E. histolytica*; este aumento en la tensión pudiera inducir la formación de especies reactivas de oxígeno que son sumamente tóxicas para las células y que podrían activar mecanismos de defensa celular, como lo sería el cambio de estado de la amiba de trofozoíto a su forma

de resistencia, el quiste. Con base en lo anterior decidimos someter a los trofozoítos a un tipo de estrés similar, mediante ensayos realizados con peróxido de hidrógeno, una de las principales especies reactivas de oxígeno, en combinación con oligoelementos algunos de los cuales (Mn^{2+} Mg^{2+} Co^{2+} Na^{2+} y Ca^{2+}) como se demostró anteriormente inducen estructuras de resistencia en la amiba (Campos 1997, González 2000 y Craig 2004). Cabe resaltar que ésta combinación, no se había utilizado previamente para tratar de inducir el enquistamiento.

Estos ensayos resultaron en la formación de estructuras que presentan características muy similares a las de quistes maduros de *E. histolytica* como son: forma redonda, refringencia parcial, engrosamiento de la membrana, 2 a 4 núcleos, etc. Los que sugiere que, el tratamiento con peróxido de hidrógeno posiblemente propicia un tipo de estrés oxidativo, que en condiciones naturales pudiera presentarse con el aumento de la tensión de oxígeno a la que se enfrentan los trofozoítos al avanzar por el tracto intestinal. Esto induciría la formación de especies reactivas de oxígeno (ROI's), que en combinación con oligoelementos necesarios para la actividad de enzimas involucradas en el proceso como la Gln6Pi y la quitina sintetasa, culminaría con la formación de las estructuras tipo quiste. Además, este dato apoya la idea de algunos investigadores que sugieren que el peróxido de hidrógeno (y el estrés oxidativo en general) es capaz de inducir la diferenciación celular en otros organismos, como sucede con algunos hongos y células osteoblásticas (Menon 2007, Ardi 2007, Belozerskaia 2006 y Szymczyk 2006).

Por otra parte, los análisis de las estructuras obtenidas después del tratamiento con peróxido de hidrógeno y los oligoelementos, muestran la presencia de una cubierta protectora que les proporciona resistencia al tratamiento con los diversos detergentes (SDS, tritón y sarcosil). Esta cubierta, como en el caso de los quistes, está constituida por quitina,

un polímero de *N*- acetil-glucosamina (Campos-Góngora 2004), este hallazgo fue demostrado a través de dos análisis. El primero se realizó mediante una tinción con calcoflúor blanco, una sal disódica capaz de unirse específicamente a polisacáridos de unión β -1,4 (como la quitina); este ensayo reveló intensa fluorescencia en la superficie de las estructuras pero también en su interior, esto pudo deberse a que las moléculas que forman la pared del quiste (entre ellas los polímeros que forman la quitina) estaban siendo transportadas del citoplasma a la superficie de la célula para iniciar su formación. Por otra parte, se estandarizó un ELISA utilizando la aglutinina del germen de trigo (AGT), lectina que se une específicamente a los polímeros de *N*-acetil-glucosamina. Con esto se corroboró la presencia de quitina en las estructuras obtenidas, apoyando la idea de que los trofozoítos bajo este tratamiento están llevando a cabo un proceso de diferenciación que resulta en la formación de una pared rígida. Algunos de los ensayos previos realizados para inducir el enquistamiento de *E. histolytica*, habían utilizado el calcoflúor blanco para determinar la presencia de quitina en los trofozoítos inducidos (Campos-Góngora y Morales-Vallarta 1997), sin embargo, en estos ensayos no se había utilizado otro método que corroborara la presencia de los polímeros de *N*-acetil-glucosamina. Resulta interesante que durante los ensayos realizados con la AGT, los mejores rendimientos se obtuvieron cuando se utilizaron las estructuras tipo quiste integra, en contraste con lo obtenido cuando se realizó una sonicación previa, sugiriendo que esta etapa, pudiera estar causando algún daño en la estructura de los polímeros que forman la quitina, que resultó en un menor rendimiento de la prueba.

Como ya se vió, durante el tratamiento con el peróxido de hidrógeno, los trofozoítos comienzan un proceso de diferenciación a estructuras tipo quiste, pero además, se observó que algunas de las estructuras obtenidas bajo este tratamiento, presentan multinucleación,

condición detectada durante el proceso de enquistamiento de *E. histolytica*. Una de las características más importantes de un quiste maduro e infectivo de *E. histolytica*, es la presencia de cuatro núcleos. Las secciones obtenidas a partir de los cortes realizados para microscopía electrónica de transmisión, mostraron claramente la presencia de dos, tres y hasta cuatro núcleos. Este resultado demuestra que bajo un tratamiento adecuado, los trofozoítos de *E. histolytica* pueden comenzar *in vitro* un proceso de diferenciación a estructuras multinucleadas que presentan una pared rígida; este hallazgo es de suma importancia ya que nunca se habían obtenido estructuras con tales características para *E. histolytica*, Cabe resaltar que en otros estudios donde se intentó inducir enquistamiento de trofozoítos de *E. histolytica*, se lograron obtener estructuras resistentes al tratamiento con sarcosil y SDS, sin embargo solo presentaban un núcleo y además no se determinó su viabilidad (Morales-Vallarta y Campos-Góngora 1997).

Por otra parte, una de las diferencias exclusivas entre los quistes y los trofozoítos esta dada por la morfología y el tamaño. Las imágenes obtenidas en la microscopía electrónica de barrido mostraron diferencias entre las estructuras tratadas con peróxido de hidrógeno y los trofozoítos no tratados utilizados como control. Se observó que las estructuras obtenidas después del tratamiento con peróxido de hidrógeno, poseen forma redonda con un promedio aproximado de 15 μm de diámetro, mientras que los controles, presentaron forma clásica ameboide con un diámetro aproximado de 40 μm . Esto confirma que los trofozoítos durante el tratamiento con el peróxido de hidrógeno más los oligoelementos comienzan un proceso de diferenciación morfológica, cambiando de forma ameboide a una forma completamente redonda, con la consecuente disminución en su tamaño, transición característica durante la formación del quiste.

Uno de los aspectos más importantes que no se había evaluado en estudios previos de inducción de enquistamiento en *E. histolytica*, es el de la viabilidad de las estructuras obtenidas. En este estudio la determinación de la viabilidad mediante el ensayo con el diacetato de fluoresceína (FDA), mostró que las estructuras tipo quiste obtenidas después del tratamiento con peróxido mas oligoelementos, son viables en un 90% desde el inicio del mismo y que esta viabilidad va disminuyendo en función del tiempo hasta menos del 10% de las células aproximadamente de 8-10 h post-tratamiento. Esto sugiere que el contacto prolongado con el peróxido de hidrógeno pudiera causar un daño irreversible en la célula que culmina con la muerte, a pesar de su fenotipo de resistencia.

Después de obtener estructuras características particulares de un quiste maduro y con cuatro núcleos, lo cual no se había obtenido por las otras técnicas reportadas, se estudió la madurez de los mismos a través del único método fidedigno para demostrarlo: su capacidad infectiva. Actualmente se conocen modelos de infección en animales experimentales, mediante quistes y/o trofozoítos en el caso de *G. lamblia*, se utilizan ratones BALB/c, gerbos, gatos e incluso corderos (Leitch 1993, Yanke 1998, Larocque y Stein 2003), sin embargo, en el caso de *E. histolytica*, el ensayo para inducir la infección en los ratones de la cepa C3H/HeJ, que son los únicos animales susceptibles a la infección cecal por inoculación directa de trofozoítos, resultó infructuoso. Esto podría deberse al hecho de que, a pesar de la susceptibilidad de esta cepa a la infección intracecal por *E. histolytica*, ésta podría no funcionar como modelo de infección natural al tratar de inducir la infección mediante la inoculación oral y utilizando quistes maduros. Por otra parte, es probable que las estructuras obtenidas no sean infectivas *per se*, razón por la cual no se podría determinar de manera puntual su madurez. Estas posibilidades están siendo actualmente ensayadas en nuestro laboratorio. Cabe resaltar que en las heces de algunos ratones post-

inoculados se observó la presencia de un porcentaje reducido de las estructuras con las cuales inicialmente fueron inoculados, demostrando que de alguna manera resistieron al paso por el tracto digestivo del ratón.

En este estudio también se abordó el posible mecanismo de inicio del proceso de enquistamiento en *E. histolytica*. Como se mencionó anteriormente, existen reportes de que la formación de una pared rígida en los trofozoítos de *G. lamblia* y por tanto de la formación del quiste, comienza con la sobre-expresión de la Glucosamina-6-fosfato isomerasa (Gln6Pi), por lo que ésta enzima se considera clave y limitante en esta ruta biosintética (enquistamiento). Con la finalidad de determinar el comportamiento de la enzima en las estructuras de resistencia obtenidas con la amiba, se clonó el gen que la codifica. El alineamiento de la secuencia de la Gln6Pi de *E. histolytica* con las secuencias de otras enzimas de diversos organismos, mostró homologías muy altas, sugiriendo que la Gln6Pi de *E. histolytica* posee secuencias polipeptídicas conservadas muy similares a las de otras Gln6Pis. Una de las enzimas con la que presenta más alta homología a nivel de aminoácidos, es precisamente la Gln6Pi de *G. lamblia* (43.8%). Lo anterior sugiere que funcionalmente, la Gln6Pi de la amiba podría estar participando como la de *G. lamblia* en el inicio del proceso de enquistamiento a través del aumento en su expresión. Por tal razón se evaluó la expresión de la enzima a nivel del mensajero, observándose un claro incremento en un orden de cinco veces en los trofozoítos tratados con el peróxido de hidrógeno y los oligoelementos, superior al expresado en los trofozoítos no tratados, a 5-6 h pos-tratamiento. Este resultado es similar a lo reportado por Macechko (1992) para *Giardia*, quien en un ensayo a partir de extractos crudos, observó un incremento en la expresión de la Gln6Pi junto con otras enzimas involucradas en la biosíntesis de la pared del quiste de hasta 13 veces mas, 20 h después de que los trofozoítos fueron inducidos a

enquistarse con bilis. Esto nos indica además que existe una expresión basal de la enzima, que se incrementa cuando los trofozoítos se someten a este tipo de estrés oxidativo, posiblemente requerido para iniciar la biosíntesis de la pared del quiste, tal como lo reporta Luján (1997) para *G. lamblia*. Además se ha demostrado que esta enzima es la primera que se sobre-expresa en una cascada de reacciones que culminan con la formación del quiste en este protozoario (Steimle 1997, Van Keulen 1998, Jarroll 2001 y López 2002). Los oligoelementos utilizados para este ensayo son requeridos como diversos cofactores dentro de la ruta metabólica de la formación de la pared del quiste, no solo para la Gln6Pi, sino también para las otras enzimas requeridas durante este proceso (Campos 1997 y 2004, González 2000, Craig 2004).

Con base a la reciente publicación del genoma de *E. histolytica*, se realizó un mapa donde se describen todas las rutas metabólicas caracterizadas y no caracterizadas de la ameba (Loftus 2005). En este mapa encontramos la biosíntesis de la quitina, descrita para *E. histolytica*, que es prácticamente idéntica a la publicada por Jarroll en 2001 para *Giardia*. En esta ruta se muestra que la Gln6Pi es la enzima que inicia la reacción para la formación de la glucosamina-6-fosfato a partir de fructosa-6-fosfato, y este producto sirve como sustrato inicial para una serie de reacciones en cadena que culminan con la formación de los polímeros de *N*-acetil-glucosamina que forman la quitina. Con base en esto proponemos que estos eventos que culminan con la formación de la pared del quiste en *Giardia*, podrían comportarse de manera similar en *E. histolytica*, y por tanto, la ruta de la formación de quitina sería dependiente de la sobre-expresión de la Gln6Pi, como en el caso de *Giardia*. El análisis computacional de la región promotora del gen de la Gln6Pi, mostró varias secuencias que posiblemente estén involucrados en la regulación transcripcional de este gen, entre ellos algunos elementos de respuesta a estrés, como el factor C/EBP que se ha

probado sirve como factor de activación transcripcional, y bajo un estímulo mediado por estrés oxidativo (como el peróxido de hidrógeno), contribuye a la inducción de la expresión de enzimas antioxidantes y detoxificantes, mediante la transactivación de otros genes involucrados en este proceso (Kang 2005). En amiba se sabe que son elementos de activación en *cis* de genes involucrados en la resistencia a drogas (Marchat 2002). Otros elementos encontrados en la región promotora son el YY-1 y el AP-1, los cuales pertenecen a la familia de los factores transcripcionales AP (Toone 2001); estos elementos presentan relación con la activación transcripcional en algunas levaduras en respuesta al estrés oxidativo, además se sabe que son factores sensibles a los cambios del potencial redox (Toone 2001), por su parte, el factor YY-1 que también pertenece a la familia AP, participa en el silenciamiento de genes involucrados en la proliferación de algunas líneas celulares como son los queratinocitos (Toone 2001). En la amiba, AP-1 es un factor común encontrado en muchos promotores y se encarga de incrementar la expresión génica durante varios procesos celulares (Pérez 1998). Por otra parte encontramos el elemento OCT-1, el cual se ha observado que es capaz de modular la expresión de un grupo de genes que son importantes en la respuesta a estrés, como se ha observado en fibroblastos de ratón, ya que estos cuando son deficientes al factor OCT-1, muestran hipersensibilidad al tratarlos con radiación gamma y con peróxido de hidrógeno (Tantin 2005). Existen también elementos en *cis* como las clásicas cajas TATA, presentes en la mayoría de los genes de los eucariontes, y el GATA-1 que son elementos involucrados en la diferenciación celular. Todo esto sugiere que el promotor de la Gln6Pi basa su control transcripcional en elementos que responden en su mayoría a algún tipo de estrés (como el oxidativo), y algunos otros que están íntimamente ligados con diferenciación celular, lo cual se puede

correlacionar directamente con los resultados obtenidos en los experimentos realizados con el peróxido de hidrógeno.

Para avanzar en la determinación del promotor mínimo funcional, se realizaron deleciones en la secuencia promotora de la Gln6Pi, específicamente en los 680 bp río arriba del ATG de inicio de traducción y se clonaron en un vector controlando la expresión del gen reportero Clorafenicol-acetil transferasa (CAT). Los resultados muestran que la eliminación de un fragmento entre -470 y -680 de la región promotora del gen de la Gln6Pi de *E. histolytica*, no afectó la actividad basal de control de transcripción de CAT dirigida por el promotor completo de -680 bp. Interesantemente, la actividad de ambas construcciones (-680 y -470) se observó aumentada 10 veces cuando los trofozoítos transfectados fueron sometidos al tratamiento con peróxido de hidrógeno mas los oligoelementos, lo que sugiere la presencia de elementos de respuesta al peróxido que controlarían la expresión de la Gln6Pi de *E. histolytica*; esto correlaciona con la sobre-expresión del mensajero de la enzima que se observó en las estructuras recién inducidas a enquistamiento. En contraparte, la construcción realizada con el fragmento de -280 pb (Δ -680/-280) de la región promotora del gen de la Gln6Pi, mostró en ambos casos una actividad muy baja, de 180 CPM en los trofozoítos no tratados y casi nula (< a 20 CPM) en los trofozoítos tratados con el peróxido de hidrógeno. Estos resultados demuestran que cuando los trofozoítos son sometidos a un estrés oxidativo mediado por el peróxido de hidrógeno, aumenta de manera exacerbada la actividad del promotor de la Gln6Pi. Por otra parte, también se demostró que el promotor mínimo funcional hasta el momento es el de -470 pb, ya que es el fragmento mas corto que todavía sigue conservando actividad; esto sugiere que los elementos en *cis* importantes en la expresión del gen de la Gln6Pi, se encuentran distribuidos a lo largo del fragmento entre -280 y -470, ya que la actividad sólo cae cuando se deleta este fragmento.

2. CONCLUSIONES

Bajo el estrés oxidativo mediado por la presencia del peróxido de hidrógeno y de la presencia de oligoelementos necesarios para la actividad de algunas enzimas, se puede inducir a los trofozoítos de *E. histolytica* a comenzar un proceso de diferenciación similar al que ocurre durante el enquistamiento. Este proceso de diferenciación culmina con la formación de una pared rígida compuesta por polímeros de *N*-acetil-glucosamina (quitina) que confiere resistencia al tratamiento con diversos detergentes.

El tratamiento resulta en la formación de estructuras que poseen características similares a las de un quiste maduro de *E. histolytica*, como son: disminución en el tamaño y forma redonda, refringencia, formación de una pared rígida que proporciona resistencia y multinucleación (2, 3 y 4 núcleos en aproximadamente el 70% de las células).

Durante el tratamiento con el peróxido de hidrógeno, en los trofozoítos de *E. histolytica* existe una sobre-expresión del mensajero de la enzima Gln6Pi, tal y como ocurre con el patógeno *G. lamblia* en presencia de bilis, durante el proceso de enquistamiento.

En condiciones favorables, el promotor de la Gln6Pi muestra actividad que se exagera cuando los trofozoítos son sometidos a un estrés oxidativo mediado por el peróxido de hidrógeno.

Los elementos en *cis* del promotor del gen de la Gln6Pi necesarios para llevar a cabo el control de la transcripción de la enzima, se encuentran (hasta el momento) en el fragmento de -470 pb río arriba del inicio del gen.

Como conclusiones generales, podemos mencionar que los trofozoítos de *E. histolytica* cuando son sometidos a un estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno más oligoelementos, comienzan a llevar a cabo un proceso similar al enquistamiento que se da en condiciones naturales, y que resulta en la formación de estructuras tipo quíste, que poseen una pared rígida formada por quitina que les confiere resistencia a condiciones adversas y que morfológicamente también presentan similitud con quistes maduros de *E. histolytica*. Por otra parte estos ensayos muestran que como en el caso de *Giardia*, el inicio del proceso de enquistamiento en *E. histolytica* esta íntimamente ligado con la sobre-expresión de la enzima Gln6Pi. Este es un hallazgo muy importante en la biología de este parásito, que ayudará a establecer las bases para comprender el mecanismo de enquistamiento y desenquistamiento de la amiba, y por consiguiente de la adquisición y transmisión de la enfermedad, abriendo la oportunidad de desarrollar nuevas estrategias de control para esta parasitosis de alta incidencia mundial.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abuabara S. F., Barrett J. A., Hau T., Jonasson O. 1982. **Amebic liver abscess**. Arch Surg. 117:239-44.

Ardi M., Shibata Y., Pugdee K., Abiko Y., Ogata Y. 2007. **Effects of the reactive oxygen species (ROS) on antioxidant system and osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells**. IUBNB Life 59 (1): 27-33.

Asgharpour A., Gilchrist C., Baba D., Hamano S. and E. Houpt. 2005. **Resistance to Intestinal *Entamoeba histolytica* Infection Is Conferred by Innate Immunity and Gr-1⁺ cells**. Infect Immun. 73(8): 4522–4529.

Avron B., Stolarsky T., Chayen A. and D. Mirelman. 1982. **Chitin synthase inhibitors prevent cyst formation by trophozoites**. Biochem Biophys Res. Commun 108: 815-821

Arroyo-Begovich A., Carbez-Trejo A., Ruiz-Herera J. 1978. **Composicion de la pared celular des quistess de *Entamoeba invadens***. Arch. Invest. Med (Mex.). 9 (Suppl. 1): 99-104.

Babu L. T., Rajeev K. M. 1999. **Molecular basis of defence against oxidative stress in *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia***. Microbes and infection, 1: 385-394.

Band RN and H Cirrito. 1979. **Growth response of axenic *Entamoeba histolytica* to hydrogen, carbon dioxide and oxygen.** J. Protozool. 26: 282-286.

Barron-Gonzalez M. P., Villarreal-Trevino L., Verduzco-Martinez J. A., Mata-Cardenas BD, Morales-Vallarta MR. 2005. ***Entamoeba invadens*: in vitro axenic encystation with a serum substitute.** Exp Parasitol. 110(3):318-21

Bayley G. B., Rengpien S. 1980. **Osmotic stress as a factor controlling encystations of *Entamoeba invadens*.** Arch. Med. Med. (Mex.). 11 (Suppl. 1): 11-16.

Belozerskaia T. A., Gessler N. N. **Oxidative stress and cell differentiation in *Neurospora crassa*.** 2006. Mikrobiologiya 75 (4) 497-501.

Braga L., Ninomiya H., McCoy J., Eacker S., Wiedmer T., Pham C., Woods S., Petri W. A. 1992. **Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*.** J Clin Invest. 90:1131-37

Bruchhaus I. and D. Dive. 1995. **Protistol. Actualities, Proc. Sec. Europ. Cong. Protistol.** (Brugerolle G. and Mignot J. P., eds.) Clermont Ferrand, 195-203.

Bruchhaus I. and Tannich E. 1995. **Identification of an *Entamoeba histolytica* gene encoding a protein homologous to prokaryotic disulphide oxidoreductases.** Mol. Biochem. Parasitol. 70: 187-191.

Bruchhaus I., Richter S. and Tannich E. 1997. **Removal of the hydrogen peroxide by the 29 kDa protein of *Entamoeba histolytica***. J. Biochem. 326: 785-789.

Bulik D. A., van Ophem P., Manning J. M., Shen Z., Newburg D.S., Jarroll E. L. 2000. **UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase, a key enzyme in encysting *Giardia*, is allosterically regulated**. J. Biol. Chem. 275 (19): 14722-8.

14. Bulik D. A., Lindmark D. G., Jarroll E. L. 1998. **Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase from encysting *Giardia***. Mol Biochem Parasitol. 95 (1); 135-9

Calcagno M., Campos P. J., Mulliert G. and J. Suastegui. 1984. **Purification, molecular and properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli***. Biochemica et Biophysica Acta. 787: 165-173.

Campos-Góngora E., Viader-Salvado J. M., Martinez-Rodriguez H. G., Mora-Galindo J. and S. Said Fernandez. 1997. **Stimulation of *Entamoeba histolytica* cyst wall polysaccharide synthesis by three divalent cations**. Arch Med Res. 28:141-2.

Campos-Góngora E., Ebert F., Willhoeft U., Said-Fernández S. and E. Tannich. 2004. **Characterization of chitin synthetases from *Entamoeba***. Protist.155: 323-330.

Chayen A., Avron B. and D. Mirelman. 1985. **Changes in cell surface proteins and glycoproteins during the encystation of *Entamoeba invadens***. Mol Biochem Parasitol. 15(1):83-93.

Chen J., Chen J., Huang X., Liu Y., Dai G y Chen W. 1997. **The detoxicating enzymes of *Entamoeba histolytica* and detoxifying roles.** Arch Med Res. Volume 28 Suppl pp S93.

Clark I. A., Hunt N. H., and W. B. Cowden. 1986. **Oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of parasitic disease.** Adv Parasitol. 25: 1-44.

Coppi A. and D. Eichinger. 1999. **Regulation of *Entamoeba invadens* encystation and gene expression with galactose and N-acetylglucosamine.** Molecular and Biochemical Parasitology, 102: 67-77.

Craig D. K. and Jarroll E. L. 2004. **Cyst wall synthase: N-acetylgalactosaminyltransferase activity is induced to form the novel N-acetylgalactosamine polysaccharide in the *Giardia* cyst wall.** Microbiology. 150, 1237-1243.

Das S. and F. D. Gillin. 1991. **Chitin Synthase in encysting *Entamoeba invadens*.** Biochem J. 280: 641.

Eichinger D. (a). 2001. **A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*.** J. Eukariot Microbiol. 48 (1): 17-21.

Eichinger D. (b). 2001. **Encystation in parasitic protozoa.** Current Opinion in Microbiology. 4: 421-426.

Frisardi M., Ghosh S., Field J., Van Dellen K., Rogers R., Robbins P. and J. Samuelson. 2000. **The most abundant glycoprotein of amebic cyst walls (Jacob) is a lectin with five Cys-rich, chitin-binding domains.** Infection and Immunity. 68(7): 4217- 4224.

Gerwig G. J., van Kuik J. A., Leeftang B. R., Kamerling J. P., Vliegthart J. F., Karr C. D., Jarroll E. L. 2002. **The *Giardia intestinalis* filamentous cyst wall contains a novel beta(1-3)-N-acetyl-D-galactosamine polymer: a structural and conformational study.** Glycobiology 12 (8); 499-505.

Ghosh P. K., Mancilla R. and I Ortís-Ortís. 1994 **Intestinal amebiasis: histopathologic features in experimentally infected mice.** Arch Med Res. 25(3): 297-302

Gillin F. D., Reiner D. S., Gault M. J., Douglas H., Das S., Wunderlich A., Sauch J. F. 1987. **Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro.** 235(4792):1040-3

González-Salazar F., Viader-Salvado J. M., Martinez-Rodriguez H. G., Campos-Góngora E., Mata-Cardenas B. D. and S. Said-Fernandez. 2000. **Identification of seven chemical factors that favor high-quality *Entamoeba histolytica* cyst-like structure formation under axenic conditions.** Arch Med Res. 31(4 Suppl):S192-3.

Hidalgo M. E., Hernández R., Keene W. E., McKerrow J. H., Orozco E. 1990. **Direct relationship between secretion of the proteolytic enzymes and virulence of *Entamoeba histolytica***. Arch Invest Med. 21:133-39

Huang, C. N., Cornejo, M. J., Bush D. S. and Jones, R. L. 1986. **Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining**. *Protoplasma*, vol. 135, no. 2-3, p. 80-87.

Hughes M. A., Petri W. A. 2000. Amebic liver abscess. Infec Dis Clin North Am. 14 (3): 183-201.

Kang K. W., Lee S. J., Kim S. G. 2005. **Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress**. Antioxid Redox Signal Nov-Dec;7(11-12):1664-73. Review.

Knodler L. A., Svard S. G., Silberman J D., Davids B. J., Gillin F. D. 1992. **Development gene regulation in *Giardia lamblia*: first evidence for an encystation specific promoter and differential 5' mRNA processing**. Molecular Microbiology (1999) 34 (2); 327-340.

Jarroll E. L., Macechko, Steimle P. A., Bulik D., Karr C. D., Keulen H., Paget T. A., Gerwig G., Kamerling J., Vliegenthert J., Erlandsen. 2001. **Regulation of carbohydrate metabolism during *Giardia* encystment**. J. Eukaryot. Microbiol. 48 (1) pp 22-26

Laderoute K. R. **The interaction between HIF-1 and AP-1 transcription factors in response to low oxygen.** Semin Cell Dev Biol. 16(4-5):502-13

Larocque R., Nakagaki K., Lee P., Abdul-Wahid A., Faubert G. M. 2003. **Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cyst.** *Infect Immun.* 71(10); 5662-9

Leitch G. J., Udezulu I A., He Q, Visvesvara G S. 1993. **Effects of protein malnutrition on experimental Giardiasis in the Mongolian gerbil.** *Scand J Gastroenterol.* 28 (10); 885-93.

Leippe M. 1997. **Amoebapores.** *Parasitol Today.* 13:178-83.

Li S., Yan X., Bélanger F., Labrie F. 1993. **Prevention by dehydroepiandrosterone of the development of mammary carcinoma induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) in the rat.** *Breast Cancer Res Treat.* 29:203-17.

Lo H., and R. E. Reeves. 1980. **Purification and properties of NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 2: 23-30.

Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UC, Samuelson J, Amedeo P, Roncaglia P, Berriman M, Hirt RP, Mann BJ, Nozaki T, Suh B, Pop M, Duchene M, Ackers J, Tannich E, Leippe M, Hofer M, Bruchhaus I, Willhoeft U, Bhattacharya A, Chillingworth T, Churcher C, Hance Z, Harris B, Harris D, Jagels K, Moule S, Mungall

K, Ormond D, Squares R, Whitehead S, Quail MA, Rabbinowitsch E, Norbertczak H, Price C, Wang Z, Guillén N, Gilchrist C, Stroup SE, Bhattacharya S, Lohia A, Foster PG, Sichert-Ponten T, Weber C, Singh U, Mukherjee C, El-Sayed NM, Petri WA Jr, Clark CG, Embley TM, Barrell B, Fraser CM, Hall N. 2005. **The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*.** Nature. 433(7028):865-8

López A. B., Mohammed T., Hossain and H. Van Keulen. 2002. ***Giardia intestinalis* glucosamine-6-phosphate isomerase: the key enzyme to encystment appears to be controlled by ubiquitin attachment.** J. Eukariot. Microbiol. 49 (2): 134-136

Long-Krug S. A., Fisher K. G., Hysmith R. M., Radvin J. I. 1985. **Phospholipase A enzyme of *Entamoeba histolytica* description and cellular localization.** J Infect Dis. 152: 536-40

López B. A., Hossain M. T. and H. Van Keulen. 2002. **Glucosamine 6-Phosphate Isomerase: the key enzyme to encystment appears to be controlled by ubiquitin attachment** J. Eukariot Microbiol. 49 (2): 134-136.

López A. B, Sener K., Jarroll E. L., van Keulen H. 2003. **Transcription regulation is demonstrated for five key enzymes in *Giardia intestinalis* cyst wall polysaccharide biosynthesis.** 128 (1): 51-7.

López-Romero E. and J. C. Villagomez-Castro. 1993. **Encystation in *Entamoeba invadens*.** Parasitol Today. 9(6):225-7.

Luján H. D., Mowatt M. R., Byard L. G. and T. E. Nash. 1996. **Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia***. Cell Biology. 93:7628-7633.

Luján H. D., Mowatt M. R., Nash T. E. 1997. **Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts**. Microbiol Mol Biol Rev. 61:294-304.

Macechko, P. T., Steimle P. A., Lindmark D. G., Erlandsen S. L., and Jaroll E. L. 1992. **Galactosamine-synthesizing enzymes are induced when *Giardia* encyst**. Mol. Biochem Parasitol 56: 301-310.

Makioka A., Kumagai M., Ohtomo H., Kobayashi S. and T. Takecuchi. 2000. **Effect of cytochalasin D on the growth, encystations, and multinucleation of *Entamoeba invadens***. Parasitol Res. 86: 599-602

Makioka A., Kumagai M., Ohtomo H., Kobayashi S. and T. Takecuchi. 2002. **Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystations, and excystation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens***. Parasitol Res. 88: 454-459

Mann B. J. 2002. **Structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin**. Int Rev Cytol. 216: 59-80

Manning P., Erlandsen S. L. and E. L. Jaroll. 1992. **Carbohydrate and amino acid analyses of *Giardia muris* cyst.** J Protozool. 38: 290-296

Marchat LA, Gómez C, Pérez DG, Paz F, Mendoza L, Orozco E. 2002. **Two CCAAT/enhancer binding protein sites are cis-activator elements of the *Entamoeba histolytica* EhPgp1 (mdr-like) gene expression.** Cell Microbiol. 4(11):725-37

Martínez-Palomo A. 1987. **The pathogenesis of amoebiasis.** Parasitology today. 3(4): 111-18.

Mc. Connachie E. W. 1955. **Studies on *Entamoeba invadens* Rodhain, 1934, in vitro and its relationship to some other species of *Entamoeba*.** Parasitology. 45: 452.

Menon J. Rozman R. 2007. **Oxidative stress tissue remodeling and regression during amphibian metamorphosis.** Comp. Biochem Physiol C. Toxicol Pharmacol.

Morales-Vallarta M., Villarreal-Trevino L., Guerrero Medrano L., Ramirez-Bon E, Navarro-Marmolejo L, Said-Fernandez S and BD Mata-Cardenas. 1997. ***Entamoeba invadens* differentiation and *Entamoeba histolytica* cyst-like formation induced by CO₂.** Arch Med Res. 28:150-1

Murray H. W., S. B. Aley and W. A. Scott. 1981. **Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to oxygen intermediates.** Mol Biochem Parasitol 3: 381-391.

Nathan C. F., Silverstein S. C., Brukner L. H. and Z. A. Cohn. 1979. **Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes. II. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity.** J Exp Med. 149: 100-113.

Organización Mundial de la Salud. 1997. **Amoebiasis, an expert consultation.** Weekly. Epidemiological Record No. 14, Ginebra.

Pérez E., Muñoz M. L., Ortega A. 1998. ***Entamoeba histolytica*: collagen-induced AP-1 DNA binding activity.** FEMS Microbiol Lett. 159(2):187-92

Pinilla A. E. 1998. **Absceso hepático.** Trib Med. Supl; 98: 151-60

Purdy J. E., Pho L. T., Mann B. J., W. A. Petri Jr. 1996. **Upstream regulatory elements controlling expression of the *Entamoeba histolytica* lectin.** Mol Biochem Parasitol. 78: 91-103.

Radvin J. I. 1986. **Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxin and contact dependent cytolysis.** Reviews Infect Dis. 8: 247-260.

Ravdin J. I. 1988. **Amebiasis: Human infection by *Entamoeba histolytica*.** Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Melbourne, Canada.

Said-Fernández S. 1990. **Virulence factors of *Entamoeba histolytica*.** Arch Invest Med (Mex).21(3):253-62.

Said-Fernández S., Vargas-Villarreal J., Castro-Garza J. 1986. **Multifactorial mechanism for the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*.** Arch Invest Med (Mex). 17 Suppl 1:173-8

Sánchez L, Enea V. and D. Eichinger. 1994. **Identification of a developmentally regulated transcript expressed during encystation of *Entamoeba invadens*.** Mol. Biochem. Parasitol. 67:125-135.

Schupp D. G., Januschka M. M., Sherlock L. A., Stibbs H. H., Meyer E. A., Bemrick W. J., Erlandsen S. L. 1988. **Production of viable *Giardia* cysts in vitro: determination by fluorogenic dye staining, excystation, and animal infectivity in the mouse and Mongolian gerbil.** Gastroenterology. 95; 1-10.

Sener K, Shen Z. and D. S. Newburg. 2004. **Amino sugar phosphate levels in *Giardia* change during cyst wall formation.** Microbiology. 150: 1225-1230.

Que X., Reed S. L. 2000. **Cysteine proteinases and pathogenesis of amebiasis.** Clin Microbiol Rev. 13: 196-206.

Smith AL, Smith HV. 1989. **A comparison of fluorescein diacetate and propidium iodide staining and in vitro excystation for determining *Giardia intestinalis* cyst viability.** Parasitology. 3: 329-31

Stanley S. L. 1997. **Progress towards development of vaccine for amebiasis.** Clin Microbiol Rev. 10 (4): 637-49.

Stanley S. L. 2003. **Amoebiasis.** Lancet: 231: 1025.34

Steimle AP, Lindmark DG and EL Jaroll. 1997. **Purification and characterization of encystment –induced glucosamine 6-phosphate isomerase in *Giardia*.** Molecular and Biochemical Parasitology 84: 149-153.

Stein J. E., Radeck S. V., Lappin M. R. 2003. **Efficacy of *Giardia* vaccination in the treatment of giardiasis in cats.** J Am Vet Med Assoc. 1; 222 (11); 1548-51.

Szymczyk K. H., Kerr B. A., Freeman T. A., Adams C. S., Steinbeck M. 2006. **Involvement of hydrogen peroxide in the differentiation and apoptosis of preosteoclastic cells exposed to arsenite..** Biochem Pharmacol 72 (6): 761-9

Tanaka T., Takahashi F., Fukui T., Fujiwara S., Atomi H. and T. Imanaka. 2005. **Characterization of a novel Glucosamine-6- phosphate deaminase from *Hyperthermophilic Archaeon*.** J Bacterial. 187(20): 7038-7044

Tanimoto-Weki M., Vázquez Saavedra J. A., Calderón-Lara P., Aguirre-García J. 1973. **Inmunidad consecutiva a la inyección de antígeno amibiano axénico en el hámster.** Arch Invest Med. Supl 4; 147-54.

Tannich E, Bruchhaus I, Walter R. D and R. D Horstmann. 1991. **Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase.** Mol Biochem. Parasitol. 49: 61-72.

Tantin D., Schild-Poulter C., Wang V., Haché R. J., Sharp P. A. 2005. **The octamer binding transcription factor Oct-1 is a stress sensor.** Cancer Res. 65(23):10750-8.

Thiriat L., Sidaner F., Schwartzbrod J. 1998. **Determination of Giardia cyst viability in environmental and faecal samples by immunofluorescence, fluorogenic dye staining and differential interference contrast microscopy.** Lett Appl Microbiol. 26(4):237-42.

Toone W. M., Morgan B. A., Jones N. 2001. **Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond.** Oncogene, 20(19):2336-46

Tsutsumi V., Mena-López R., Anaya F., Martínez –Palomo A. 1984. Cellular bases of experimental amebic liver absceso formation. Am J Pathol; 117: 81-89.

Van Keulen H., Steimle P. A., Bulik D. A., Borowiak R K., Jarroll E. L. 1998. **Cloning of two putative *Giardia lamblia* glucosamine-6-phosphate isomerase genes only one which is transcriptionally actived during encystment.** J. Eukaryot. Microbiol. 45: 637-642.

Vázquez de Lara-Cisneros L. G and A. Arroyo-Begovich. 1984. **Induction of encystation of *Entamoeba invadens* by removal of glucose from the culture medium.** J. Parasitol. 70: 629-633

Vincent F, Davies G. J. and J. A Brannigan. 2005. **Structure and Kinetics of a Monomeric Glucosamine 6-Phosphate Deaminase** J Biol Chem. 280(20): 19649-19655.

Walderich B., Burchard G. D., Knobloch and L Muller. 1998. **Development of monoclonal antibodies specifically recognizing the cyst stage of *Entamoeba histolytica*.** Am J. Trop. Med.Hyg. 59: 347-351

Walsh J. A. 1986. **Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality.** Rev. Infect. Dis. 8: 228-238.

Weinbach E. C and L. S Diamond. 1974. ***Entamoeba histolytica* I. Anerobic metabolism.** Exp. Parasitol. 35: 232-243.

Wolosker H., Kline D., Bian Y., Blackshaw S., Cameron A M., Fralich T. J. 1998 **Molecularly cloned mammalian glucosamine-6-phosphate deaminase localizes to transporting epithelium and lacks oscillin activity.** FASEB J 12: 91-99

Yanke S. J., Ceri H., Mc Allister T A., Morck D. W. Olson M. E. 1998. **Serum immune response to *Giardia duodenalis* in experimentally infected lambs.** Vet Parasitol. 15; 75 (1): 9-19.