



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**Identificación de proteínas que interaccionan con la
ATPasa de calcio del tipo SERCA en *Entamoeba
histolytica* (EhSERCA).**

Tesis que presenta

Q.B.P. Martha Iris Valle Solis.

Para Obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

En la Especialidad de

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Director de Tesis:

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez.

México, Distrito Federal.

Agosto, 2013

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio 2 del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) bajo la dirección del Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez y con el apoyo financiero CONACYT con número de registro 418501.

DEDICATORIAS

A mis padres.

Martha Iris y Ángel Salvador

Con mucho cariño a ustedes que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento, gracias por enseñarme a luchar, a levantarme y mirar al frente, por brindarme su gran corazón y capacidad de entrega, pero sobre todo por enseñarme a ser responsable, gracias a ustedes he alcanzado otra de mis metas. Los amo

A mis hermanas

Marly y Mariett

Por formar parte de lo más hermoso que tengo. Mi familia, y por todo su amor.

A mis familiares y amigos

Darío Solís, Esthela Almazán, Daniela Valle, Miranda Valle, Francisco de Jesús Valle, Gris Corona, Raúl Zavaleta, Oswaldo Zavaleta, Karla Zavaleta, Cuauhtémoc Zavaleta, Angélica Alcántara, Diana Zavaleta, Esperanza Pastrana, Rosa Isela Dionisio, Alfredo Toledo, Josué Jaramillo, Olivia Janeth Velásquez, Gabriel Cahua, Liz Dinarah Huicochea, Francisco Ávila, Ariel Adame, José Ángel Cahua y Carlos Oyorzábal.

Gracias por sus palabras de aliento, apoyo y fe en mí.

“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar”. Thomas Chalmers

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Por la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo, por las experiencias y conocimientos compartidos, por las observaciones y correcciones siempre acertadas, por las recomendaciones y sugerencias, por la orientación y confianza brindada.

A mis asesores

Dra. Patricia Talamás Rohana

Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández

Por sus críticas siempre acertadas, por sus comentarios, sugerencias y por todo el apoyo brindado en el trayecto y terminación de este trabajo.

C. Carlos Vázquez Calzada

C. Mario Rodríguez Nieves

Gracias por la asesoría y soporte técnico

A mis compañeros y amigos del laboratorio

Marco, Mario, Meche, Ramón, Yeni, Jesy, Eli, Wendy, Yun, Paty, Guille, Jon, Tomasito, Sarita y Alex.

Gracias por su amistad y la ayuda brindada.

A mis amigos Aarón y Javier

Gracias por su apoyo incondicional, por su dedicación, por compartir sus experiencias, por ser los guías en este trayecto, por esclarecer mis dudas; pero sobre todo por su amistad sincera.

“No sé dónde está el límite pero sí sé dónde no está” Josef Ajram

CONTENIDO

I. LISTA DE TABLAS	1
II. LISTA DE FIGURAS	2
III. RESUMEN	3
IV. ABSTRACT	4
1. ANTECEDENTES GENERALES	5
1.1 AMIBIASIS	5
1.2 EPIDEMIOLOGÍA	5
1.3 BIOLOGÍA DE <i>Entamoeba histolytica</i>	6
1.4 CICLO DE VIDA	9
1.5 MECANISMOS DE PATOGENICIDAD	10
1.5.1 ADHESIÓN	10
1.5.2 CITÓLISIS DEPENDIENTE DE CONTACTO	13
1.5.3 FAGOCITOSIS	14
1.6 HOMEOSTASIS DEL CALCIO	15
1.6.1 REGULACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DEL CALCIO	15
1.6.1.1 CANALES IÓNICOS	15
1.6.1.2 CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE (VGCCS)	16
1.6.1.3 CANALES DE CALCIO REGULADOS POR DEPÓSITOS INTRACELULARES (SOCCS)	18
1.6.1.4 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITORIO (TRP)	19
1.6.1.5 INTERCAMBIADORES DE SODIO/CALCIO (NCX) E INTERCAMBIADORES SODIO/CALCIO-POTASIO (NCKX)	20
1.6.1.6 CANALES LIBERADORES DE CALCIO	21
1.6.1.7 BOMBAS DE CALCIO	22
1.6.1.7.1 CICLO CATALÍTICO	23
1.6.1.7.2 CLASIFICACIÓN DE LAS ATPasas DE TIPO P	23
1.6.1.7.3 ATPasa DE CALCIO DE MEMBRANA PLASMÁTICA (PMCA)	24
1.6.1.7.4 BOMBA PMR1/SPCA	25
1.6.1.7.5 ATPasa–Ca ²⁺ DE RETÍCULO SARCOPLÁSMICO (SERCA)	25
1.6.1.7.5.1 INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS CON SERCA	27
1.6.1.7.5.1.1 INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A Ca ²⁺ RICA EN HISTIDINA (HRC) CON SERCA	27
1.6.1.7.5.1.2 INTERACCIÓN DE Bcl-2 CON SERCA	28
1.6.1.7.5.1.3 INTERACCIÓN DE FOSFOLAMBAN CON SERCA	29
1.6.1.7.5.1.4 INTERACCIÓN DE SARCOLIPINA CON SERCA	29
1.6.1.7.5.1.5 INTERACCIÓN DE CALNEXINA CON SERCA	30
1.6.1.7.5.1.6 INTERACCIÓN DE STIM1 CON SERCA	30

2. ANTECEDENTES PARTICULARES	32
2.1 IMPORTANCIA DEL CALCIO EN <i>Entamoeba histolytica</i>	32
2.2 CANALES IÓNICOS EN <i>E. histolytica</i>	33
2.3 ATPAsas DE CALCIO EN <i>E. histolytica</i>	34
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. HIPÓTESIS	41
5. OBJETIVOS	41
5.1 OBJETIVO GENERAL	41
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	41
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	42
7. MATERIALES Y MÉTODOS	43
7.1 ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>	43
7.2 CULTIVO DE <i>E. histolytica</i>	43
7.3 AISLAMIENTO DE RNA DE TROFOZOÍTOS DE <i>E. histolytica</i>	44
7.4 OBTENCIÓN DE Cdna	45
7.5 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES Y RT-PCR	45
7.6 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	47
7.9 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	47
7.10 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	48
7.11 WESTERN BLOT	49
7.12 INMUNOPRECIPITACIÓN	50
8. RESULTADOS	51
8.1 Identificación <i>in silico</i> de proteínas que posiblemente interaccionan con <i>EhSERCA</i>	51
8.2 Análisis filogenético del posible intercambiador sodio/calcio de <i>E. histolytica</i>	53
8.3 Análisis estructural de la secuencia codificante para el posible intercambiador sodio/calcio (NCX) de <i>E. histolytica</i>	53
8.4 Expresión del gen <i>Ehcnx</i> mediante RT-PCR	54
8.5 Expresión del gen <i>Ehcnx</i> bajo diferentes concentraciones de calcio	55
8.6 Análisis de las interacciones de <i>EhSERCA</i> bajo diferentes condiciones	67
9. DISCUSIÓN	74
10. CONCLUSIONES	79
11. PERSPECTIVAS	80
12. BIBLIOGRAFÍA	81

I. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica

Tabla 2. Posibles proteínas de *Entamoeba histolytica* con homología a aquéllas que interaccionan con SERCA en el humano

II. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de casos de amibiasis en México del año 2000 al 2011

Figura 2. Ciclo de vida de *E. histolytica*.

Figura 3. Moléculas que participan en la regulación de la concentración intracelular de calcio.

Figura 4. Análisis filogenético de las posibles ATPasas de calcio en *E. histolytica*.

Figura 5. Inmunodetección de la posible ATPasa de calcio del tipo SERCA de *E. histolytica*.

Figura 6. Inmunolocalización de *EhSERCA* en trofozoítos de *E. histolytica*

Figura 7. Interacciones proteicas de las diferentes proteínas SERCA de humano.

Figura 8. Análisis filogenético del posible intercambiador sodio/calcio de *E. histolytica*.

Figura 9. Comparación de la arquitectura del posible intercambiador sodio/calcio de *E. histolytica* con la de intercambiadores de otras especies.

Figura 10. Alineamiento múltiple comparando la secuencia aminoacídica *EhNCX* con los intercambiadores de otras especies.

Figura 11. Expresión del gen *Ehncx* por RT-PCR.

Figura 12. Expresión del gen *Ehncx* en bajo y alto calcio.

Figura 13. Expresión del gen EHI_30830 (PMCA) en bajo y alto calcio.

Figura 14. Interacciones proteína-proteína de *EhSERCA*.

III. RESUMEN

El ion calcio es una importante molécula de señalización, ya que actúa como segundo mensajero controlando una variedad de funciones celulares como secreción de hormonas, transcripción de genes, contracción muscular, la división celular, la diferenciación y la permeabilidad a los iones sodio y potasio, entre otras. Para que la señalización por calcio funcione correctamente éste debe ser regulado en su concentración intracelular. Diversos estudios muestran la importancia del calcio en la biología y la virulencia de *Entamoeba histolytica*, pero poco se sabe de la regulación del ion en este parásito. En nuestro laboratorio se identificaron cinco secuencias génicas que podrían codificar ATPasas de calcio, dentro de las cuales se identificó una posible ATPasa del tipo SERCA (*EhSERCA*), sin embargo, poco se sabe de las proteínas involucradas en la regulación de la homeostasis del ion y de las interacciones proteicas que estas mismas puedan llevar a cabo para beneficio de la regulación del flujo de calcio y de la señalización. En éste trabajo, mediante la búsqueda de proteínas ortólogas a aquellas que en el humano interaccionan con SERCA se identificaron algunas proteínas amibianas que pudieran estar participando en la regulación de la concentración intracelular del ión calcio en *E. histolytica*. Entre esas proteínas se encontró un intercambiador de sodio/calcio. Ensayos de RT-PCR mostraron que el gen que codifica esta proteína se expresa en los trofozoítos en cultivo y que su expresión es regulada por la concentración de calcio. Además, por ensayos de inmunoprecipitación en trofozoítos bajo diferentes concentraciones de calcio utilizando un anticuerpo contra *EhSERCA* se detectaron algunas proteínas que interaccionan con esta proteína.

IV. ABSTRACT

Calcium ion is an important signaling molecule, since it acts as a second messenger controlling a variety of cellular functions such as hormone secretion, gene transcription, muscle contraction, cell division, differentiation and permeability of sodium and potassium ions, among others. For its proper signaling function, the intracellular calcium must be regulated in its concentration. Several studies have shown the importance of calcium in the biology and virulence of *Entamoeba histolytica*, but little is known about the regulation of the ion concentration in the parasite. In our laboratory five gene sequences were identified that could encode for calcium-ATPases, including a possible SERCA-type ATPase (*EhSERCA*), however, little is known about the proteins involved in the regulation of ion homeostasis and the protein interactions that these proteins can carry out for the benefit of the calcium flow regulation and signaling. In this work, by the search of orthologous proteins to those that in human interact with SERCA, we identify some amoebic proteins that could be participating in regulate the intracellular concentration of calcium in *E. histolytica*. Among these proteins we found a sodium/calcium exchanger. RT-PCR assays showed that this gene is expressed in cultured trophozoites and that its expression is regulated by calcium concentration. In addition, by immunoprecipitation assays in trophozoites under different calcium concentrations using an antibody against *EhSERCA*, we detected some proteins that interact with *EhSERCA*.

1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1 AMIBIASIS

La amibiasis es una enfermedad gastrointestinal aguda o crónica causada por el parásito protozario *Entamoeba histolytica*, el cual puede vivir en el intestino grueso o invadir la mucosa intestinal causando lesiones y puede diseminarse a diferentes órganos principalmente el hígado (Zlobl, 2001). La amibiasis presenta una distribución mundial, sin embargo, afecta principalmente a países en vías de desarrollo, donde las condiciones socioeconómicas e higiénicas son deficientes (Barrón *et al.*, 2008). Esta enfermedad es responsable de aproximadamente 70 a 100 mil muertes al año en el mundo, por lo que es la cuarta causa principal de muerte debida a la infección por protozoos (después de la malaria, la enfermedad de Chagas y la leishmaniosis) y la tercera causa de morbilidad en este grupo de organismos (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000; Choudhuri *et al.*, 2012). La amibiasis es producida por la ingestión de quistes maduros a partir del agua, alimentos o manos contaminadas con heces (Trejos-Suárez & Castaño-Osorio, 2009). Esta parasitosis afecta principalmente el colon y al penetrar la mucosa del intestino puede ocasionar colitis o abscesos, principalmente en hígado, seguido por cerebro, pulmón y piel (Blessmann *et al.*, 2002).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

La amibiasis es de distribución mundial; se presenta en el humano a cualquier edad, aunque es más frecuente en niños y adultos jóvenes (Ximénez *et al.*, 2007). En especial las infecciones se presentan frecuentemente en los países y regiones en vías de desarrollo como América latina, Asia y África. Las zonas con mayor endemia son los países tropicales y subtropicales, además de implicar factores sociodemográficos y de accesibilidad a los servicios sanitarios (Ximénez *et al.*, 2007). Se considera que 10% de la población mundial está infectada y 90% de ellos no presentan síntomas. Según la OMS hay 500 millones de nuevas infecciones por año y

aproximadamente 70,000 a 100,000 muertes (Ali *et al.*, 2008; Botero & Restrepo, 1998; Christy & Petri Jr, 2011; Ximénez *et al.*, 2007). En México, se reporta que esta enfermedad ha disminuido considerablemente, hasta el 2011 la tasa de incidencia ha disminuido, existiendo alrededor de 419,554 casos (SUIVE/DGE/Secretaria de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2011) (Fig. 1).

1.3 BIOLOGÍA DE *Entamoeba histolytica*

E. histolytica fue descubierta en 1873 en Rusia por Friedrich Lösch, quien la aisló de un paciente con disentería (Gómez *et al.*, 2007). Este protozooario parásito no flagelado y forma pseudópodos. Este parásito pertenece al género *Entamoeba* (Tabla 1) y en él sólo tres especies producen infección en el humano: *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*, siendo *E. histolytica* la más invasiva (Ximénez *et al.*, 2007; Martínez-Palomo, 1987). *E. histolytica* es un protozooario que presenta dos formas en su ciclo de vida: el quiste y el trofozoíto, siendo el trofozoíto la forma invasiva y el quiste la forma infectiva. El trofozoíto coloniza la mucosa intestinal del colon donde se multiplica por fisión binaria (Ximénez *et al.*, 2007).

Los quistes son estructuras redondeadas de 10 a 16 μm , que presentan en su interior de 1 a 4 núcleos y una pared gruesa compuesta de quitina que les confiere resistencia cuando el parásito se encuentra fuera del conducto intestinal del huésped (Gillespie & Pearson, 2001). El trofozoíto tiene un diámetro de 20 a 40 μm en general presenta un solo núcleo y emite un pseudópodo amplio, hialino y transparente, el cual se proyecta al exterior de la célula y presenta una apariencia granulosa; su núcleo presenta un cariosoma compacto central y cromatina en gránulos uniformes en tamaño y localización, carece de mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico bien desarrollados, lisosomas típicos y citoesqueleto organizado (Gómez *et al.*, 2007; Ximénez *et al.*, 2007).

El trofozoíto es una célula muy móvil capaz de ingerir gran variedad de partículas incluyendo bacterias y eritrocitos (Martínez-Palomo, 1987). Su

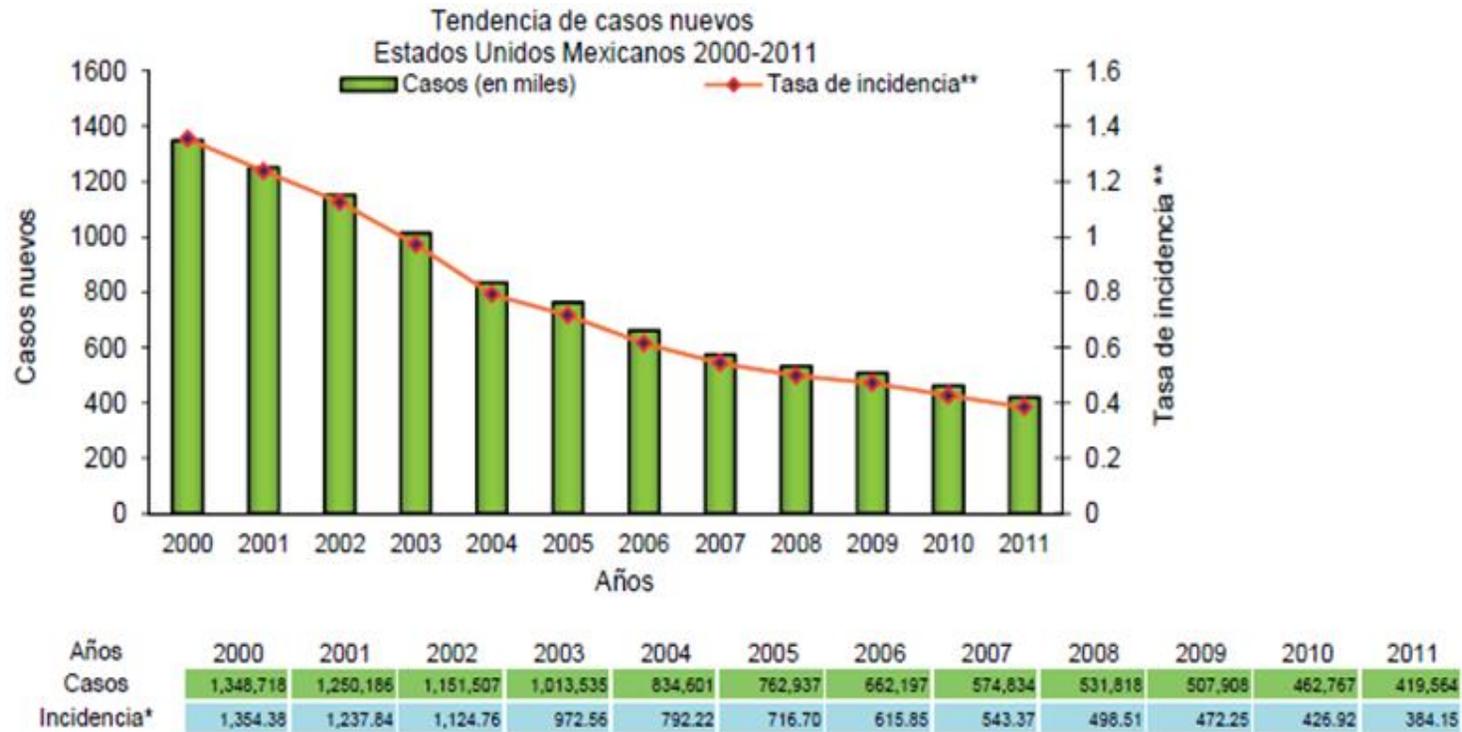
movimiento es por la formación de pseudópodos y los microtúbulos se observan durante la división nuclear. Además de los pseudópodos, también forma filopodios, los cuales son proyecciones fagocíticas con vacuolas orientadas al exterior y a una región caudal (Martínez-Palomo, 1987).

El trofozoíto es muy sensible a los cambios de temperatura, pH y osmolaridad (Bailey, 1992). Su citoesqueleto está formado por actina, miosina y tubulina (Bailey, 1992).

El núcleo del trofozoíto mide de 3 a 5 μm de diámetro, y generalmente cada trofozoíto contiene un núcleo, aunque pueden encontrarse células con más de un núcleo, así como células multinucleadas gigantes (Meza *et al.*, 1990).

La membrana nuclear de *E. histolytica* consiste en una doble capa de 120 nm de grosor con numerosos poros de 50 a 65 nm de diámetro distribuidos de manera irregular (Kretschmer, 1994; Ravdin *et al.*, 1988). Una característica importante del núcleo es que cuenta con cromatina periférica que está compuesta principalmente de RNA y que podría ser la región correspondiente al nucléolo de las células eucariotas y el endosoma central podría ser el sitio de condensación del DNA (Martínez-Palomo, 1986).

En el citoplasma de *E. histolytica* se encuentra una red de vesículas, algunas de las cuales podrían corresponder al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi (Teixeira & Huston, 2008; Ghosh *et al.*, 1999). Gran parte del citoplasma se encuentra ocupado por vacuolas circulares de aproximadamente 0.5 a 9 μm (Martínez-Palomo, 1986). Mediante técnicas de tinción, bioquímicas y estructurales, se han logrado identificar vacuolas de macro y micropinocitosis, lisosomas primarios y secundarios, cuerpos residuales, vacuolas autofágicas y ribosomas, los cuales se observan como -



FUENTE: SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2011

* Tasa de incidencia por 100 000 habitantes

** Tasa de incidencia por 100 habitantes

Figura 1. Incidencia de casos de amibiasis en México del año 2000 al 2011. (Datos tomados de SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2011).

Tabla 1. Clasificación taxonómica

Clasificación taxonómica	
Reino	Protista
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosea
Familia	Entamoebidae
Orden	Amoebida
Género	Entamoeba
Especie	<i>Entamoeba histolytica</i>

cúmulos helicoidales con 300 nm de longitud y 40 nm de diámetro (Martínez-Palomo, 1986; Ravdin *et al.*, 1988).

1.4 CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *E. histolytica* es relativamente simple, consiste de dos fases principales: un quiste infectivo y una forma invasiva (trofozoíto) (Fig. 2). El quiste tetranucleado es la forma infecciosa del parásito. Es resistente a cloración, ácido gástrico y desecación, además puede sobrevivir en un ambiente húmedo por varias semanas (Gillespie & Pearson, 2001). El ciclo inicia con la ingestión de quistes infecciosos, a través de la ingesta de agua y alimentos contaminados. Los quistes viajan por el aparato digestivo hasta el íleon donde se desenquistan y dan lugar a un protoplasto desnudo

tetranucleado. Cada uno de los núcleos se divide y el protoplasto da origen a ocho trofozoítos metaquísticos uninucleados que migran al ciego y se adhieren a la mucosa del intestino delgado y grueso y se dividen por fisión binaria (Martínez-Palomo, 1989). Los trofozoítos pueden seguir cualquiera de las siguientes vías: 1) vivir en el intestino como comensales; 2) enquistarse; 3) invadir la mucosa intestinal y producir desde síntomas leves hasta disentería grave; 4) invadir otros órganos, lo que les impedirá completar su ciclo de vida, ya que no regresan al lumen del intestino ó 5) salir del huésped con las heces para morir inmediatamente debido a su poca resistencia a las condiciones atmosféricas (Martínez-Palomo, 1986). El enquistamiento se realiza en el lumen del intestino grueso y cuando el quiste madura aparecen cuatro núcleos y el ciclo de vida se completa cuando es expulsado con las heces al medio ambiente, donde resisten las condiciones externas hasta que logran infectar un nuevo huésped (Martínez-Palomo, 1989).

1.5 MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

El mecanismo patogénico de *E. histolytica* implica tres etapas sobre la célula blanco: adhesión, citólisis dependiente de contacto y fagocitosis (Christy & Petri, 2011; Martínez-Palomo, 1986; Orozco *et al.*, 1983; Ravdin, 1896).

1.5.1 ADHESIÓN

Los trofozoítos de *E. histolytica* se adhieren a monocapas de células epiteliales en cultivo y a componentes de la matriz extracelular como colágena y fibronectina y a superficies inertes como plástico y vidrio. La adhesión de los trofozoítos a células epiteliales es esencial para la acción que efectúan y requieren de un mecanismo específico que involucra moléculas de superficie del parásito (adhesinas) y receptores de la célula blanco (Martínez-Palomo, 1986). Se ha observado que la adhesión es un paso indispensable para la sucesión de los siguientes eventos como la fagocitosis y la destrucción celular (Ravdin *et al.*, 1980).

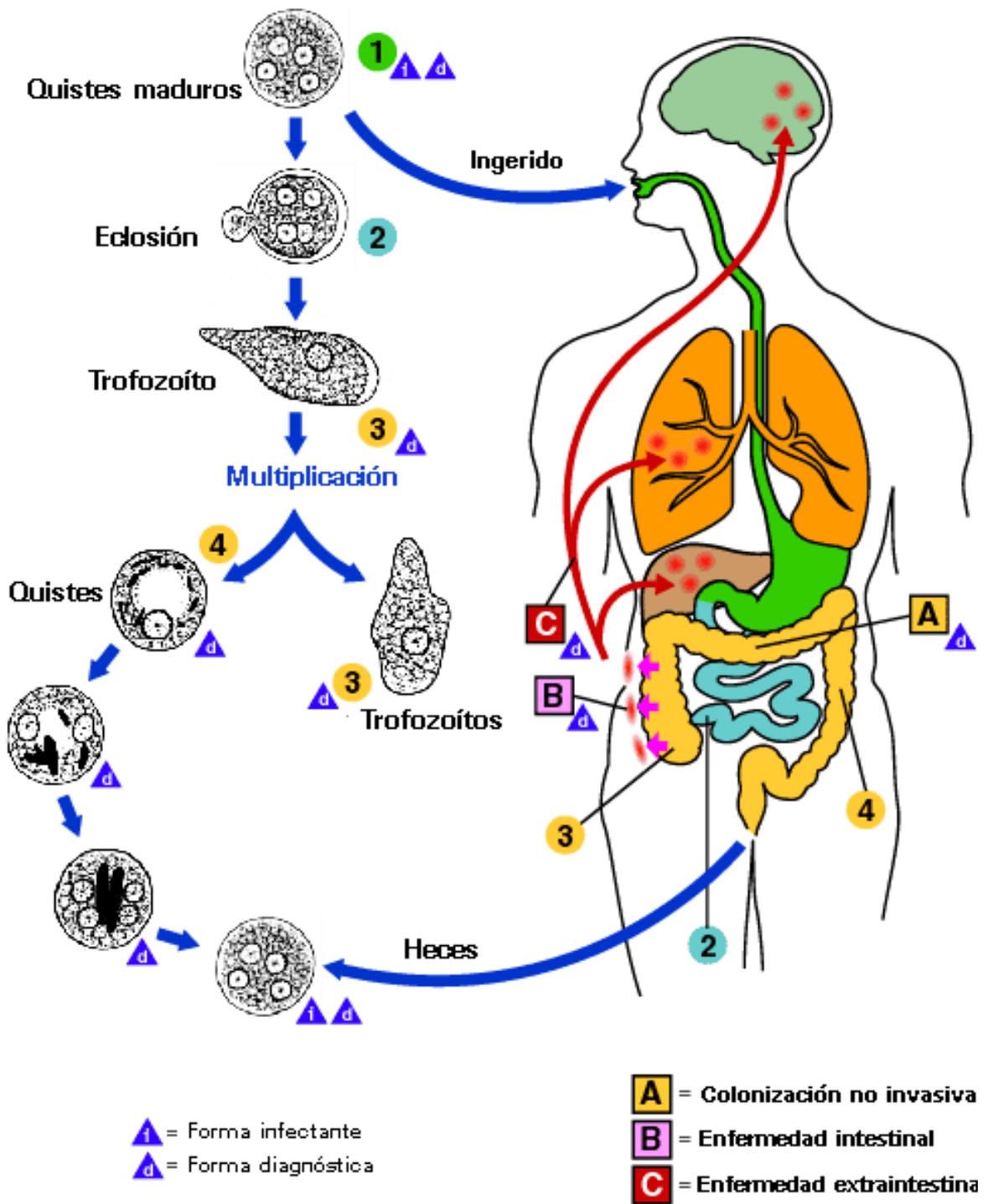


Figura 2. Ciclo de vida de *E. histolytica*. (Tomado de Amibiasis, CDC, Atlanta, 1999).

La adhesión del parásito ocurre principalmente a través de una lectina de superficie que une residuos expuestos de galactosa (Gal) y N-acetilgalactosamina (GalNAc) en las glicoproteínas de las células blanco (Christy & Petri, 2011; Petri *et al.*, 1987; Ravdin & Guerrant, 1981). Otras moléculas que participan en la adhesión incluyen una lectina de 220 kDa (Meza *et al.*, 1987), una proteína rica en serinas (SREHP) de 52 kDa (Stanley *et al.*, 1992), proteínas de 90, 70, 50 y 24 kDa (Rodríguez *et al.*, 1989) y la adhesina de 112 kDa, también llamada complejo EhCPADH (Arroyo & Orozco, 1987; García-Rivera *et al.*, 1999).

La lectina de unión a Gal/GalNAc parece ser un mediador esencial para la adherencia a diferentes líneas de células epiteliales, incluyendo las mucosas de colon de ratas y humanos (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). Esta lectina es una glicoproteína heterodimérica, cuyas subunidades de 170 y 35 kDa están unidas por enlaces disulfuro (Huston, 2004). El análisis de la secuencia de la subunidad de 170 kDa muestra una región externa que comprende tres dominios: un dominio rico en cisteína, un dominio con nueve pseudo-repeticiones de 30 residuos y un dominio pobre en cisteína (Braga *et al.*, 1992). Esta subunidad de la lectina también muestra un fragmento con homología a los componentes C8 y C9 del complemento, así como a CD59, un inhibidor del complejo de ataque a la membrana (MAC). Se ha propuesto que esta homología podría ejercer un papel protector de los trofozoítos contra el MAC (Braga *et al.*, 1992).

El complejo EhCPADH está formado por dos proteínas, una cisteína proteinasa (EhCP112) y una adhesina (EhADH112), codificados por dos genes adyacentes separados por 188 pb. La adhesina (EhADH112) tiene 687 aa y presenta un peso molecular de 75 kDa y el dominio de adherencia está localizado en el segmento que incluye los aminoácidos 444 – 601 (García-Rivera *et al.*, 1999; Martínez-López *et al.*, 2004). También, se ha propuesto que la cisteína proteinasa (EhCP112) participa en la virulencia del parásito (Ocadiz *et al.*, 2005).

1.5.2 CITÓLISIS DEPENDIENTE DE CONTACTO

Después de la adhesión a la célula blanco, el trofozoíto continúa causando daño mediante un evento citolítico rápido mediado por diversos procesos: 1) permeabilización por péptidos formadores de poros (amebaporos), 2) inducción de apoptosis y 3) ruptura de la matriz extracelular a través de cisteína proteasas (Boettner & Petri, 2005; Leippe, 1997; Seydel & Stanley, 1998).

Los amebaporos, son un grupo de péptidos pequeños de 4.5 kDa, estos péptidos forman canales iónicos por su asociación irreversible en oligómeros, similar al componente 9 del complemento y a la perforina de los linfocitos T citotóxicos (Leippe *et al.*, 1992).

El amebaporo es un factor mediador de la lisis de las células blanco por las amibas patógenas (Leippe *et al.*, 1992). En el parásito se encuentran tres isoformas de amebaporos (A, B y C) estando presentes en los trofozoítos en una proporción de 35:10:1 respectivamente (Christy & Petri, 2011; Leippe *et al.*, 1992). Los amebaporos de la clase C son más efectivos mientras que los de clase A no son eficientes en la lisis de eritrocitos (Leippe *et al.*, 1992). Se identificaron tres nuevas clases, por lo que *E. histolytica* tiene seis diferentes amebaporos (Loftus *et al.*, 2005).

Después del contacto con la célula blanco, el trofozoíto induce la activación de la caspasa 3 humana, una molécula efectora distal, requerida para la muerte celular *in vitro* y para la formación del absceso hepático amibiano *in vivo* (Huston *et al.*, 2000; Yan & Stanley, 2001).

Por otra parte la alta virulencia de los aislados de *E. histolytica* correlaciona con el alto contenido de proteinasas tipo cisteína o catepsina en productos de secreción o en extractos proteicos de trofozoítos (Stanley *et al.*, 1995). La acción de estas cisteína proteinasas (CP) es degradar las proteínas de la matriz extracelular y facilitar la invasión del trofozoíto (Stanley *et al.*, 1995).

La CP de 49 kDa que forma parte del complejo EhCPADH (EhCP112) es un polipéptido de 446 aa que presenta un dominio RGD que puede interactuar con las integrinas celulares, sugiriendo que esta proteinasa también participa en la patogenicidad de *E. histolytica* (García-Rivera *et al.*, 1999; Ocadiz *et al.*, 2005).

1.5.3 FAGOCITOSIS

Después del proceso de citólisis, la fagocitosis juega un papel importante durante el proceso de invasión del intestino humano por la amiba patógena (Christy & Petri, 2011; Marion & Guillen, 2006). Por su complejidad este proceso puede dividirse en cuatro etapas. En la primera se efectúa la unión de partículas o células a los receptores de superficie de la célula fagocítica; en la segunda la interacción entre ligandos y receptores dispara una serie de eventos incluyendo la reorganización del citoesqueleto que lleva a la extensión de pseudópodos; posteriormente los pseudópodos se estrechan alrededor de la partícula para formar un fagosoma, que se fusiona secuencialmente con los endosomas tempranos y tardíos; finalmente el fagosoma se fusiona con los lisosomas, llevando así a la digestión de las partículas internalizadas (Rabinowitz *et al.*, 1992).

En este proceso intervienen diferentes moléculas: adhesinas, componentes del citoesqueleto como la miosina IB y una proteína semejante a la espectrina (Marion & Guillen, 2006; Voigt *et al.*, 1999); así como reguladores de la estructuración del citoesqueleto, tales como las GTPasas Rho y RacG (Godbold & Mann, 1998; Guillen *et al.*, 1998); proteasas como EhCP5, EhCP1, EhCP112, EhCP2 y EhCP3 (Ankri *et al.*, 1998; García-Rivera *et al.*, 1999; Ocadiz *et al.*, 2005; Olivos *et al.*, 2004; Que *et al.*, 2002); cinasas, como EhPAK, que controlan la motilidad y la fagocitosis (Labruyere *et al.*, 2003); y moléculas que regulan el tráfico intracelular como las proteínas EhRab5, EhRab7, EhRab11B y EhRabB (McGugan & Temesvari,

2003; Rodríguez *et al.*, 2000; Saito-Nakano *et al.*, 2001; Temesvari *et al.*, 1999; Welter *et al.*, 2002).

1.6 HOMEOSTASIS DEL CALCIO

El ion calcio (Ca^{2+}) juega un papel crucial como un segundo mensajero para el control de una variedad de funciones celulares en eucariontes: contracción, secreción, permeabilidad de sodio y potasio, transcripción de genes, división celular y diferenciación entre otras (Meza *et al.*, 2006; Moreno & Docampo, 2003). Así el mantenimiento de las concentraciones citosólicas óptimas del calcio es necesario para permitir que este ion funcione como molécula de señalización y se han descrito diversas moléculas que participan en la regulación de la concentración intracelular del calcio (Clapham, 2007) (Fig. 3).

Del mismo modo, el Ca^{2+} es fundamental en procesos de señalización en parásitos protozoarios, como *E. histolytica*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis* (Moreno & Docampo, 2003).

El calcio es crítico durante la invasión por parásitos intracelulares, su concentración citosólica es regulada por la operación de varios transportadores presentes en membrana plasmática, retículo endoplásmico, mitocondria y acidocalcisomas (Moreno & Docampo, 2003).

1.6.1 REGULACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DEL CALCIO

1.6.1.1 CANALES IÓNICOS

El Ca^{2+} ingresa a las células eucariontes a través de la membrana plasmática mediante diferentes canales como canales de calcio operados por receptores, canales de calcio dependientes de voltaje y canales de calcio

operados por almacenes (Fig. 3) (Cao, 2006; Catterall, 2000; Moreno & Docampo, 2003).

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que forman un poro para permitir el paso de iones específicos mediante difusión pasiva. Se distinguen de las bombas y transportadores porque permiten el paso de miles de iones como K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- (Jentsch *et al.*, 2004). El abrir y cerrar de los canales puede ser controlado por voltaje, unión de ligandos y modificaciones post-traduccionales (Jentsch *et al.*, 2004). Muchos canales están formados por complejos de proteínas de subunidades homólogas o idénticas. A nivel celular los canales se encargan de la regulación del volumen celular, modulación de la proliferación y la transcripción, así como también del tráfico y la señalización intracelular (Catterall, 2000; Feranchak, 2003).

Los canales presentan características funcionales comunes como poseer: un poro acuoso por el cual los iones son capaces de pasar, un filtro de selectividad que permite discriminar entre los tipos de iones y una compuerta con la cual el canal puede cerrarse o abrirse al flujo de iones (Feranchak, 2003; Jentsch *et al.*, 2004).

1.6.1.2 CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE (VGCCS)

Los canales iónicos dependientes de voltaje (por sus siglas en inglés VGCCs) son grandes complejos multiproteicos, con una subunidad α_1 formando el poro en la parte central, rodeado por subunidades auxiliares γ , $\alpha_2\delta$ y β . Todas las células excitables expresan canales de calcio dependientes de voltaje, que traducen la actividad eléctrica a señales bioquímicas intracelulares (Catterall, 2000). La despolarización de la membrana trae como resultado la apertura de los canales permitiendo una rápida entrada de calcio, la cual regula procesos como la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos, la excitabilidad neuronal y la plasticidad, entre otros (Cao, 2006).

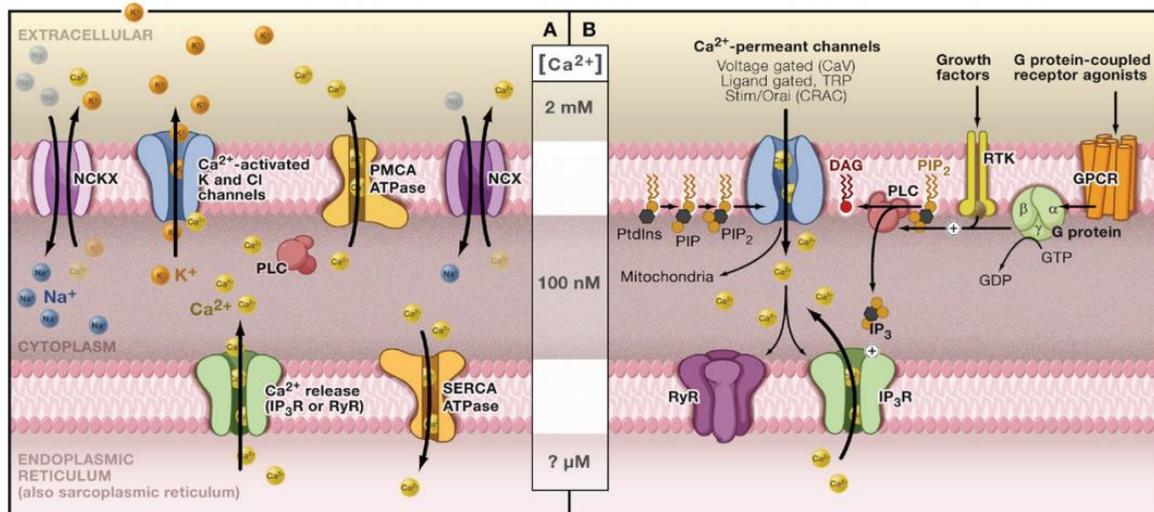


Figura 3. Moléculas que participan en la regulación de la concentración intracelular de calcio. La concentración intracelular de calcio dentro de las células es regulada usando como fuente principal de calcio el medio extracelular. La célula controla la concentración de calcio por diferentes moléculas como bombas encargadas de sacar calcio del citosol como PMCA o de introducir calcio hacia depósitos intracelulares (SERCA) e intercambiadores Na^+/Ca^{2+} que sacan calcio del citosol, receptores de IP₃ y rianodina que movilizan calcio de los depósitos intracelulares (retículo endoplásmico), y canales de calcio, que son activados cuando los niveles de calcio almacenado en los depósitos disminuye, permitiendo la entrada de calcio extracelular (TRP, CRAC, CaV) (Clapham, 2007).

Los VGCCs se dividen en dos categorías, los activados por alto voltaje (HVA), que incluye los canales de Ca^{2+} tipo R, L, N y P/Q que necesitan de una fuerte despolarización para su activación y los activados por bajo voltaje que son los canales de Ca^{2+} tipo T que pueden ser activados por una despolarización más suave (Cao, 2006) . Los canales tipo L se encuentran en el tejido cardiaco y son dependientes de dihidropiridinas (DHP). Los tipos P, N, T, Q y R se expresan en cerebro, los P y N son dependientes de ω -conotoxina, mientras que los T no dependen de ningún agonista (Cao, 2006). Los canales tipo L son más eficientes en la regulación de la expresión de genes, en cambio los tipo T son los que contribuyen principalmente al control de la excitabilidad neuronal (Cao, 2006; Catterall, 2000).

1.6.1.3 CANALES DE CALCIO REGULADOS POR DEPÓSITOS INTRACELULARES (SOCCS)

Los canales de calcio regulados por depósitos intracelulares (SOCCs) existen en los eucariontes desde levaduras a humanos. La función principal de esta vía es mantener los niveles de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico que son necesarios para el plegamiento y la síntesis proteica (Parekh & Putney, 2005). La entrada de Ca^{2+} regulada por depósitos (SOCE) sirve como el único mecanismo de entrada de Ca^{2+} en una variedad de células no excitables y juega un papel indispensable en la señalización del calcio y otros procesos celulares que van desde la proliferación hasta la apoptosis (Parekh & Putney, 2005).

El tipo de SOCC mejor caracterizado corresponde a los canales de Ca^{2+} activados por la liberación de calcio (*CRAC* por sus siglas en inglés). La búsqueda de los componentes moleculares de estos canales trajo como resultado el hallazgo de dos moléculas clave, que son STIM (molécula de interacción estromal 1) y Orai (subunidad formadora de poro del canal CRAC) (Fahrner *et al.*, 2009). STIM es una fosfoproteína, la cual cuenta con un dominio transmembranal simple, un dominio N-terminal que se compacta

en el lumen del retículo endoplásmico, un dominio C-terminal que se extiende hacia al citosol, un dominio de unión EF-Hand que junto con el dominio SAM permiten la unión del calcio a STIM1 y un dominio de N-glicosilación el cual al ser glicosilado permite la relocalización de STIM1 a la membrana plasmática (Parekh & Putney, 2005). STIM funciona como sensor de calcio en el retículo endoplásmico y cuando el calcio está en bajas concentraciones en este organelo, STIM es capaz de relocalizarse en membrana plasmática donde activa a Orai1, activación que permite una corriente de calcio conocida como I_{CRAC} (Frischauf *et al.*, 2008). Orai es una proteína de membrana plasmática con cuatro fragmentos transmembranales, los cuales son esenciales como unidades formadoras de poros de los CRAC, estos fragmentos son unidades de Orai1 que se ensamblan entre sí para formar el canal; cada subunidad es importante para la activación de este mecanismo, ya que mutaciones en cualquiera de las subunidades tiene como resultado una baja corriente de iones calcio (Frischauf *et al.*, 2008).

1.6.1.4 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITORIO (TRP)

Los receptores de potencial transitorio (*TRP*, por sus siglas en inglés) también son canales de calcio regulados por depósitos intracelulares. Estos canales de tipo TRP tienen diferentes papeles en vertebrados e invertebrados, entre ellos la transducción visual, el gusto, la detección de feromonas y la recepción térmica, entre otros (Liu & Liman, 2003). Los TRP son canales iónicos selectivos para los cationes de calcio y magnesio, éstos se encuentran en membrana y presentan estructuras similares a los canales dependientes de voltaje de potasio, sodio y cloro, ya que los canales TRP presentan 6 fragmentos transmembranales y los extremos amino y carboxilo terminal son intracelulares (Huang, 2004). Estos canales se agrupan con base en su secuencia de aminoácidos y su similitud estructural, dividiéndolos así en las familias TRPA, TRPC, TRPM, TRPL, TRPN, TRPP y TRPV (Huang, 2004; Ramsey *et al.*, 2006).

Los canales TRP pueden ser activados por receptores, ligandos o por activación directa (Ramsey *et al.*, 2006). La activación por receptores se lleva a cabo por receptores acoplados a proteínas G y por receptores de tirosina cinasas que activan a la fosfolipasa C (PLC), la cual modula la activación de los TRP, esto mediante tres vías que son: la hidrólisis del PIP₂, la producción de diacilglicerol (DAG), o la producción de IP₃ (Ramsey *et al.*, 2006). La activación por ligando se puede dar por pequeñas moléculas de origen exógeno, incluyendo compuestos sintéticos y productos naturales (capsaicina, icilina, 2-aminoethoxydifenilborato); por lípidos endógenos o por productos del metabolismo de los lípidos (DAG, IP₃, eicosanoides); por nucleótidos púricos y sus metabolitos (adenosina difosforibosa, β NAD); o por iones inorgánicos como el calcio y el magnesio (Ramsey *et al.*, 2006). La activación directa es dada por estímulos mecánicos, acoplamiento conformacional a receptores IP₃ y por fosforilación del canal, sin embargo, aún es poco lo que se sabe de este tipo de activación (Ramsey *et al.*, 2006).

1.6.1.5 INTERCAMBIADORES DE SODIO/CALCIO (NCX) E INTERCAMBIADORES SODIO/CALCIO-POTASIO (NCKX)

Los intercambiadores de sodio/calcio (NCX) pertenecen a la superfamilia de antitransportadores catión/catión, los cuales son proteínas localizadas en la membrana plasmática que tienen como función la expulsión del calcio de la célula para mantener la homeostasis del ion, pero en ocasiones estas proteínas pueden operar de modo reversible y causar un influjo de calcio (Fig. 3) (Díaz, 2003; On *et al.*, 2008). La bomba realiza el intercambio de los iones en una relación de 1:3 (una molécula de calcio por tres moléculas de sodio), este intercambio de iones utiliza la energía almacenada en el gradiente electroquímico del sodio (On *et al.*, 2008). La proteína cuenta con 9 segmentos transmembranales y en el humano existen tres isoformas NCX1, 2 y 3 (Blaustein & Lederer, 1999; Díaz, 2003). Los intercambiadores de sodio/calcio-potasio (NCKX) son proteínas de cotransporte, que al igual que las NCX se

localizan en membrana plasmática y llevan a cabo la misma función. Expulsan una molécula de calcio y una de potasio por cada cuatro moléculas de sodio que entran (Kang *et al.*, 2005). Las NCKX tienen 11 segmentos transmembranales (Altimimi & Schnetkamp, 2007).

1.6.1.6 CANALES LIBERADORES DE CALCIO

El retículo sarco/endoplásmico contiene canales especializados en la liberación del calcio: el receptor de rianodina (RyR) y el receptor de inositol trifosfato (IP3R). Estos receptores comparten homología significativa pero cada canal liberador de calcio tiene sus propias cualidades funcionales (Fill & Copello, 2002).

El receptor de rianodina (*RyR* por sus siglas en inglés) es una familia de canales liberadores de calcio encontrados en el retículo sarco/endoplásmico de muchos tipos celulares y que son requeridos para la liberación de calcio intracelular involucrado en diversas funciones celulares, incluyendo contracción y liberación de neurotransmisores (Ozawa, 2010; Zalk *et al.*, 2007). El largo dominio citoplásmico del RyR sirve como un andamiaje de proteínas que une y modula la función del canal y que comprende una compleja señalización macromolecular (Lanner *et al.*, 2010). Las proteínas de unión a este canal incluyen proteínas de unión FK506 (FKBPs), calmodulina (CaM), fosfodiesterasas, cinasas y fosfatasas, entre otras (Zalk *et al.*, 2007). Existen tres isoformas de RyR que se han identificado y clonado. El RyR es un complejo homotetramérico de aproximadamente 2200 kDa. con cuatro subunidades de 564 kDa, formando un cuadrado alrededor de un poro central (Lanner *et al.*, 2010). Tiene un largo dominio citoplásmico N-terminal que modula la entrada del ion al poro del canal el cual está localizado en el C-terminal (Fill & Copello, 2002; Lanner *et al.*, 2010).

El receptor de inositol trifosfato (IP3R) es un canal activado por ligando que funciona para liberar el calcio de almacenes intracelulares en

respuesta a IP₃ (Suresh & György, 2010). Comprende cuatro subunidades de ensamblado heterotriméricas, donde cada subunidad puede ser dividida en tres regiones: un dominio de unión a IP₃ en el N-terminal; un dominio C-terminal que comprende la secuencia formadora del canal con un tallo C-terminal corto y un dominio intermedio de acoplamiento que contiene múltiples sitios de interacción con diferentes moduladores (Mikoshiba, 2007; Szlufcik *et al.*, 2006). La secuencia necesaria para la unión específica de IP₃ también llamada centro de unión IP₃, se encuentra entre los residuos 226-578 (Szlufcik *et al.*, 2006). La función del IP₃R es regulada mediante fosforilación por cinasas dependientes de cGMP y cinasas dependientes de Ca²⁺/calmodulina (Mikoshiba, 2007).

1.6.1.7 BOMBAS DE CALCIO

Las ATPasas de tipo P son bombas iónicas que efectúan muchos procesos biológicos. Son una familia grande de proteínas de membrana presentes en prácticamente todos los organismos vivos involucradas en procesos de transporte de iones o de moléculas a través de membranas biológicas usando la energía de la hidrólisis de ATP (Chan *et al.*, 2010). Estas proteínas tienen un peso molecular de 70 a 150 kDa que muestran como patrones característicos el motivo conservado DKTGTLT y 10 hélices que atraviesan la región hidrofóbica de la membrana (Chan *et al.*, 2010; Strehler *et al.*, 2007).

Las ATPasas de tipo P son nombradas de esta manera debido a que dentro del ciclo catalítico de estas enzimas existe un intermedio fosforilado (Asp351) que es conservado (Kuhlbrandt, 2004; Scarborough, 2002; Sweadner & Donnet, 2001).

1.6.1.7.1 CICLO CATALÍTICO

La actividad de las ATPasas de tipo P es dependiente de un ciclo de autofosforilación y desfosforilación, teniendo dos principales conformaciones E1 y E2. En E1 los dos sitios de unión al calcio son de alta afinidad y en E2 los sitios de unión a calcio son de baja afinidad (Wuytack *et al.*, 2002). Las bombas de tipo P usan ATP para mantener un gradiente iónico a través de la membrana celular y cada paso es reversible. Los sitios de unión a Ca^{2+} se localizan dentro de la región intramembrana de las bombas siendo accesibles a los iones desde el citoplasma en la conformación E1 y desde el medio extracelular en la conformación E2 (Chan *et al.*, 2010).

La unión de iones del citoplasma promueve la fosforilación de la bomba, estado que obstruye los iones enlazados. Cuando el ADP se libera, se relaja la bomba a una conformación E2. Los sitios de unión al ion son expuestos a la superficie externa de la célula, ocurriendo un intercambio de iones. La desfosforilación de la conformación E2 va a causar que los iones unidos se obstruyan. La bomba se relaja al estado E1 y se repite el ciclo (Chan *et al.*, 2010; Kuhlbrandt, 2004; Wuytack *et al.*, 2002).

1.6.1.7.2 CLASIFICACIÓN DE LAS ATPasas DE TIPO P

La familia de ATPasas de tipo P se divide en cinco tipos, las cuales son específicas de sustrato. Las ATPasas de tipo I predominan en procariontes y presentan dos tipos IA y IB siendo las del tipo IA, bombas de K^{+} mientras que las de tipo IB transportan iones de metales de transición (Kuhlbrandt, 2004; Sweadner & Donnet, 2001) .

Las ATPasas de tipo II se encuentran generalmente en eucariontes, son específicas de Na^{+} , K^{+} , H^{+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} y fosfolípidos, son las más diversas y se dividen en cuatro tipos IIA-IIID. El tipo IIA está formado por la ATPasa $-\text{Ca}^{2+}$ de retículo sarcoplásmico (*SERCA* por sus siglas en inglés), la cual transporta dos iones de Ca^{2+} del citoplasma al lumen del retículo a través de la hidrólisis de una molécula de ATP (Kuhlbrandt, 2004; Wuytack *et*

al, 2002). La tipo IIB es una bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática (*PMCA* por sus siglas en inglés) en humanos y en algunos animales presentan cuatro isoformas (1-4) que son codificados por genes separados (Wuytack *et al.*, 2002). El tipo IIC incluye la ATPasa Na^+/K^+ y la ATPasa H^+/K^+ , la primera crea el potencial de membrana en células de mamíferos a través de la expulsión de tres iones sodio en intercambio de dos iones K^+ importados (Olesen *et al.*, 2007; Sweadner & Donnet, 2001; Wuytack *et al.*, 2002). Las ATPasas de tipo IID son ATPasas de Na^+ presentes generalmente en eucariontes (Kuhlbrandt, 2004).

Las ATPasas P de tipo III presentan los tipos IIIA y IIIB. La IIIA que es una bomba de H^+ que generalmente se encuentra en la membrana plasmática de plantas y hongos, se encarga de mantener un pH intracelular de 6.6 contra un pH extracelular de 3.5. La IIIB es una bomba de Mg^{2+} encontrada particularmente en especies bacterianas (Kuhlbrandt, 2004; Kuhlbrandt *et al.*, 1998; Sweadner & Donnet, 2001).

Las ATPasas de tipo IV se encuentran solo en eucariontes, están involucradas en transporte de lípidos y en el mantenimiento de la asimetría de la bicapa lipídica (Kuhlbrandt, 2004).

Las ATPasas de tipo V se encuentra en eucariontes, no se conoce claramente su especificidad, pero se han visto involucradas en el transporte de cationes en el retículo endoplásmico (Kuhlbrandt, 2004).

1.6.1.7.3 ATPasa DE CALCIO DE MEMBRANA PLASMÁTICA (PMCA)

Las bombas de calcio de membrana plasmática (*PMCA*) se encargan de expulsar Ca^{2+} del citosol de las células eucariotas (Fig. 3). Se considera como un gen constitutivo (house-keeping) debido a la expresión ubicua y a la capacidad de bajo transporte (Strehler *et al.*, 2007). Esta bomba ayuda a mantener la homeostasis del calcio y a mantener un control de la señalización del calcio intracelular (Strehler *et al.*, 2007).

En humanos se han encontrado cuatro isoformas (1-4) que son codificadas por genes independientes que incrementan su diversidad por “splicing” alternativo, sus extremos N- y C-terminal son las regiones menos conservadas y se encuentran involucrados en varias interacciones proteína-proteína como lo es la unión del regulador calmodulina en el extremo C-terminal (Strehler *et al.*, 2007). Debido a la gran diversidad de isoformas, las PMCA tiene una gran versatilidad funcional como motilidad espermática, señalización de retroalimentación en el corazón y en la regulación del calcio pre y post-sináptica en neuronas. Esto se debe a su regulación por calmodulina, por cinasas y por otras proteínas de señalización (Di Leva *et al.*, 2008; Strehler *et al.*, 2007).

1.6.1.7.4 BOMBA PMR1/SPCA

La primera ATPasa de calcio reportada como asociada al aparato de Golgi fue la PMR1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Rudolph *et al.*, 1989). Posteriormente se han encontrado homólogos de esta proteína en diferentes organismos. En el humano esta proteína se conoce como ATPasa de calcio de vías secretoras (SPCA) (Benaim, 2004; Mitchell *et al.*, 2004; Wuytack *et al.*, 2002). Se sabe que esta ATPasa atrapa calcio y manganeso, los cuales se utilizan para llevar a cabo procesos de transporte intra-Golgi, transporte entre Golgi y retículo endoplásmico y para la fusión de endosomas (Vanoevelen *et al.*, 2005).

1.6.1.7.5 ATPasa –Ca²⁺ DE RETÍCULO SARCOPLÁSMICO (SERCA)

La bomba Ca²⁺-SERCA consiste de una sola cadena polipeptídica plegada en cuatro dominios principales: un dominio transmembrana M, compuesto de 10 hélices transmembranales y 3 dominios citosólicos. Dos de estos dominios, el dominio actuador A y el dominio de fosforilación P, están conectados al dominio M, mientras que el dominio de unión a nucleótido N,

está conectado al dominio P. Los dos sitios de unión a calcio se localizan en el dominio M (Kuhlbrandt, 2004; Wuytack *et al.*, 2002).

En vertebrados se han identificado tres diferentes genes de SERCA que por “splicing” alternativo expresan cada uno diversas isoformas de la enzima (SERCA1a/b, SERCA2a/b y SERCA3a/b/c/d/e) (Wuytack *et al.*, 2002). Las ATPasas SERCA se distinguen de las bombas de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA) o incluso de las bombas SPCA de Golgi por su sensibilidad a inhibidores selectivos como tapsigargina, ácido ciclopiazónico y 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinona (Seidler *et al.*, 1989; Thastrup *et al.*, 1990; Wuytack *et al.*, 2002).

SERCA1a/b (en humanos SERCA1a de 994 aminoácidos y SERCA1b de 1001 aminoácidos) representan las isoformas más especializadas de las bombas de calcio y son encontradas en altas cantidades en el retículo sarcoplásmico de fibras de musculo esquelético de diferentes animales (Londrville *et al.*, 2000; Wuytack *et al.*, 2002).

SERCA2 parece ser filogenéticamente la más antigua, también expresa dos isoformas proteínicas SERCA2a de 997 aminoácidos y SERCA2b de 1042 aminoácidos. SERCA2a es la principal isoforma de la bomba de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico de músculo cardiaco y de fibras musculares, en cambio SERCA2b se ha considerado como una isoforma “house-keeping” (Wuytack *et al.*, 2002). En vertebrados, la isoforma SERCA2b contiene un segmento hidrofóbico con la inclinación de formar un segmento transmembrana adicional (Wuytack *et al.*, 2002). La forma SERCA2b interactúa con calreticulina o calnexina para adquirir su propiedad funcional típica (Wuytack *et al.*, 2002). La interacción de calreticulina con SERCA2b ocurre en la presencia de Ca^{2+} luminal mientras que con calnexina la interacción parece ser además dependiente de la fosforilación del residuo de serina en la posición 562 (Ser562) (Baba-Aissa *et al.*, 1996; Wuytack *et al.*, 2002).

Entre los vertebrados la bomba SERCA3 es la de más reciente descubrimiento y a la fecha se han descrito cinco diferentes variantes en humano (Wuytack *et al.*, 1995).

1.6.1.7.5.1 INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS CON SERCA

Para realizar su función, SERCA debe interactuar con varias proteínas que regulan el flujo de calcio a través de esta ATPasa. A continuación se mencionarán algunas características de la interacción de SERCA con algunas de estas proteínas.

1.6.1.7.5.1.1 INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A Ca²⁺ RICA EN HISTIDINA (HRC) CON SERCA

La proteína de unión a Ca²⁺ rica en histidina (*HRC*, por sus siglas en inglés) tiene un peso aproximado de 170 kDa se encuentra en músculo liso arteriolar y estriado, es una molécula compuesta por más del 30% de residuos ácidos y 13% de histidina (Pathak *et al.*, 1992). *HRC* es una proteína de unión a Ca²⁺ de baja afinidad y alta capacidad, debido a la presencia de numerosos residuos ácidos (Arvanitis *et al.*, 2007; Hofmann *et al.*, 1989). *HRC* se ha localizado en el lumen del retículo sarcoplásmico del músculo cardíaco. Esta proteína se asocia con el complejo del receptor de rianodina por la unión a triadin (Arvanitis *et al.*, 2007). *HRC* se une a triadin de manera dependiente de Ca²⁺, donde la unión aumenta con los niveles elevados de Ca²⁺ (Lee *et al.*, 2001). Se ha observado que *HRC* interactúa con SERCA2 en el corazón de humano y de ratón. Esta interacción se localiza en los residuos aminoácidos 310-468 de *HRC* y en los residuos 74-90 de SERCA2, la unión es también dependiente de Ca²⁺ (Arvanitis *et al.*, 2007). El aumento de Ca²⁺ disminuye la interacción entre *HRC* y SERCA2 (Arvanitis *et al.*, 2007). El dominio de unión a triadin en *HRC* está entre los residuos 600-699 (Arvanitis *et al.*, 2007). Esta interacción dual ayuda a comprender el balance entre la captación y liberación de Ca²⁺ en los

cardiomiocitos, sugiriendo que HRC regula el secuestro de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico y la relajación cardíaca (Arvanitis *et al.*, 2007; Gregory *et al.*, 2006). Se ha observado que alteraciones en estas proteínas se asocia con arritmias y daños cardíacos (Pritchard & Kranias, 2009).

1.6.1.7.5.1.2 INTERACCIÓN DE Bcl-2 CON SERCA

Bcl-2 es un miembro de una larga familia de proteínas conocidas por su papel en la regulación de la muerte celular, aunque su mecanismo de acción aun no es completamente entendido (Distelhorst & Bootman, 2011; Dremina *et al.*, 2004). Se ha propuesto que Bcl-2 actúa como una proteína formadora de canales, o como una proteína adaptadora (Dremina *et al.*, 2004). La localización de la proteína Bcl-2 en el retículo endoplásmico y en la mitocondria sugiere que juega un papel en la regulación de la homeostasis de calcio intracelular (Dremina *et al.*, 2004). El Ca^{2+} es un importante segundo mensajero, dependiendo de su abundancia, éste ion puede provocar apoptosis. Sin embargo, para que esto suceda debe de haber un incremento en los niveles de Ca^{2+} mitocondrial, lo que induce liberación de citocromo c mitocondrial y activación de caspasas (Distelhorst & Bootman, 2011). El Ca^{2+} es transportado en el retículo por SERCA y es liberado a través de canales activados por IP3 o por rianodina. Mediante el uso de tapsigargina, inhibidor específico de SERCA, se ha visto una liberación pasiva de calcio del retículo y un incremento en Ca^{2+} citosólico, el cual puede inducir apoptosis. Sin embargo la sobreexpresión de SERCA también estimula apoptosis (Dremina *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 1998). La interacción de SERCA con Bcl-2 puede estar involucrada en algunos aspectos de la regulación de procesos apoptóticos a través de la modulación de los niveles de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico (Dremina *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que una forma truncada de Bcl-2, Bcl-2 Δ 21, interactúa y desestabiliza a SERCA en vesículas de retículo sarcoplásmico de rata (Dremina *et al.*, 2004). Estas vesículas contienen a la isoforma

SERCA1 que es altamente homóloga con la isoforma SERCA presente en músculo cardiaco y músculo liso (Dremina *et al.*, 2004). La inactivación de SERCA se debe a la translocación de ésta a dominios relacionados con caveolas del retículo sarcoplásmico. El dominio transmembranal de Bcl-2 no es requerido para acelerar la inhibición de SERCA (Dremina *et al.*, 2006).

1.6.1.7.5.1.3 INTERACCIÓN DE FOSFOLAMBAN CON SERCA

Fosfolamban (*PLB*, por sus siglas en inglés) es una proteína pequeña de membrana de tipo II de 52 aminoácidos, expresada en el retículo sarcoplásmico de musculo esquelético y cardiaco (Wuytack *et al.*, 2002). PLB es el principal regulador de la cinética de contractilidad cardiaca a través de su efecto en SERCA2a (Toyoshima *et al.*, 2003). PLB interactúa e inhibe reversiblemente la actividad de SERCA fosforilando la Ser16 (James *et al.*, 2012; MacLennan *et al.*, 1998). La parte N-terminal citosólica de PLB se divide en dos subdominios [I (IA y IB) y II], los que interactúan con tres distintos sitios de SERCA. El dominio IA se une al dominio N formado por la secuencia Lys397-Asp-Asp-Lys-Pro-Val, esta secuencia está presente en SERCA1 y SERCA2 pero no en SERCA3 (Wuytack *et al.*, 2002). El dominio IB se une al *loop* L67 de SERCA. La región C-terminal de PLB involucra a Leu-28–Leu-52 o Asn-30–Leu-52 (Wuytack *et al.*, 2002).

1.6.1.7.5.1.4 INTERACCIÓN DE SARCOLIPINA CON SERCA

Sarcolipina (*SLN*, por sus siglas en inglés) es una proteína de membrana de 3kDa encontrada en retículo sarcoplásmico, que pertenece a la misma familia de proteínas que fosfolamban y tienen funciones fisiológicas similares (Traaseth *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2012). SLN inhibe la actividad de SERCA y reduce su afinidad a Ca²⁺, llevando a una disfunción de la contracción miocárdica e insuficiencia cardiaca, sin embargo aún no se sabe claramente el mecanismo. La isoleucina-17 en el dominio transmembranal de SLN está implicada en la inhibición de SERCA (Autry *et al.*, 2011). De

manera dependiente o en conjunto con PLB afecta la actividad de SERCA en el balance de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular y reduciendo la contractilidad miocárdica llegando a promover el desarrollo de insuficiencia cardiaca (Yuan *et al.*, 2012).

1.6.1.7.5.1.5 INTERACCIÓN DE CALNEXINA CON SERCA

Calnexina es una chaperona que participa en el plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico. Es una proteína transmembrana con un dominio citosólico que contiene dos motivos consenso para la unión de PKC Y PDK (Roderick *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 1998). En ovocitos de *Xenopus sp* se reportó que la coexpresión de calnexina con SERCA2b resulta en la inhibición de oscilaciones de Ca^{2+} intracelular, generando una inhibición funcional de la bomba (Roderick *et al.*, 2000). La interacción es regulada por el residuo Ser562 en el extremo C-terminal de la calnexina. Este residuo actúa como un interruptor molecular que regula la interacción de la chaperona con SERCA2b, afectando la señalización de Ca^{2+} y controlando las funciones de la chaperona sensible a Ca^{2+} en el retículo endoplásmico (Roderick *et al.*, 2000).

1.6.1.7.5.1.6 INTERACCIÓN DE STIM1 CON SERCA

La molécula de interacción estromal 1 (*STIM1*, por sus siglas en inglés), es una proteína transmembranal, localizada en el retículo endoplásmico, su función es servir como un sensor de calcio intraluminal (Roos *et al.*, 2005; Strange *et al.*, 2007). Se ha visto que *STIM1* es un regulador central de la función de las plaquetas, éstas poseen almacenes de calcio en organelos acídicos, donde *SERCA3* se encuentra involucrada en la recepción de calcio en los almacenes acídicos (Varga *et al.*, 2011). *STIM1* es requerido para el llenado de almacenes acídicos a través de su interacción con *SERCA3*, esta interacción regula la actividad de *SERCA3* la cual depende de la liberación de calcio (López *et al.*, 2008).

En plaquetas de pacientes con diabetes mellitus tipo II, la homeostasis de calcio es alterada en una elevada movilización y concentración de calcio conduciendo a una hiperactividad e hiperagregabilidad (Lopez *et al.*, 2008).

2 ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1 IMPORTANCIA DEL CALCIO EN *Entamoeba histolytica*

El ion calcio es una molécula de señalización importante, que actúa como segundo mensajero, controlando una variedad de funciones celulares en eucariontes y en parásitos protozoarios de humanos, como *E. histolytica*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania* sp, *Plasmodium* sp, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis* (Moreno & Docampo, 2003).

En general, en *E. histolytica* el ion calcio está involucrado en la patogénesis de la amibiasis. Primeramente cuando inicia el proceso citopatológico, la amiba se adhiere a la célula blanco a través de la lectina Gal/GalNAc, esta adhesión se puede inhibir por bloqueadores de canales de calcio como bepridil y verapamil (Ravdin *et al.*, 1982). Estos bloqueadores también son capaces de inhibir el crecimiento y el enquistamiento de la amiba (Makioka *et al.*, 2001). Además, el calcio induce la exocitosis de vesículas ácidas, las cuales pueden contener cisteína proteasas que constituyen factores de virulencia importantes para la amiba, cumpliendo la función de degradar componentes de matriz extracelular (Ravdin *et al.*, 1988; Trejos-Suárez & Castaño-Osorio, 2009).

La liberación del calcio de depósitos intracelulares presentes en los trofozoítos es promovido por el inositol 3-fosfato (IP3) y el inositol 4-fosfato (IP4), lo que sugiere que en la amiba puedan existir estructuras similares al retículo endoplásmico que funcionan como depósitos del ion calcio (Raha *et al.*, 1994; Raha *et al.*, 1995). Por otra parte la liberación de calcio provoca la activación de diversas cinasas y proteínas unidoras de calcio (CaBPs) en este parásito. A la fecha, se han descrito dos isoformas de estas últimas: EhCaBP1 y EhCaBP2 (Jain *et al.*, 2008). EhCaBP1 se une directamente a actina, y la sobre-expresión de una mutante de EhCaBP1 con menor afinidad a calcio tiene como resultado una baja proliferación de la amiba, una eritrofagocitosis deficiente y una baja activación de cinasas endógenas, que

pueden estar involucradas en procesos de señalización implicados en la formación del fagosoma (Jain *et al.*, 2008; Shao *et al.*, 2004). La otra proteína (EhCaBP2) es una proteína monómerica de 15 kDa, que al igual que la EhCaBP1, presenta cuatro dominios de unión a calcio (EF-hand) y está involucrada en la vía de traducción de señales de calcio (Chakrabarty *et al.*, 2004). Las dos isoformas son funcionalmente diferentes, y se unen a conjuntos diferentes de proteínas de *E. histolytica* de manera dependiente del calcio (Chakrabarty *et al.*, 2004).

El calcio también se encuentra involucrado en la regulación transcripcional de *E. histolytica*. URE3-BP es un factor de transcripción que modula la expresión genética de al menos un factor de virulencia, la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc (hgl5) (Gilchrist *et al.*, 2008). Este factor se une al motivo URE3 presente en el promotor del gen y esta unión es regulada por calcio. En ensayos *in vitro*, la adición de calcio inhibe la unión de URE3-BP a la secuencia URE3 y por tanto modifica la expresión de la lectina Gal/GalNAc y posiblemente de otros factores de virulencia (Gilchrist *et al.*, 2008).

2.2 CANALES IÓNICOS EN *E. histolytica*

En *E. histolytica* hasta el momento sólo se ha reportado la secuencia de dos canales iónicos, correspondientes a canales de cloro (*EhCIC-A* y *EhCIC-B*) (Salas-Casas *et al.*, 2006). Análisis filogenéticos muestran que estos canales codificados por la amiba pertenecen a la familia de canales de cloro de membrana plasmática, lo cual fue confirmado para *EhCIC-A* mediante el uso de anticuerpos específicos, los cuales localizaron al canal en la membrana plasmática de la amiba (Salas-Casas *et al.*, 2006). Mediante ensayos electrofisiológicos en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresaban el canal de cloro *EhCIC-A* de la amiba se mostró que este tiene especificidad por el ión cloro y que está implicado en la regulación del pH y el volumen celular (Salas-Casas *et al.*, 2006).

2.3 ATPAsas DE CALCIO EN *E. histolytica*

Hasta el momento no se ha identificado en este parásito ningún canal de calcio, por lo que no se sabe con claridad cómo es que *E. histolytica* regula su concentración intracelular de calcio. Se ha reportado una ATPasa de calcio de 1086 aminoácidos (Ghosh *et al.*, 2000), la cual por análisis *in silico* muestra dominios conservados de las ATPasas de calcio del tipo PMCA y filogenéticamente guarda relación con PMCAs encontradas en otros organismos, como *Trypanosoma cruzi* y *Dictyostelium discoideum*. En ese estudio los trofozoítos se transfectaron con un plásmido que expresa esta PMCA fusionada a un repetido de quitinasa en el extremo C-terminal. Al utilizar anticuerpos contra la quitinasa, esta proteína quimérica se localizó en vacuolas cercanas a la periferia de la ameba y no en la membrana plasmática (Ghosh *et al.*, 2000).

En nuestro grupo de trabajo, mediante análisis *in silico* se identificaron ocho secuencias que podrían codificar ATPasas de calcio en *E. histolytica* (Martínez-Higuera *et al.*, 2013). De estas posibles ATPasas de calcio solo cinco (con número de acceso EHI 030830, EHI 016480, EHI 054830, EHI 0227710 y EHI 065670) contienen todas las características de una Ca^{2+} -ATPasa: 10 dominios transmembranales, un dominio N-terminal que une al nucleótido ATP, el dominio E1-E2 que une al calcio, el dominio de hidrolasa que se encarga de la hidrólisis del ATP y un dominio C-terminal que podría tener función reguladora (Wuytack, 2002). Experimentos de RT-PCR mostraron que las cinco ATPasas de calcio putativas se expresan en los trofozoítos de *E. histolytica* (Martínez-Higuera *et al.*, 2013), sugiriendo que todas ellas podrían participar en la regulación de la concentración intracelular de calcio en este parásito.

Mediante análisis filogenéticos se encontró que tres de estas secuencias (EHI 030830, EHI 016480, EHI 054830) se agrupan con ATPasas de calcio de membrana plasmática (PMCA), una (EHI 0227710) con la ATPasa de calcio de retículo endoplásmico (SERCA) y una última (EHI 065670) con las ATPasas de calcio de Golgi (PMR1/SPCA) (Martínez-Higuera *et al.*, 2013) (Fig. 4).

La probable ATPasa del tipo SERCA, contiene en su extremo C-terminal una secuencia HDDL similar al motivo de retención al retículo endoplásmico de *Saccharomyces cerevisiae* (HDEL), difiriendo en un residuo de glutamato por aspartato (Martínez-Higuera *et al.*, 2013). La incubación de trofozoítos con un bloqueador específico de SERCA, tapsigargina, causó una disminución en sus propiedades de virulencia *in vitro* (adhesión, efecto citopático y fagocitosis) denotando que la amiba cuenta con un retículo endoplásmico funcional que cuenta con una proteína homóloga a la ATPasa del tipo SERCA (Martínez-Higuera *et al.*, 2013).

Para iniciar la caracterización de esta ATPasa del tipo SERCA (*EhSERCA*), ratones se inmunizaron con un péptido sintético correspondiente a una secuencia específica de *EhSERCA* para obtener anticuerpos contra esta proteína (anti-*EhSERCA*). Estos anticuerpos reconocieron una sola banda de aproximadamente 115 kDa en extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica* (Fig. 5) (Martínez-Higuera *et al.*, 2013). Ensayos de inmunolocalización mediante fluorescencia indirecta utilizando esos anticuerpos detectaron a la proteína en una red citoplásmica continua (Fig. 6), semejante a la estructura reportada como el retículo endoplásmico de *E. histolytica* (Martínez-Higuera *et al.*, 2013). Además estos ensayos de microscopía confocal y otros de microscopía electrónica mostraron que *EhSERCA* colocaliza con la proteína calreticulina, proteína localizada principalmente en retículo endoplásmico (Martínez-Higuera *et al.*, 2013). Estos resultados sugieren fuertemente que la proteína identificada pudiera corresponder a la ATPasa de calcio del tipo SERCA. Sin embargo, hasta el momento se desconocen las proteínas amibianas que interaccionan con *EhSERCA* y que pudieran estar participando en la regulación del flujo de calcio en *E. histolytica*.

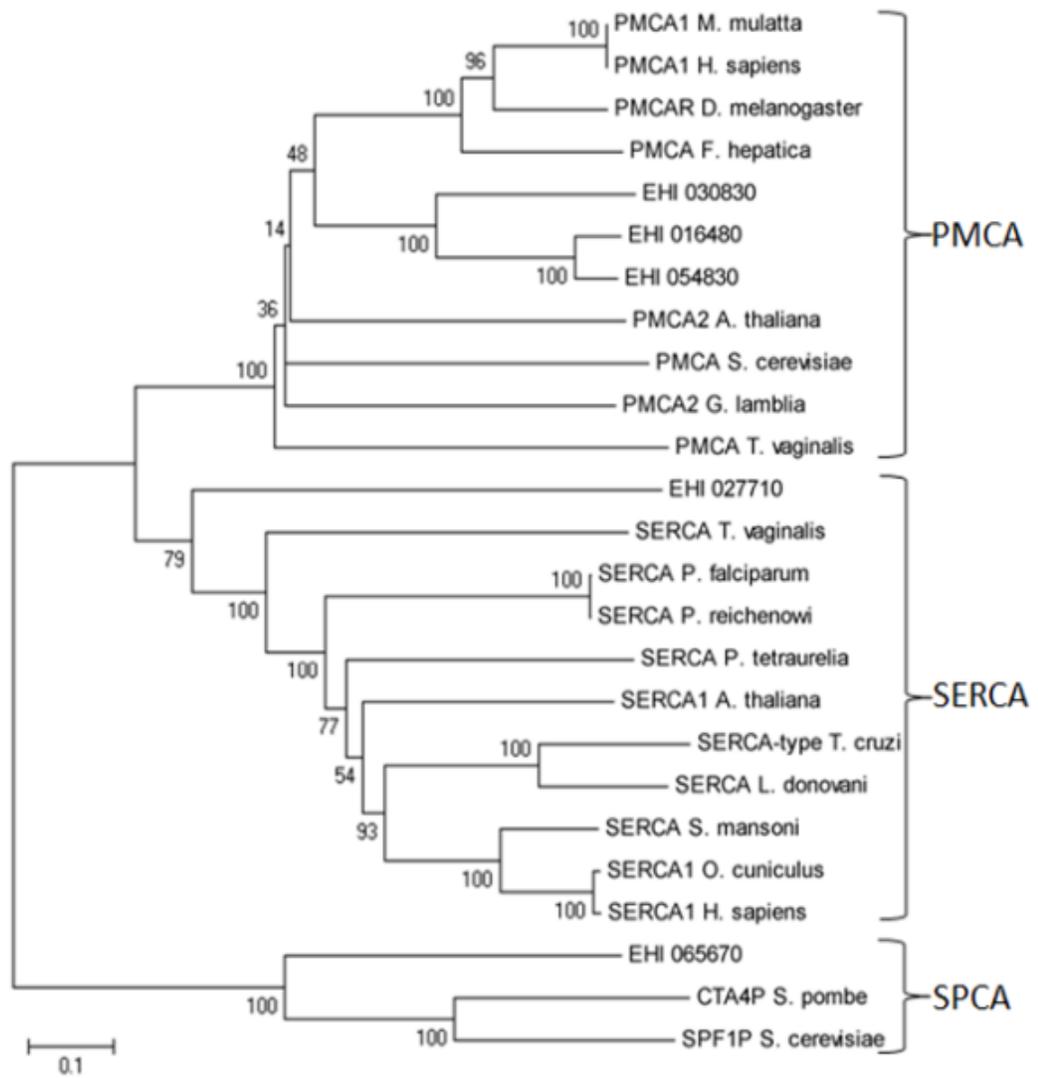


Figura 4. Análisis filogenético de las posibles ATPasas de calcio en *E. histolytica*. Las secuencias de las ATPasas de calcio de *E. histolytica* (EHI_030830, EHI_016480, EHI_054830, EHI_0227710, EHI_065670) se compararon y con las de diferentes organismos y se realizó un análisis filogenético utilizando el programa MEGA4. Los valores numéricos en las ramificaciones son los valores de bootstrap en 1000 repeticiones. Las secuencias de otras especies son: SPCA *Homo sapiens* (NP_055676.2), Pmr1 *Schizosaccharomyces pombe* (NP_595098.1), PMR1 *Homo sapiens* (AAF26295.1), PMR1b *Saccharomyces cerevisiae* (NP_011348.1), SERCA *Paramecium tetraurelia* (CAA76764.1), Ca²⁺-ATPase *Leishmania amazonensis* (AAC47505.1), SERCA *Pan troglodytes* (XP_001141715), PAT1 protein *Dictyostelium discoideum* (CAA61551.1), PMC1p *Saccharomyces cerevisiae* (NP_011509), PMCA *Macaca mulatta* (XP_001102118.1) (Martinez-Higuera *et al.*, 2013).

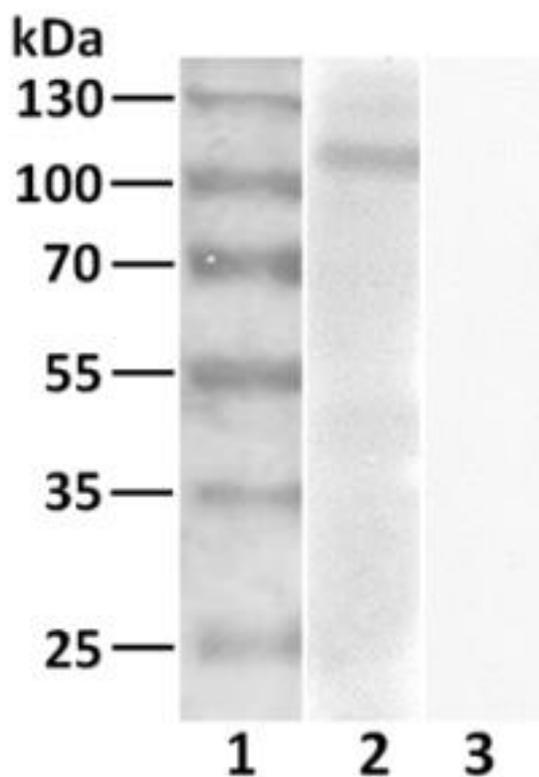


Figura 5. Inmunodetección de la posible ATPasa de calcio del tipo SERCA de *E. histolytica*. Los extractos totales de trofozoítos se separaron en geles de poliacrilamida al 10 %. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa para experimentos de Inmunodetección. En estos ensayos se utilizó el anticuerpo anti-SERCA (dilución 1:400) producido en ratón con un péptido sintético correspondiente a una secuencia específica de *EhSERCA* y el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa (dilución 1:20000). Finalmente, el reconocimiento de los anticuerpos se reveló por quimioluminiscencia. Carril 1, marcador de peso molecular Benchmark pre-Stained protein Ladder (Invitrogen); carril 2, suero inmune; carril 3, suero preinmune (Martinez-Higuera *et al.*, 2013).

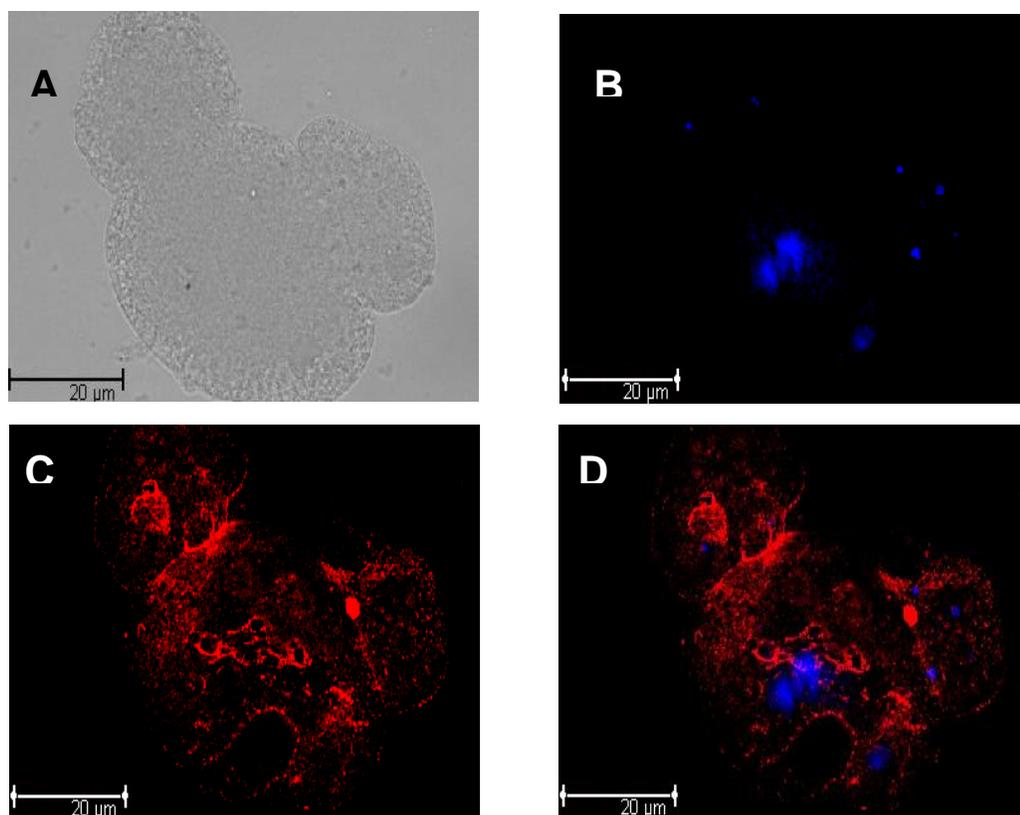


Figura 6. Inmunolocalización de EhSERCA en trofozoítos de *E. histolytica*. Los trofozoítos de *E. histolytica* se fijaron con paraformaldehído y se permeabilizaron con PBS-Triton X-100. Posteriormente, las muestras se incubaron con el suero anti EhSERCA (A-D) y con un segundo anticuerpo acoplado a rodamina. Después los núcleos se tiñeron con DAPI. Finalmente las muestras se analizaron por microscopia confocal. (A) Campo claro, (B) canal azul (DAPI), (C) canal rojo (rodamina), (D) traslape de canales azul y rojo (Martinez-Higuera *et al.*, 2013).

3 JUSTIFICACIÓN

El ion calcio es una molécula de señalización importante, considerado como un segundo mensajero, que es utilizado por las células eucariotas para controlar diversas funciones celulares como la contracción muscular, la división celular, la diferenciación, la transcripción de genes, la secreción de hormonas y la permeabilidad a los iones sodio y potasio, entre otras.

En *E. histolytica* el ion calcio tiene un papel importante en el proceso patogénico, ya que al bloquear su transporte se inhibe la adhesión y la lisis ocasionada por la amiba. El flujo de calcio también induce la exocitosis de vesículas ácidas, está involucrado en el proceso de diferenciación e incluso se encuentra involucrado en la regulación transcripcional.

En nuestro laboratorio se identificó una ATPasa de calcio del tipo SERCA en *E. histolytica* que posiblemente está encargada de regular la concentración de calcio intracelular en este parásito. Sin embargo, hasta el momento se desconoce la existencia de otras proteínas asociadas a SERCA que participan en su función. Identificar las proteínas que interaccionan con *EhSERCA* aportará conocimiento de cómo se regula la concentración intracelular del calcio en este parásito y de los procesos biológicos en que podría estar relacionada, como patogenicidad y diferenciación.

4 HIPÓTESIS

La ATPasa de calcio *EhSERCA* lleva a cabo diversas interacciones proteicas encargadas de la homeostasis del ion calcio en *Entamoeba histolytica*.

5 OBJETIVOS

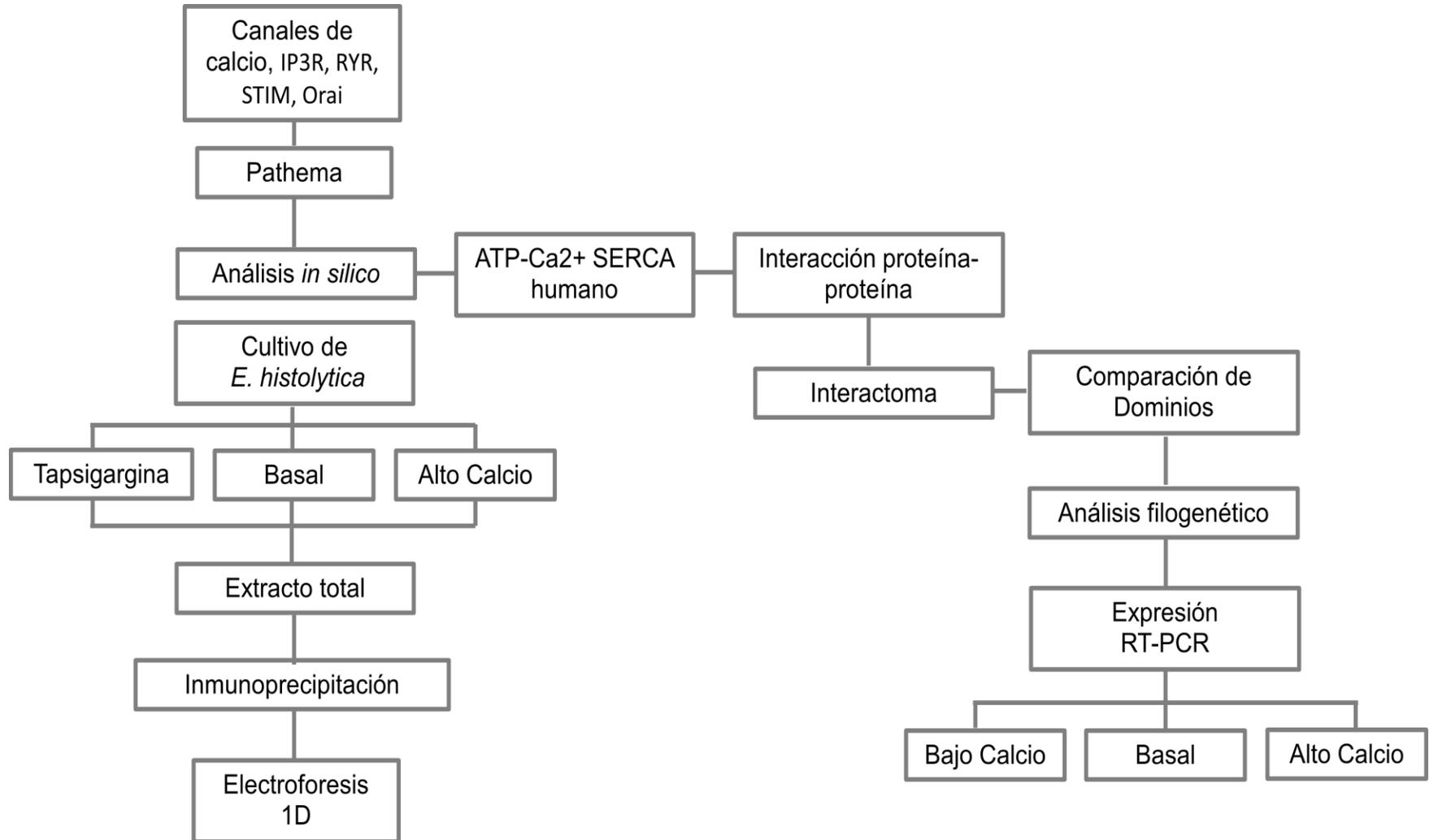
5.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar proteínas que interactúen con la ATPasa de calcio de retículo endoplásmico de *E. histolytica* (*EhSERCA*).

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Proponer por análisis *in silico* proteínas candidatas a interactuar con *EhSERCA*
2. Seleccionar una proteína y analizar la expresión de su gen codificante en condiciones de:
 - a) Bajo calcio
 - b) Basal
 - c) Alto calcio
3. Identificar experimentalmente las posibles interacciones de *EhSERCA* con otras proteínas por inmunoprecipitación

6 DISEÑO EXPERIMENTAL



7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 ANÁLISIS *IN SILICO*

Debido a que no se cuenta con una base de datos con posibles interacciones entre proteínas amibianas, se realizó un análisis *in silico* de las posibles interacciones proteína-proteína de las tres isoformas de SERCA de humano usando las bases de datos y el programa accesibles en el sitio STRING 9.0, (<http://string-db.org/>). Las secuencias de aminoácidos presentes en las proteínas de humano que interaccionan con la proteína SERCA se buscaron mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en el centro de recursos bioinformáticos Pathema-*Entamoeba* (<http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Entamoeba/PathemaHomePage.cgi>), para identificar posibles ortólogos de esas proteínas en *E. histolytica*. Así mismo se realizó la búsqueda en la base de datos del genoma amibiano Pathema de proteínas conocidas en otros organismos que interaccionan con SERCA (STIM, Orai, receptores de IP3, etc.). Posteriormente, para confirmar la posible identidad de las proteínas amibianas encontradas. Se analizó la presencia de dominios estructurales similares a los presentes en las proteínas de humano mediante el programa SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>). Por otra parte, se analizó la relación filogenética de las secuencias candidato utilizando el programa MEGA4 (<http://www.megasoftware.net/>).

7.2 CULTIVO DE *E. histolytica*

Trofozoítos de *E. histolytica* de la clona A (cepa HM1-IMSS) (Orozco *et al.*, 1983) se cultivaron a 37 °C en medio axénico TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1978). El medio fue suplementado con 15% de suero bovino inactivado por calentamiento a 56 °C durante 30 min, 3 % de mezcla de vitaminas de Diamond (KC Biológica, USA), 40 UI de penicilina y 57 µg/ml de estreptomycin (Diamond *et al.*, 1978). Los parásitos se colectaron en fase logarítmica de crecimiento por

incubación en baño de hielo durante 5 a 10 min y se centrifugaron a 800 x g durante 10 min a 4 °C para obtener el paquete celular.

7.3 AISLAMIENTO DE RNA DE TROFOZOÍTOS DE *E. histolytica*

Los trofozoítos se empastillaron a 201 x g durante 5 min a 4 °C y las células se cuantificaron colocando 10 µl de la suspensión de trofozoítos en la cámara de Neubauer. Posteriormente los trofozoítos se lavaron una vez con PBS (2 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl pH 7.4) para eliminar el medio de cultivo. Entonces, para cada 1x10⁷ trofozoítos se agregó 1 ml de trizol (Sigma) y se incubaron 10 min a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, se agregaron 200 µl de cloroformo/trizol a los tubos y se agitaron por 30 seg para después ser incubados por 10 min a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación, la suspensión se centrifugó a 1500 x g por 15 min a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y se le adicionaron 500 µl de isopropanol frío/trizol y se agitó por inversión. Después se incubó a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 x g por 10 min a 4 °C, la pastilla de RNA se lavó una vez con 1 ml de etanol al 75% con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC, Sigma) y se centrifugó a 6000 x g durante 5 min a 4 °C. La pastilla de RNA se secó y finalmente, se disolvió en 30 µl de agua tratada con DEPC.

En los ensayos donde se analizó el efecto del calcio en la expresión del gen de interés, los trofozoítos se cosecharon y se lavaron una vez, dependiendo la condición, con: 1) una solución de alto calcio (100mM KCl, 2 mM CaCl₂, 10 mM NaCl, 10 mM Pipes, 10 mM glucosa), o 2) con una solución de bajo calcio (100mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 10 mM Pipes, 10 mM glucosa). Posteriormente, las células se resuspendieron en 5 ml de: 1) solución de bajo calcio en ausencia o en presencia de 5 µg del ionóforo A23187; y 2) solución de alto calcio en ausencia o en presencia de 5 µg del ionóforo A23187. Entonces, los trofozoítos se incubaron 5 min a temperatura ambiente. A las amibas que

fueron tratados con el ionóforo, éste se adicionó a los 2 min y se dejó completar los 5 min de incubación. Al término de este tiempo, se obtuvo el RNA como se describió anteriormente

7.4 OBTENCIÓN DE cDNA

Para la síntesis del cDNA se utilizaron 5 µg de RNA a los que se agregó 1 µl de oligo dT (Sigma) y 10 µl de agua estéril y se incubó 10 min a 70 °C. Pasado el tiempo de incubación las muestras se pasaron a hielo por 5 min. Posteriormente se adicionaron 4 µl del amortiguador First Buffer (Sigma), 2 µl de DTT (Sigma), 1 µl de dNTPs (10 mM) (Sigma) y se mezclaron suavemente. Las mezclas se incubaron a 42 °C durante 4 min, se adicionó 1 µl de la enzima SSII (Invitrogen) y se incubó a 42 °C durante 50 min. Después las mezclas se incubaron a 70 °C durante 15 min y entonces se adicionaron 2 µl de RNAsa (10mg/ml) libre de DNAsa (Sigma). Por último, las muestras se incubaron por 20 min a 37 °C y se guardaron a -70 °C hasta su uso.

7.5 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES Y RT-PCR

Para amplificar por PCR la secuencia EHI_001770, que codifica para un posible intercambiador de sodio/calcio, se diseñaron oligonucleótidos específicos. El oligonucleótido en sentido se diseñó utilizando la secuencia localizada en las posiciones 1-33 con respecto al codón de inicio de la traducción (5'-TGAAACAGATGAATAAAATTTATATTATATTA-3'). El oligonucleótido antisentido correspondió a la secuencia complementaria reversa del gen codificante localizada en el extremo 3' del gen (sitio 1516-1542) (5'-TTAACCAAACAGTTTAAAACGTTAA-3'). Para la amplificación de los fragmentos por PCR a partir de cDNA, a un tubo para PCR se añadieron 50 ng de cDNA, 1 µM de los oligonucleótidos iniciadores en sentido y en antisentido (10 µM), 1.5 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 2 mM de MgCl₂, 1.0 U

de la enzima Taq polimerasa recombinante (Invitrogen) y agua bidestilada en un volumen final de 50 μ l. Como control negativo se realizaron las mismas reacciones en ausencia de cDNA como molde. También se hicieron las mismas reacciones utilizando RNA como molde para verificar la ausencia de DNA contaminante en los ensayos. La amplificación se realizó utilizando el termociclador *PCR system 2700* (Applied Biosystems), empleando las siguientes condiciones: 1) desnaturalización durante 3 min a 94 °C; 2) 28 ciclos de 45 seg a 94 °C, 1 min a 58.1 °C y 3 min a 68 °C; y 3) una extensión final de 10 min a 63 °C. Como control de carga se realizó la amplificación del gen de actina utilizando como iniciadores los oligonucleótidos sentido 5'-AGCTG TTCTTTCATTATATGC-3' y antisentido 5'TTCTCTTTCAGCACTAGTGGT-3' con una temperatura de alineamiento de 54 °C.

Los productos de RT-PCR se analizaron en geles de agarosa a una concentración de 1%, los cuales se prepararon en amortiguador TBE 1X (trisborato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0). Previamente, las muestras se mezclaron con amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilencianos 0.25% y glicerol 30%). La electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje de 70 V constante por 60 min aproximadamente. Como marcador de tamaño molecular se utilizó Quick-load DNA ladders 1kb (250-10000bp) (Invitrogen). Para la detección del transcrito los geles se tiñeron con Bromuro de etidio al 0.5 μ g/ml y el transcrito se visualizó con un transluminador de luz UV. Para determinar la expresión relativa del gen del intercambiador, las bandas amplificadas se analizaron por densitometría utilizando el programa ImageJ. Los datos se normalizaron con respecto a los de la amplificación del gen de actina y los resultados obtenidos en la condición basal se tomaron arbitrariamente como unidad de expresión relativa. El análisis estadístico se realizó a partir de tres repeticiones en el programa GraphPad Prism 5 utilizando una forma ANOVA no paramétrico y una comparación estilo Bonferroni.

7.6 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Para la obtención de las proteínas de los trofozoítos, 3×10^6 células se cosecharon enfriando en hielo de 5 a 10 min, los trofozoítos se lavaron dos veces con PBS y se centrifugaron a $201 \times g$ durante 5 min a 4°C . Posteriormente, se agregaron 400 μl del amortiguador RIPA 1X (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EGTA, 0.1% NP-40 1% desoxicolato de sodio) por cada 10^7 células, más un “pool” de inhibidores de proteasas (3 mM TLCK, 3mM IA, 3 mM NEM, 1 mM PMSF). La mezcla obtenida se pasó diez veces por jeringa con aguja del número 21G, después se congeló y descongeló cuatro veces en nitrógeno líquido. Entonces se centrifugó a $201 \times g$ durante 10 min a 4°C y el sobrenadante obtenido se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para la obtención de las proteínas en condiciones de alto calcio, los trofozoítos se lavaron una vez con una solución alta en calcio (100 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 10 mM NaCl, 10 mM Pipes, 10 mM glucosa) se centrifugaron a $201 \times g$ durante 5 min a 4°C .

Entonces, las amibas se resuspendieron en 5 ml de la misma solución y se incubaron durante 5 min antes de realizar la extracción de proteínas. Por otra parte, para la obtención de proteínas de trofozoítos tratados con tapsigargina (TG) (Sigma), un bloqueador específico de las ATPasas de calcio del tipo SERCA, las células resuspendidas en medio TYI se incubaron en presencia de TG a una concentración de 50 nM disuelto en DMSO por 10 min. Pasado el tiempo de incubación, se obtuvieron las proteínas totales como se mencionó anteriormente.

7.9 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la cuantificación de proteínas, primero se preparó una curva estándar con albumina de suero bovino (BSA) colocando 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 y 25 μl de BSA a una concentración de 1mg/ml, así como la

cantidad suficiente de agua para alcanzar un volumen total de 20 µl. Entonces, se agregaron 180 µl de solución de Bradford (0.25 g de azul de Coomassie R-250, 90 ml de metanol y 10 ml de ácido acético glacial) y se incubó durante 3 min. Posteriormente la absorbancia a 595 nm de cada muestra se midió en un lector de ensayos de ELISA (Tecan Sunrise). Como blanco se utilizó una mezcla de 20 µl de agua miliQ/desionizada y 180 µl de reactivo de Bradford. Con la lectura obtenida se realizó una curva estándar, graficando la concentración de BSA en el eje de las X y la absorbancia obtenida en el eje de las Y. Para determinar la concentración de proteína en las muestras de lisados amibianos en diferentes condiciones (basal, alto Ca^{2+} y bajo Ca^{2+}), se realizó la misma metodología utilizando 1 µl de cada muestra y la absorbancia obtenida se interpoló en la curva estándar.

7.10 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

La separación de proteínas por electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes. Para ello, el gel separador se preparó con los siguientes reactivos: 10% acrilamida, 0.9% Bis-acrilamida, 0.375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.1% PSA (persulfato de amonio) y 0.15% TEMED; mientras que el gel concentrador se preparó con 6% acrilamida, 0.9% Bis-acrilamida , 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.1% PSA y 0.15% TEMED; como amortiguador de corrida se utilizó una solución de 25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glicina y 0.1% SDS. La electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 110 V (25 miliamperios) por 60 min. Después de la separación de las proteínas en los geles de poliacrilamida, éstos se tiñeron durante 20 min con 0.05% azul de Coomassie en 50% metanol y 10% ácido acético a temperatura ambiente y en agitación. Para desteñir los geles, se incubó en una solución de metanol al 5% y ácido acético al 7% en agitación, hasta que las bandas de las proteínas aparecieron en color azul sobre un fondo transparente.

7.11 WESTERN BLOT

En otros casos, después de la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. El gel y la membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.45 μm (Millipore) se equilibraron por 40 min en una solución amortiguadora de transferencia (25 mM Tris-HCl, pH 8.3; 192 mM glicina, 20% metanol). Enseguida, se realizó un emparedado de la siguiente manera: primero se colocó la unidad de transferencia (BioRad) en una bandeja con la solución amortiguadora, después se colocó un cojinete de fibra "Scotch Brite" y después dos capas de papel filtro, previamente humedecidos en la solución amortiguadora, sobre el papel filtro se colocó el gel hacia al cátodo y sobre éste el papel de nitrocelulosa hacia el ánodo. Posteriormente, se colocó otro pedazo de papel filtro, y encima otro cojinete de fibra. Por último, la unidad se cerró y se colocó en la cámara de transferencia (BioRad), la cual contenía la solución amortiguadora de transferencia. La transferencia se realizó a 100 V durante 2 h, la corriente inicial fue de 0.2 mA y se incrementó lentamente hasta 0.7 mA. Cuando la transferencia terminó, el gel se tiñó con azul de Coomassie para verificar la eficiencia de la transferencia, mientras que la membrana de nitrocelulosa se incubó en agitación durante toda la noche a 4 °C con PBS-Tween 20 al 0.5 % (Sigma) con leche descremada al 3 % (BioRad) (PBS-Tween-leche), para bloquear las uniones inespecíficas. Después, las membranas se incubaron a 4 °C en agitación durante toda la noche con el primer anticuerpo de ratón (policlonal anti-EhSERCA) diluido 1:400 en PBS-Tween-leche. Posteriormente, el exceso de anticuerpo se eliminó lavando la membrana de 3 a 4 veces con PBS-Tween por 5 min a temperatura ambiente. Después, la membrana de nitrocelulosa se incubó por 4 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo (anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa) (Zymed) en una dilución de 1:20000 diluido en PBS-Tween-leche. Las membranas se lavaron por 5 min a temperatura ambiente, dos veces con solución amortiguadora de fosfatos 20 mM pH 7.4 y por último se lavó con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.4. Finalmente, las membranas

se lavaron y revelaron por quimioluminiscencia (ECL Plus, Amersham), de acuerdo al protocolo del fabricante.

7.12 INMUNOPRECIPITACIÓN

50 μg de extractos totales obtenidos de los trofozoítos tratados con alto calcio, taspigargina (Sigma), o de manera basal fueron diluidos con 300 μl de amortiguador RIPA al 0.5 X y se incubaron con 24 μg de suero preimmune. Posteriormente, las muestras se incubaron con 10 μl de perlas de sepharosa acopladas a Proteína G (rec-protein G-sepharose) (Life technologies) por 30 min a 4 °C. Entonces, las proteínas de interacción no específica que se unieron a la matriz fueron excluidas por centrifugación a 239 x g por 5 min a 4 °C. Posteriormente, el sobrenadante se incubó con 24 μg (3.2 μl) del anticuerpo anti-*Eh*SERCA de ratón por 2 h a 4 °C. Al término de este tiempo se agregaron 20 μl de perlas con proteína G durante 16 h a 4 °C. Las proteínas que se unieron al complejo proteína G-anticuerpo se precipitaron por centrifugación a 239 x g por 5 min a 4 °C y se lavaron tres veces con 100 μl del amortiguador RIPA 0.5 X. Finalmente, las proteínas inmunoprecipitadas fueron analizadas en SDS-PAGE al 10%.

8 RESULTADOS

El ion calcio es una importante molécula de señalización, ya que actúa como segundo mensajero controlando una variedad de funciones celulares (Moreno & Docampo, 2003). Para que la señalización por calcio funcione correctamente su concentración intracelular debe ser regulada en su concentración intracelular (Clapham, 2007). En *E. histolytica*, se ha demostrado que el ión calcio participa en procesos de señalización que regulan la actividad de diversos factores de virulencia implicados en el proceso citopatogénico ocasionado por la amiba (Gilchrist *et al.*, 2008; Makioka *et al.*, 2001; Ravdin *et al.*, 1988; Que & Reed, 2000). Sin embargo poco es lo que se sabe sobre los mecanismos de regulación del calcio en *E. histolytica*.

En nuestro grupo de trabajo se identificaron cinco posibles ATPasas de calcio en *E. histolytica*, entre las cuales se encuentra un posible miembro de la familia SERCA (*EhSERCA*) (Martínez-Higuera *et al.*, 2013).

En otros organismos se ha visto que la ATPasa de calcio SERCA interacciona con varias proteínas que le ayudan a regular el flujo de calcio (Arvanitis *et al.*, 2007; Dremina *et al.*, 2006; Wuytack *et al.*, 2002; Autry *et al.*, 2011; Roderick *et al.*, 2000), por lo tanto identificar proteínas que interaccionen con *EhSERCA* puede llevar a dilucidar mecanismos involucrados en la regulación de la concentración de calcio en este parásito.

8.1 Identificación *in silico* de proteínas que posiblemente interaccionan con *EhSERCA*

Para tratar de identificar *in silico* proteínas que posiblemente interaccionen con *EhSERCA*, primero se partió de un análisis en la aplicación del programa STRING 9.0 (<http://string-db.org>) de la base de datos de ExPASy (<http://www.expasu.org>). Debido a que aún hay pocos datos experimentales de interacciones entre proteínas (interactoma) de *E. histolytica*, en este trabajo se usaron las isoformas de la ATPasa-Ca²⁺

SERCA de *Homo sapiens*. En estos análisis se encontró un total de 22 proteínas que interaccionan con las diferentes isoformas del humano (Fig. 7), entre las cuales se encuentran: sarcolipina (SLN), fosfolamban (PL), receptores de rianodina (RYR Y RYR2) y la proteína rica en histidinas (HRC), entre otras. Al analizar las funciones que se han descrito para estas proteínas en el humano, se pudo observar que algunas participan como factores de transcripción, otras como reguladores del flujo de calcio, otras con actividad de fosfatasa y otras que mediante su interacción con SERCA regulan la actividad de la bomba.

Con el fin de identificar proteínas amibianas ortólogas a las identificadas en el interactoma del humano, se buscaron secuencias de aminoácidos homólogas a las de esas proteínas mediante BLAST en la base de datos de secuencias genómicas de *E. histolytica* (<http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Entamoeba/PathemaHomePage.cgi>). En este análisis se encontraron 12 proteínas amibianas que presentaron similitud e identidad, con péptidos presentes en las proteínas de humano que interaccionan con las diferentes isoformas de SERCA (Tabla 2).

Al analizar el valor *e*, que representa el número de alineamientos diferentes que se deben al azar y que mientras más bajo sea este valor es más significativo el alineamiento ($\leq 10^{-6}$), encontramos que de las 12 proteínas encontradas por el análisis de BLAST, solo 4 presentaron un valor estadísticamente significativo ($\leq 10^{-6}$) (Tabla 2). Estas proteínas corresponden a la cadena pesada 8 de la dineína axonemal (DNH8), el factor de transcripción sp1, un intercambiador de sodio/calcio y la subunidad regulatoria 4 de la proteína fosfatasa 2A (PPP2R4) (Tabla 2). Dos de estas proteínas amibianas, las correspondientes a las similares a DNH8 y sp1, son aproximadamente 2.4 y 4 veces más pequeñas, respectivamente, que las proteínas de humano (Tabla 2), por lo que pensamos que podrían no ser las proteínas amibianas ortólogas a ellas. Así, en este análisis sólo encontramos dos proteínas amibianas que muy probablemente son las ortólogas al

intercambiador sodio/calcio y a PPP2R4. Estos resultados sugieren que estas dos proteínas, al igual que las correspondientes de humano, pudieran participar en la regulación de la concentración intracelular del calcio en *E. histolytica*.

8.2 Análisis filogenético del posible intercambiador sodio/calcio de *E. histolytica*

Una vez que se obtuvieron las proteínas que podrían interaccionar con *EhSERCA*, nos decidimos por el estudio del posible intercambiador sodio/calcio (EHI_001770) la cual corresponde a una proteína putativa de la familia de intercambiadores. La proteína presenta una identidad del 24% y, una similitud de 42% comparado con su ortólogo en *Homo sapiens*, presentando un valor de e de 1.3×10^{-7} (Tabla 2). En humano existen cinco genes que codifican para este tipo de proteínas que se localizan en la membrana plasmática ayudando a liberar calcio de la célula mediante un gradiente electroquímico de los iones sustrato y se sabe que en otras células existe una proximidad entre el intercambiador y SERCA permitiendo regular los almacenes de Ca^{2+} en el retículo (Fameli, 2007; Kuszczak, 2010).

Al hacer el análisis filogenético de la proteína amibiana en el programa MEGA4 (<http://www.megasoftware.net/>) se observó como en el dendograma se forman dos grupos principales, uno comprendiendo tanto intercambiadores sodio/calcio/potasio (NCKX) como intercambiadores sodio/calcio (NCX) y otro sólo con intercambiadores del tipo sodio/calcio (Fig. 8). Nuestra secuencia de interés (EHI_001770) se incluyó dentro del segundo grupo y presentó una mayor homología con el intercambiador sodio/calcio de *Arabidopsis thaliana* (Fig. 8), sugiriendo que está proteína corresponde a un intercambiador de sodio/calcio de *E. histolytica* (EhNCX).

8.3 Análisis estructural de la secuencia codificante para el posible intercambiador sodio/calcio (NCX) de *E. histolytica*

Una vez obtenida la posible secuencia de un intercambiador sodio/calcio en *E. histolytica*, se analizó la presencia de dominios estructurales en esta proteína mediante el programa Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (http://smart.emblheidelberg.de/smart/set_mode.cgi). Este análisis mostró que la proteína de interés tiene una arquitectura muy similar a los intercambiadores de sodio/calcio de *Arabidopsis thaliana* (NP_197288.1) y *Oryctolagus cuniculus* (XP_002719826.1) (Fig. 9). Así, la secuencia amibiana presentó los dominios descritos como necesarios para el intercambio de sodio/calcio y 13 posibles regiones transmembranales. La presencia de esos dominios transmembranales coincide con lo descrito para este tipo de proteínas, que pueden tener de 9 a 13 de estas regiones, dependiendo del organismo (Dipolo & Beauge, 2006). Además, la proteína amibiana, al igual que el intercambiador de *O. cuniculus*, presenta un probable péptido señal (Fig. 9). Estos resultados apoyan la hipótesis de que esta proteína corresponde a un intercambiador de sodio/calcio, por lo que a partir de este momento se nombrará como *EhCNX*.

Además, se realizó un alineamiento múltiple donde se comparó la secuencia de aminoácidos de *EhCNX* con los intercambiadores de *Arabidopsis thaliana* (NP_197288.1) y *Oryctolagus cuniculus* (XP_002719826.1) (Fig. 10). En este análisis se encontró un buen alineamiento entre las tres proteínas de las regiones que son necesarias para el intercambio de los iones sodio-calcio (Fig. 10, en amarillo).

8.4 Expresión del gen *Ehcnx* mediante RT-PCR

Para conocer si el gen *Ehcnx* se expresa en los trofozoítos en las condiciones normales de cultivo se realizaron ensayos de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen, lo que generaría un producto esperado de 1542 pb (Fig. 11A). En los

experimentos de RT-PCR se observó un amplificado del tamaño esperado para el gen completo (Fig. 11B). En los ensayos donde se omitió el cDNA molde o donde se puso como molde el RNA (sin la retrotranscripción) no se observó ningún amplificado (Fig. 11B), indicando que el producto de PCR era específico y que no se debía a la presencia de DNA contaminante.

Con el fin de corroborar que el amplificado de 1542 pb correspondía a la secuencia esperada, el producto de la RT-PCR se analizó mediante el corte con la enzima de restricción Dra I. De acuerdo a la secuencia reportada (EHI_001770), el gen *Ehcnx* presenta tres sitios de corte para la enzima Dra I en los nucleótidos 746, 968 y 1527 (Fig. 11A). Así, el corte del gen *Ehcnx* con esta enzima nos daría como resultado un total de tres cortes a lo largo del amplificado, produciendo cuatro fragmentos de 746, 222, 559 y 15 pb (Fig. 11A). Después de la digestión del amplificado con la enzima Dra I, los productos generados se analizaron en geles de agarosa, en donde se pudo observar la presencia de los fragmentos de 746, 559 y 222 pb (Figura 11C). Estos resultados confirman que el fragmento amplificado corresponde a la secuencia del gen *Ehcnx* y que por lo tanto éste se expresa en los trofozoítos de *E. histolytica* en las condiciones basales de cultivo.

8.5 Expresión del gen *Ehcnx* bajo diferentes concentraciones de calcio

Una vez confirmada la expresión del posible intercambiador en condiciones basales, se analizó la variación en la expresión de este gen en condiciones de bajo y alto calcio (estas condiciones serán denotadas como ↓Ca y ↑Ca, respectivamente), debido a que se sabe que esta proteína en otros organismos funciona como intercambiador utilizando el gradiente electroquímico de los iones sustrato (Dipolo & Beauge, 2008). Para ambas condiciones se utilizó una solución que provoca despolarización en las membranas, que por lo tanto permitiría el paso de iones a través de la membrana. Sin embargo, para estar seguros de que se diera este flujo de

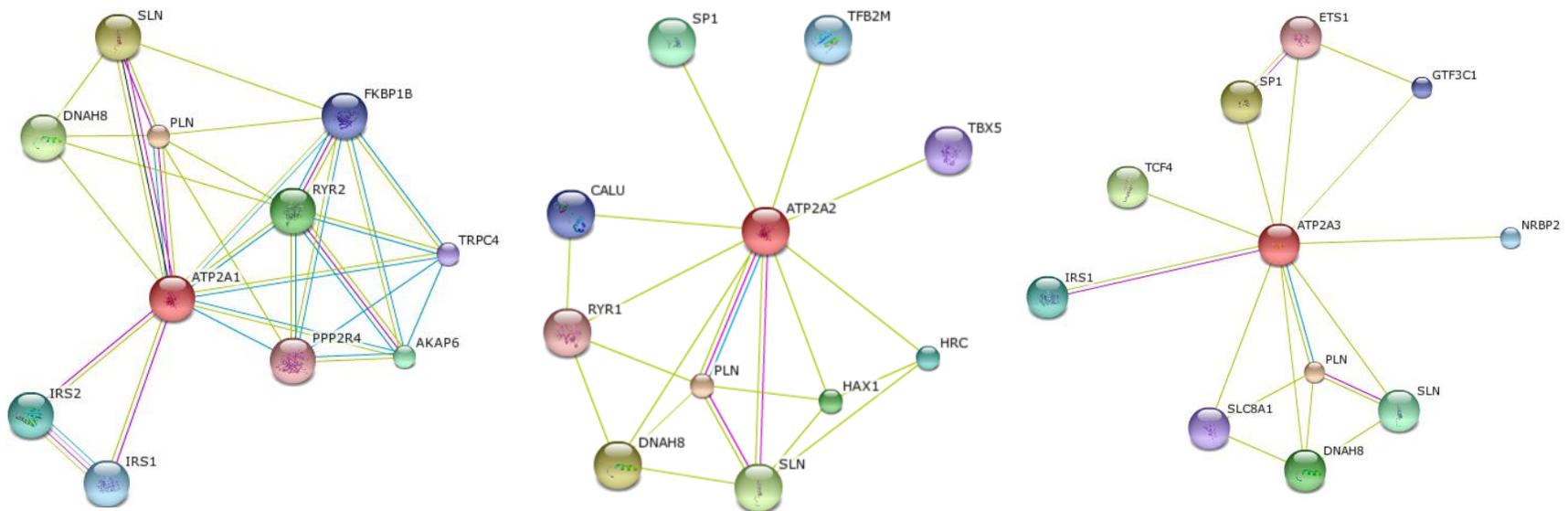


Figura 7. Interacciones proteicas de las diferentes proteínas SERCA de humano. A partir de los tres genes de la ATPasa- Ca^{2+} SERCA de *Homo sapiens* (ATP2A1, ATP2A2 y ATP2A3) se realizó un interactoma de interacciones conocidas y predichas con otras proteínas en la base de datos STRING 9.0.

Tabla 2. Posibles proteínas de *Entamoeba histolytica* con homología a aquéllas que interaccionan con SERCA en el humano

	Proteínas de humano (kDa)	Proteínas de <i>E. histolytica</i> (kDa)	% Id^a	% Sm^b	Valor e
DNAH8	dynein, axonemal, heavy chain 8 (514.6)	EHI_072050 (214.1)	20	46	3.7e-06
RYR2	ryanodine receptor 2 (564.5)	EHI_100480 (23.4)	34	50	0.00011
RYR1	ryanodine receptor 1 (565.1)	EHI_100480 (23.4)	30	46	3.5e-05
TCF4	transcription factor 4 (80)	EHI_197440 (58.7)	24	39	0.0013
AKAP6	A kinase (PRKA) anchor protein 6 (256.7)	EHI_169670 98.7	19	43	6.3e-05
SP1	Sp1 transcription factor (80.6)	EHI_004820 20.5	37	53	3.6e-14
IRS1	insulin receptor substrate 1 (131.5)	EHI_138540 53	32	58	0.11
HRC	histidine rich calcium binding protein (86.2)	EHI_111990 131.2	39	58	0.00076
TRPC4	transient receptor potential cation channel (182.1)	EHI_174160 38.3	22	53	0.038
TFB2M	transcription factor B2 (80)	EHI_013870 33.6	31	47	0.027
SLC8A1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger) (70-120)	EHI_001770 57	24	42	1.3e-07
PPP2R4	protein phosphatase 2A activator, regulatory subunit 4 (31.8)	EHI_098850 38.1	40	61	7.6e-63

^a Porcentaje de identidad

^b Porcentaje de similitud

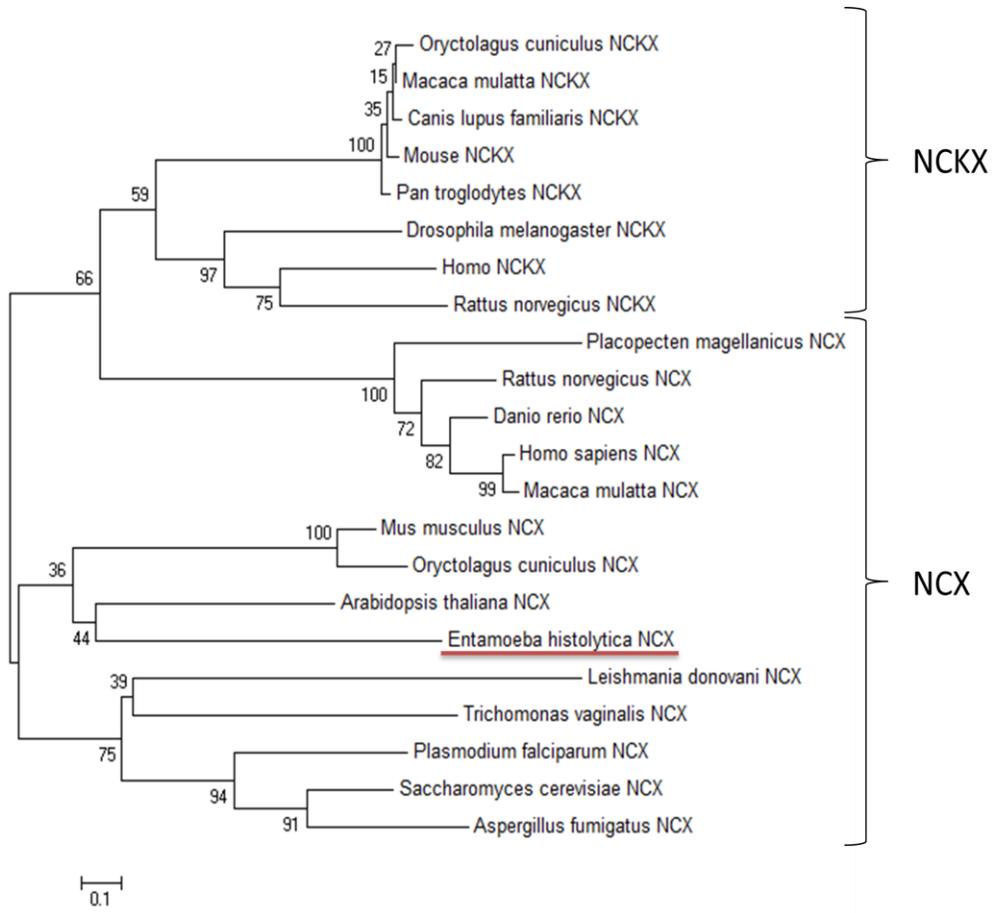


Figura 8. Análisis filogenético del posible intercambiador sodio-calcio de *E. histolytica*. La secuencia del posible intercambiador sodio-calcio de *E. histolytica* se comparó con diferentes intercambiadores de otros organismos mediante el programa ClustalW y se realizó un análisis filogenético utilizando el método de parsimonia máxima (maximum parsimony) del programa MEGA4 (<http://www.megasoftware.net/>). Los valores numéricos en las ramificaciones son los valores de bootstrap en 1000 repeticiones. Las secuencias de otras especies que se utilizaron son: *A. thaliana* NCX NP_197288.1, *M. musculus* NXC AAK49407.1, *O. cuniculus* NCX XP_002719826.1, *H. sapiens* NCX NP_066920.1, *S. cerevisiae* NCX NP_010155.1, *L. donovani* XP_003859399.1, *H. sapiens* NCKX NP_004718.1, *M. mulatta* NCX AAD04173.1, *T. vaginalis* NCX XP_001306407.1, *D. rerio* NCX NP_001032179.1, *P. falciparum* NCX XP_966025.1, *A. fumigates* NCX XP_750174.2, *R. norvegicus* NCX NP_511174.1, *P. magellanicus* AAT71303.3, *R. norvegicus* NCKX NP_113931.1, *D. melanogaster* NCKX AAF07938.1, *O. cuniculus* NCKX XP_002710993.1, *Mouse* NCKX Q99PD7.3, *M. mulatta* NCKX, *R. norvegicus* NCKX NP_064475.1, *C. lupus* NCKX XP_849585.2, *P. troglodytes* NCKX XP_003953735.1, *T. vaginalis* NCKX XP_001306407.1.

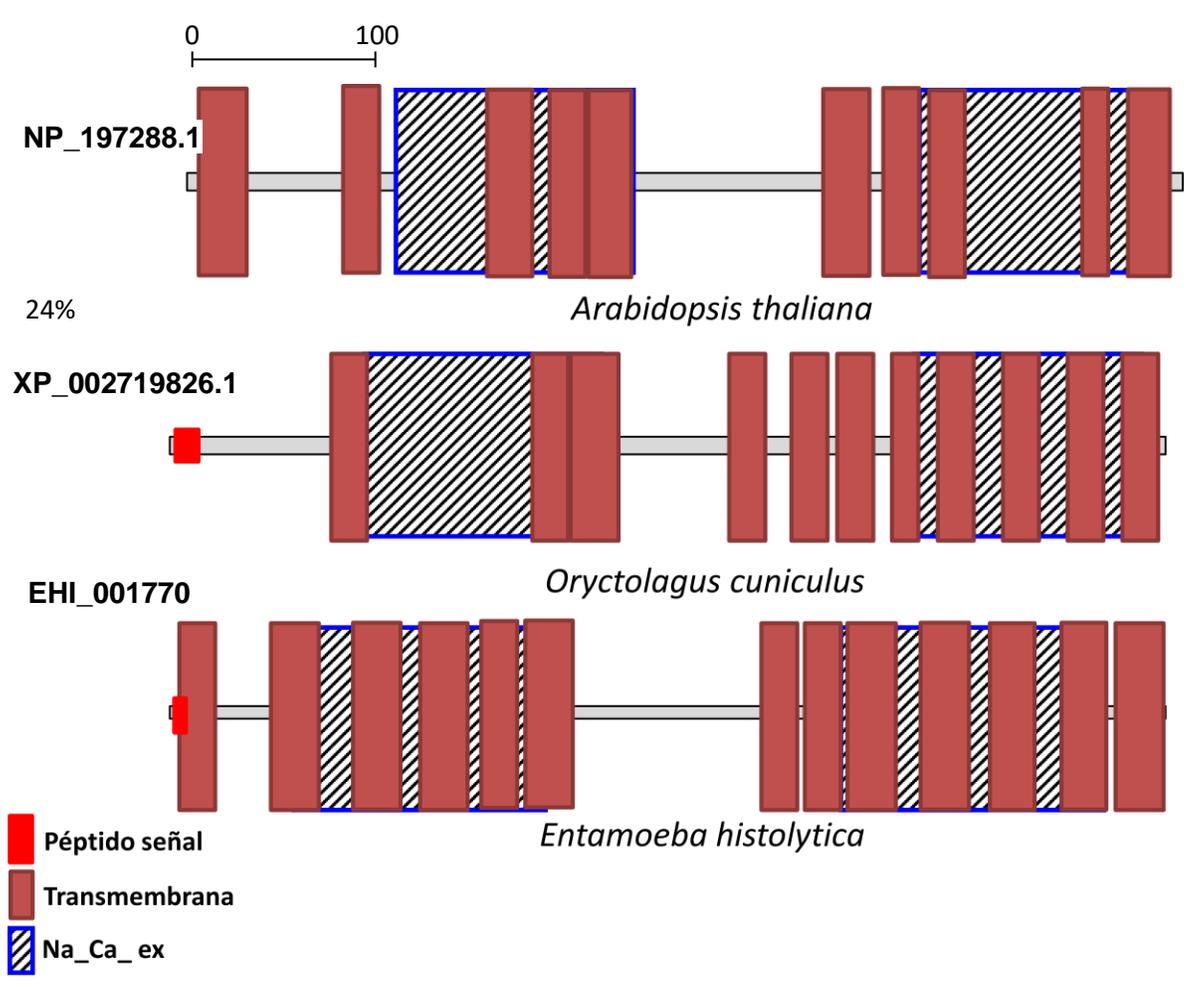


Figura 9. Comparación de la arquitectura del posible intercambiador sodio-calcio de *E. histolytica* con la de intercambiadores de otras especies. La identificación de los posibles dominios estructurales de la proteína amibiana de interés y de los intercambiadores de sodio/calcio de *Arabidopsis thaliana* y de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) se realizó utilizando la herramienta web SMART (http://smart.emblheidelberg.de/smart/set_mode.cgi). La escala superior indica residuos de aminoácidos. Los números a la izquierda corresponden a los números de acceso de las secuencias indicadas. Las barras verticales (vino) indican los dominios transmembranales, el cuadro (rojo) el péptido señal y los cuadros rayados representan los dominios encargados del intercambio de sodio-calcio.

Figura 10. Alineamiento múltiple comparando la secuencia aminoacídica EhNCX con los intercambiadores de otras especies. Se realizó *un* alineamiento múltiple de EhNCX con la secuencia aminoacídica de los intercambiadores de *A. thaliana* y *O. cuniculus* utilizando la herramienta web CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Las letras rojas representan el péptido señal, el subrayado indica las regiones transmembranales, el sombreado amarillo representa el dominio de intercambio sodio-calcio.

Figura 11. Expresión del gen *Ehncx* por RT-PCR. Para determinar si el gen *Ehncx* se expresa en los trofozoítos en condiciones basales de cultivo se diseñaron iniciadores correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen para su amplificación por RT-PCR. (A) Representación esquemática de la longitud de la secuencia EHI_001770 del genoma de *E. histolytica* mostrando la presencia de los sitios de corte para la enzima Dra I y la longitud de los fragmentos generados por esa enzima. (B) A partir del cDNA de los trofozoítos se realizaron ensayos de PCR y los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Carril 1, marcador Quick-load DNA ladders 1kb (250-10000bp); carril 2, PCR utilizando cDNA como molde; carril 3, PCR usando RNA como molde (sin retro-transcripción); carril 4, PCR en ausencia de molde. (C) Para confirmar la identidad del fragmento amplificado, éste se incubó con la enzima de restricción Dra I y los productos de digestión se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Carril 1, marcador Quick-load DNA ladders 1kb (250-10000bp); carril 2, digestión del fragmento amplificado con Dra I; carril 3, fragmento amplificado sin digerir.

iones, en este caso se utilizó el ionóforo A23187, el cual se sabe provoca poros en la membrana plasmática promoviendo así el flujo de iones. El ionóforo se utilizó tanto en bajo como alto calcio (condiciones que nombraremos como $\downarrow\text{Ca}^{2+}+\text{A}$ y $\uparrow\text{Ca}^{2+}+\text{A}$). En los ensayos de RT-PCR realizados a partir del RNA aislado de trofozoítos en condiciones de bajo y alto calcio se encontró una mayor expresión del gen *Ehncx* en comparación con la condición basal (Fig. 12). En estos ensayos, en la situación de bajo calcio en presencia del ionóforo se detectó un ligero aumento de la expresión del gen, aunque no fue estadísticamente significativo, mientras que para la condición de bajo calcio sin ionóforo se detectó una expresión diez veces mayor que en la condición basal (Fig. 12). Resultados opuestos se encontraron para las condiciones de alto calcio ($\uparrow\text{Ca}^{2+}+\text{A}$ y $\uparrow\text{Ca}^{2+}$), ya que en estas, la condición de alto calcio con ionóforo es la que muestra una mayor expresión del mensajero con aproximadamente ocho veces comparado con la condición basal, mientras que en ausencia del ionóforo se observó un aumento de tres veces (Fig. 12). Estos resultados indican que la expresión del gen *Ehncx* se ve influenciada por las concentraciones intra y extracelulares de calcio. Por otra parte, no se detectó variación aparente en la expresión del gen de actina bajo las diferentes condiciones (Fig. 12A), indicando que las diferencias en la cantidad del amplificado del gen *Ehncx* son efectivamente debidas al cambio en la concentración de calcio y no a la posible variación en la cantidad de molde.

Así mismo, se analizó la expresión de una posible PMCA (EHI_030830) bajo las mismas condiciones, esto debido a que como nos dice la literatura esta proteína tiene también la función de controlar los niveles intracelulares de calcio mediante la expulsión del exceso del ion hacia la parte extracelular. Interesantemente, los resultados mostraron un mismo patrón de expresión de *EhCNX* y de la PMCA (Fig. 13), es decir, se observó una mayor expresión de la PMCA en condiciones de bajo calcio sin ionóforo y en alto calcio con ionóforo (Fig. 13). Estos resultados sugieren que la transcripción de ambos genes es regulada por la concentración de calcio.

8.6 Análisis de las interacciones de *EhSERCA* bajo diferentes condiciones por inmunoprecipitación

Para obtener las interacciones proteicas que lleva a cabo *EhSERCA*, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación partiendo de extractos totales de trofozoítos obtenidos en condiciones basales, así como de trofozoítos tratados con alto calcio y trofozoítos tratados con un bloqueador específico de SERCA (la tapsigargina). Para estos ensayos se usó como control negativo el suero preinmune, donde al analizar por PAGE-SDS las proteínas precipitadas solo se observaron las cadenas pesadas y ligeras de la IgG (Fig. 14). En cambio, cuando se utilizaron los anticuerpos contra *EhSERCA* se observaron diferentes bandas proteicas (Fig. 14). Los inmunoprecipitados obtenidos bajo las diferentes condiciones se compararon, observándose diferencias significativas en cada condición. De manera más detallada, podemos observar que en el perfil proteico obtenido de la inmunoprecipitación en presencia de alto calcio, se ve más marcada una banda de un tamaño aproximado de 130 kDa en comparación con las otras condiciones (Fig. 14). En cambio donde se utilizó el bloqueador tapsigargina se ve una banda más marcada de un tamaño de aproximadamente 150 kDa, comparado con las otras dos condiciones (Fig. 14). En la condición basal se observó un perfil de proteínas tanto de alto como bajo peso molecular, comparado con las otras dos condiciones, donde no se observan bandas menores a 55 kDa (Fig. 14). En todas las condiciones se pueden observar las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas (Fig.14). Estos resultados sugieren que *EhSERCA* interacciona con diversas proteínas dependiendo de la concentración intracelular de calcio y que en las condiciones que provocan un desbalance en la concentración del ion (bajo calcio y presencia del bloqueador tapsigargina), *EhSERCA* interacciona con proteínas que pudieran ayudar a restablecer la concentración intracelular de calcio.

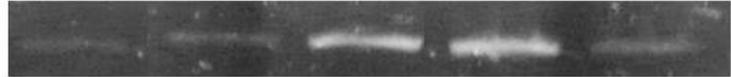
Con el fin de determinar la presencia de la proteína *EhSERCA* en los ensayos de inmunoprecipitación, se realizaron ensayos de Western blot

utilizando los anticuerpos anti-*EhSERCA*. En los extractos totales de los trofozoítos en condición basal, los anticuerpos solo detectaron una banda de aproximadamente 115 kDa (Fig. 14), el peso molecular reportado anteriormente para *EhSERCA* (Martínez-Higuera, 2013). Por otra parte, en las proteínas inmunoprecipitadas, estos ensayos revelaron la misma banda de aproximadamente 115 kDa y las cadenas pesadas y ligeras de las IgG. Resultados similares se obtuvieron en los ensayos realizados con alto calcio o en presencia de tapsigargina (datos no mostrados).

A

Alto calcio	-	-	-	+	+
Bajo calcio	-	+	+	-	-
A23187	-	+	-	+	-

Ehcnx



Actina



1 2 3 4 5

B

Expresión de *Ehcnx*

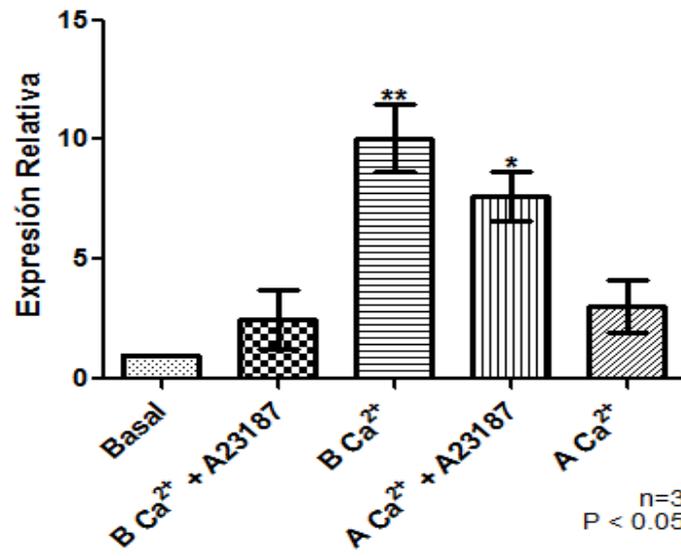


Figura 12. Expresión del gen *Ehncx* en bajo y alto calcio. Para determinar si el gen *Ehncx* se expresa en diferentes condiciones de calcio se realizaron ensayos de RT-PCR en diferentes concentraciones del ion. (A) El RNA total se extrajo de los trofozoítos de *E. histolytica* tratados en condiciones basales o en condiciones de alto o bajo calcio en ausencia o en presencia del ionóforo A23187. Posteriormente, se realizaron ensayos de RT-PCR y los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Como control interno se utilizó la amplificación por RT-PCR del gen de actina en cada condición. (B) Expresión relativa del gen *Ehncx* en las diferentes condiciones. Las bandas de amplificación se analizaron por densitometría, el amplificado del gen *Ehncx* se normalizó con respecto al del gen de actina y el dato obtenido en la condición basal se tomó arbitrariamente como unidad de expresión relativa.

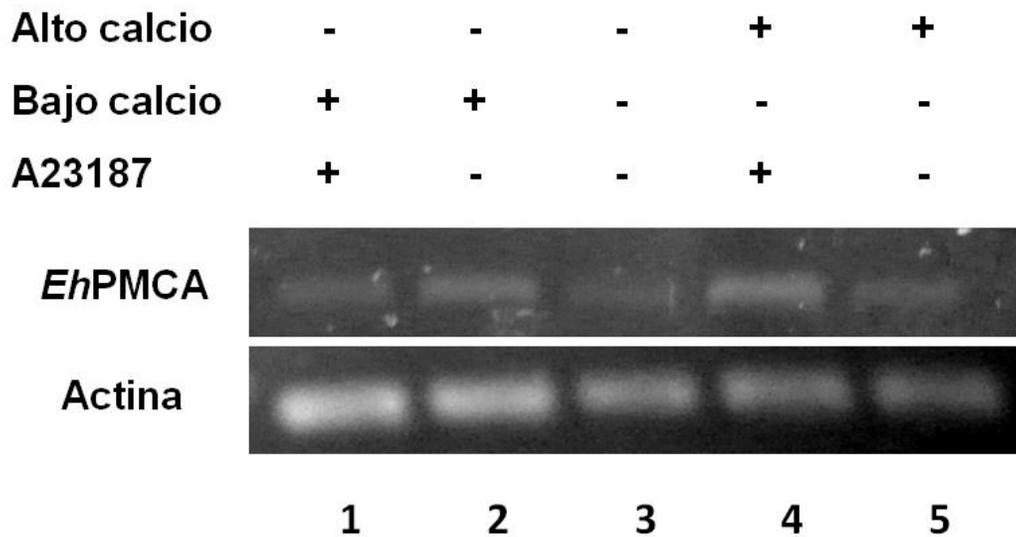


Figura 13. Expresión del gen EHI_30830 (PMCA) en bajo y alto calcio. Para determinar si el gen EHI_030830 (correspondiente a una putativa PMCA) se expresa en diferentes condiciones de calcio se realizaron ensayos de RT-PCR en diferentes concentraciones del ion. (A) El RNA total se extrajo de los trofozoítos de *E. histolytica* tratados en condiciones basales o en condiciones de alto o bajo calcio en ausencia o en presencia del ionóforo A23187. Posteriormente, se realizaron ensayos de RT-PCR y los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Como control interno se utilizó la amplificación por RT-PCR del gen de actina en cada condición.

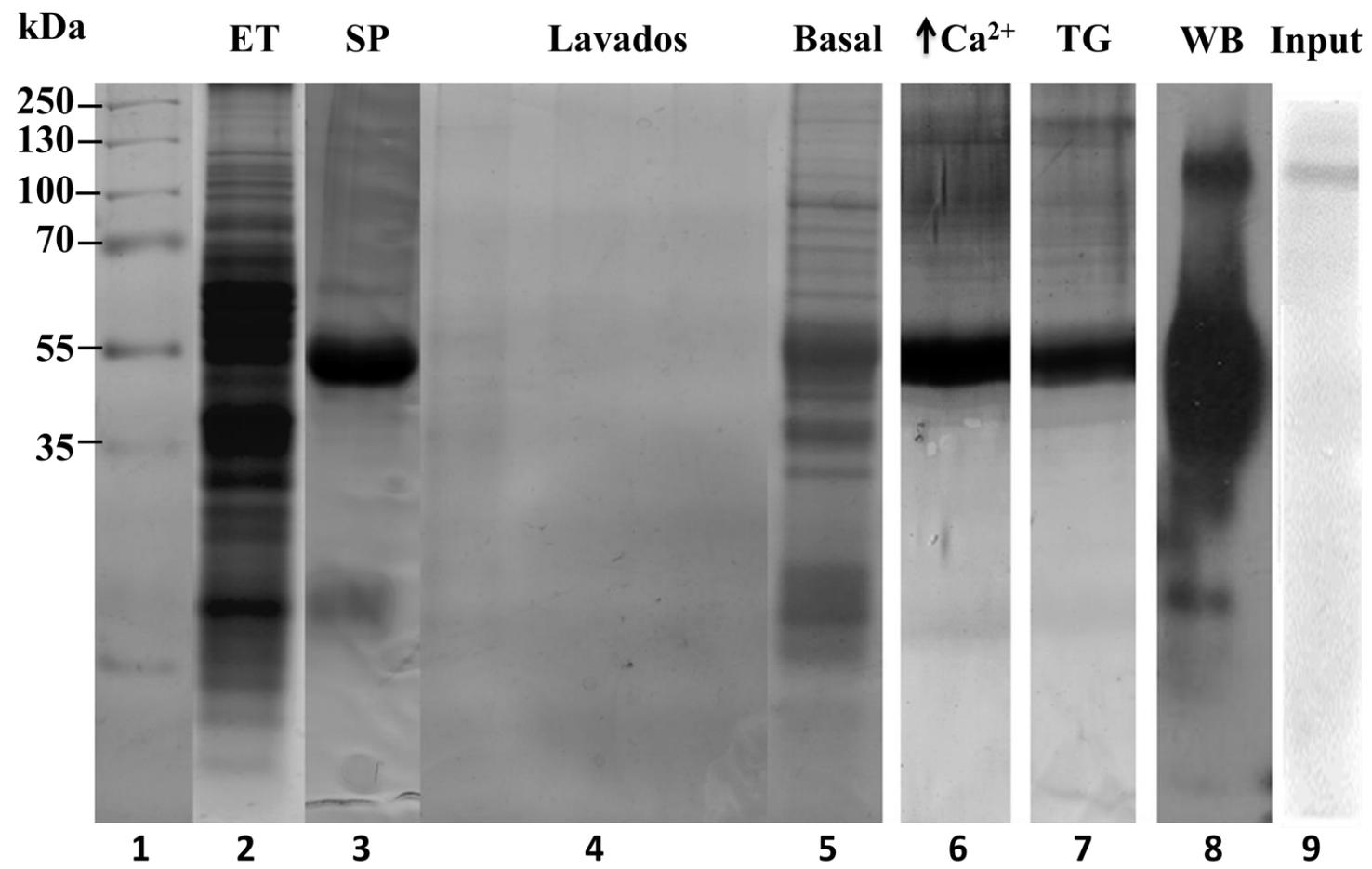


Figura 14. Interacciones proteína-proteína de EhSERCA. Los extractos proteicos de trofozoítos de *E. histolytica* tratados en condiciones basales, en alto calcio o en presencia del bloqueador de SERCA (tapsigargina) se inmunoprecipitaron utilizando un anticuerpo anti-EhSERCA y la proteína G acoplada a perlas de sefarosa. Posteriormente, las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS teñidos con azul de Coomassie (carriles 1-7) y por ensayos de Western blot usando el anticuerpo anti-EhSERCA (carriles 7 y 8). Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica*; carril 3, inmunoprecipitado con suero preinmune (control negativo); carril 4, lavados de la inmunoprecipitación; carril 5, inmunoprecipitado con α -EhSERCA en estado basal; carril 6, inmunoprecipitado de α -EhSERCA de trofozoítos tratados con alto calcio; carril 7 inmunoprecipitado con α -EhSERCA de trofozoítos tratados con tapsigargina; carril 8, Western blot del inmuprecipitado con α -EhSERCA en condiciones basales; carril 9, Western blot de proteínas totales de *E. histolytica*.

9 DISCUSIÓN

La amibiasis ocasionada por el protozooario *E. histolytica* es una enfermedad parasitaria del tracto gastrointestinal que presenta una distribución mundial (Ali *et al.*, 2008). En México es considerada un problema de salud pública (SUIVE/DGE/Secretaria de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2011). Este parásito es capaz de invadir y destruir no solo el intestino grueso, sino también otros órganos, principalmente el hígado (Ali *et al.*, 2008). Este daño es ocasionado por tres principales mecanismos: adhesión, citólisis y fagocitosis (Christy & Petri, 2011), los cuales están regulados por factores de virulencia de la amiba como amebaporos (Leippe, 1997), la lectina Gal/GalNac (Petri *et al.*, 1987), cisteína proteasas (García-Rivera *et al.*, 1999; Ocadiz *et al.*, 2005), así como GTPasas que modulan el tráfico intracelular como las Rab (McGugan & Temesvari, 2003; Rodríguez *et al.*, 2000; Saito-Nakano *et al.*, 2001; Temesvari *et al.*, 1999; Welter *et al.*, 2002), entre otras moléculas. El flujo del ion calcio también tiene un papel importante en el proceso patogénico de *E. histolytica*, ya que, aunque se conoce muy poco sobre la regulación de la concentración intracelular de este ion en la amiba, este ion es un segundo mensajero que ayuda a regular diversos mecanismo celulares. Se sabe que el flujo de calcio influye en su virulencia (Moreno & Docampo, 2003). Por ejemplo, se ha visto que el uso de bloqueadores de canales de calcio, como el verapamil y el bepedril inhibe la adhesión y la lisis celular por parte de la amiba (Ravdin *et al.*, 1982). El calcio regula la unión del factor de transcripción URE3-BP motivo URE3, ayudando a modular la expresión génica de la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNac (hgl5) (Gilchrist *et al.*, 2003). Por otro lado, se sabe que el calcio induce en la amiba la exocitosis de vesículas ácidas, que contienen cisteína proteasas (Ravdin *et al.*, 1988).

En mamíferos se ha reportado la presencia de varias proteínas que regulan el flujo de calcio a través de su interacción con la ATPasa SERCA, como es el caso de la proteína de unión a calcio rica en histidina (HRC) que modula el secuestro de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico, mediante su

interacción con SERCA (Demetrios, 2005). También se conoce que Bcl-2 regula la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, ya que desestabiliza e inactiva a SERCA (Dremina, 2005). Por otra parte, se sabe que sarcolipina y fosfolamban al interactuar con SERCA afectan la actividad de la bomba, el balance de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular y la contractilidad miocárdica (Wuytack *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2012). Se ha reportado en ovocitos de *Xenopus* sp que la coexpresión de calnexina con SERCA2b resulta en la inhibición de oscilaciones de Ca^{2+} intracelular, generando una inhibición funcional de la bomba (Roderick *et al.*, 2000). Además, se ha reportado que STIM1 es requerido para el llenado de almacenes ácidos a través de su interacción con SERCA3 (López *et al.*, 2008). Con los datos anteriores podemos sugerir que las proteínas que interactúan con SERCA son también importantes en la homeostasis celular del calcio.

En nuestro grupo se ha identificado una posible ATPasa de calcio del tipo SERCA, la cual teóricamente se encarga de introducir calcio al retículo endoplásmico a través de la hidrólisis de una molécula de ATP (Martínez-Higuera *et al.*, 2013). Hasta el momento se desconocen las proteínas amibianas que podrían interactuar con *EhSERCA* y que a su vez pudieran estar participando en la regulación del flujo de calcio en *E. histolytica*. Por esa razón, en este trabajo realizamos la búsqueda de posibles proteínas que interactúan con *EhSERCA*. Sin embargo, no tuvimos éxito en identificar mediante análisis *in silico* proteínas amibianas similares a canales de calcio, STIM, Orai, receptores de rianodina o receptores de IP3, entre otros. Por esa razón, se hicieron ensayos *in silico* para identificar las proteínas que interactúan con las isoformas de SERCA de *Homo sapiens*. Mediante esta estrategia se encontraron 22 proteínas humanas que interactúan con las diferentes isoformas de SERCA. Estos candidatos se buscaron mediante BLAST en la base de datos del genoma de *E. histolytica*, considerando que algunos de ellos pudieran ser evolutivamente conservados y se encontraran secuencias similares. Mediante esta estrategia se encontraron 12 proteínas amibianas posiblemente ortólogas a las proteínas humanas. Sin embargo,

sólo dos de esas proteínas amibianas cumplieron con los criterios para ser elegidas como posibles ortólogas a sus contrapartes de humano. Estos resultados junto con la probable ausencia de secuencias similares a canales de calcio, receptores de rianodina, receptores de IP3, STIM, etc., sugieren que las proteínas encargadas de regular la concentración intracelular de calcio en *E. histolytica* son en su mayoría diferentes en secuencia a las que se encuentran en otros eucariontes, por lo que se requieren de otras estrategias experimentales para poder identificar esas proteínas.

De las proteínas encontradas en el análisis *in silico* nos interesamos por el estudio de una de ellas (la secuencia EHI_001770), ya que se trata de un posible intercambiador de cationes. En humano se sabe que existen cinco genes que codifican para este tipo de proteínas, de ellas tres son intercambiadores de sodio/calcio y dos son intercambiadores de sodio/calcio/potasio y se sabe que existe una proximidad del intercambiador sodio/calcio con SERCA, ayudando a regular los almacenes de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico (Kuszczyk, 2010; Fameli, 2007).

Para tratar de determinar el tipo de intercambiador encontrado (sodio/calcio o sodio/calcio/potasio) se realizó un análisis filogenético de la secuencia EHI_001770 con intercambiadores de diferentes organismos. En estos análisis se encontró que la proteína amibiana se agrupa dentro de los intercambiadores tipo sodio/calcio, teniendo una relación filogenética más cercana con los intercambiadores de *Arabidopsis thaliana*, *Oryctolagus cuniculus* y *Mus musculus*.

Además, el análisis estructural reveló que la secuencia de aminoácidos de EHI_001770 presenta los dominios donde se sabe que se realiza el intercambio de Na^+/Ca^{2+} (NCX) y que va de los aminoácidos 72 al 204 y de los aminoácidos 362 al 501. Comparando estos dominios con los presentes en las proteínas de otros organismos, la posición de éstos es muy similar y presenta una identidad de aproximadamente 24%. Adicionalmente, esta proteína amibiana presenta 13 regiones transmembranales, lo que coincide con lo reportado para este tipo de proteínas, que presentan de 9 a

13 segmentos transmembranales (Blaustein & Lederer, 1999; Dipolo & Beauge, 2008). Todos estos resultados sugieren fuertemente que la proteína amibiana que se identificó en el presente trabajo es un intercambiador de sodio/calcio (*EhCNX*) que participa en la homeostasis de calcio en *E. histolytica*.

Por otra parte, los ensayos de RT-PCR permitieron determinar que el gen *Ehncx* se expresa en los trofozoítos en cultivo. Además, con el fin de conocer si la proteína pudiera estar involucrada en la homeostasis intracelular de ion calcio, se analizó la expresión del gen *Ehncx* en trofozoítos tratados con diferentes concentraciones de calcio. En estos ensayos encontramos que la transcripción del gen varía dependiendo de la condición empleada, ya que se encontró una mayor expresión del gen en la condición de bajo calcio sin el ionóforo A23187, esto puede deberse a que como en la parte extracelular no existe calcio, se deben equilibrar las concentraciones intra y extracelulares del ion, forzando entonces la sobreexpresión de *EhCNX* para promover la salida de calcio hacia la parte extracelular. También encontramos una mayor expresión del gen en alto calcio en presencia del ionóforo A23187, esto pudiera deberse a que como el ionóforo está promoviendo la entrada masiva de calcio hacia el citoplasma, la proteína se sobreexpresa para promover la salida de calcio y así equilibrar la concentración del ion. En el análisis densitométrico se encontró solo valores significativos de la expresión relativa comparada con respecto a la basal al de bajo calcio sin ionóforo y alto calcio con ionóforo.

Interesantemente, esta expresión diferencial coincide con la de la PMCA putativa correspondiente a la secuencia EHI_030830. Este resultado concuerda con el hecho de que en algunas células la sobrecarga de calcio inducida por el ionóforo A23187 induce la sobre-expresión de las PMCA's para promover la salida de calcio, lo cual es crítico para la sobrevivencia de las células ante el aumento de calcio intracelular (García *et al.*, 2001). Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que la proteína identificada (*EhNCX*) participa en la homeostasis del calcio en amiba, ya que se sabe que tanto

PMCA's como intercambiadores sodio/calcio y sodio/calcio/potasio están encargados de la expulsión del calcio de la parte intracelular a la parte extracelular, modulando la concentración de calcio en la célula (Clapham, 2007; Díaz, 2003; On *et al.*, 2008; Strehler *et al.*, 2007). Por otra parte, se conoce que el flujo de calcio a través de estos tipos de intercambiadores es modulado también por la concentración de sodio (Dipolo & Beauge, 2008), por lo que es necesario realizar estudios posteriores para determinar la influencia de la concentración de sodio en la expresión el gen *Ehncx*.

Conociendo que SERCA puede interactuar con proteínas que pueden ayudarla en su función de regular la concentración de calcio en la célula y tratando de iniciar la identificación de esas proteínas en *E. histolytica*, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con α -*EhSERCA* sobre trofozoítos tratados en diferentes condiciones (basal, alto calcio y en presencia de un bloqueador específico de SERCA). En estos ensayos se encontró una asociación diferencial de *EhSERCA*, dependiendo de dichas condiciones, sugiriendo que de acuerdo a las necesidades de calcio de los trofozoítos, la regulación de la concentración intracelular del ion por *EhSERCA* depende de su interacción con diferentes proteínas. Dichas proteínas se identificarán posteriormente mediante su análisis por espectrometría de masas. Adicionalmente, con ayuda de anticuerpos específicos contra *EhNCX* se podría confirmar la interacción entre esta proteína con *EhSERCA* y establecer las condiciones en que se da esta interacción.

En resumen, en este trabajo identificamos un intercambiador de sodio/calcio de *E. histolytica* (*EhNCX*) cuyo mRNA se expresa diferencialmente dependiendo de la concentración de calcio, lo que sugiere que la proteína podría ayudar a la regulación de la concentración intracelular del ion en la amiba y que este intercambiador probablemente interacciona con *EhSERCA*. Además, por ensayos de inmunoprecipitación detectamos varias proteínas que interaccionan con *EhSERCA* y que también podrían estar involucradas en la homeostasis de este ion en el parásito.

10 CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que:

- *E. histolytica* tiene un gen que expresa un intercambiador putativo sodio/calcio (*EhNCX*).
- El gen *Ehncx* se transcribe en condiciones basales y su transcripción es regulada por las concentraciones intra y extracelulares de calcio.
- *EhSERCA* lleva a cabo diversas interacciones proteicas posiblemente encargadas de la homeostasis del ion calcio en *E. histolytica*.

11 PERSPECTIVAS

- Determinar la influencia de la concentración de sodio en la expresión del gen *Ehncx*.
- Confirmar la interacción entre *EhSERCA* y *EhNCX*.
- Realizar ensayos de RT-PCR en tiempo real.
- Identificar las proteínas que interactúan con *EhSERCA*.

12 BIBLIOGRAFÍA

Ali IK, Clark CG, Petri WA, Jr (2008) Molecular epidemiology of amebiasis. *Infection, Genetics and Evolution* **8**: 698-707.

Altimimi, H, Schnetkamp, P (2007) Na⁺/Ca²⁺-K exchangers (NCKX) functional properties and physiological roles. *Landes Bioscience* **1**: 62-69.

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

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

Arvanitis DA, Vafiadaki E, Fan GC, Mitton BA, Gregory KN, Del Monte F, Kontrogianni-Konstantopoulos A, Sanoudou D & Kranias EG (2007) Histidine-rich Ca-binding protein interacts with sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**: H1581–H1589.

Autry JM, Rubin JE, Pietrini SD, Winters DL, Robia SL, Thomas DD (2011) Oligomeric interactions of sarcolipin and the Ca-ATPase. *J Biol Chem* **286**: 31697-31706.

Baba-Aissa F, Raeymaekers L, Wuytack F, De Greef C, Missiaen L, Casteels R (1996) Distribution of the organellar Ca²⁺ transport ATPase SERCA2 isoforms in the cat brain. *Brain Res* **743**: 141-153.

Bailey GB (1992) Preliminary studies of chemotaxis by *Entamoeba*. *Arch Inv Med (Mex)* 13: 265-271.

Barrón M, Serrano G, Treviño L, Verduzco J, Morales M, Mata B (2008) Inhibición del crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* por acción de probióticos. *Ciencia UANL*. **11**: 285-290.

Benaim G (2004) La Ca²⁺-ATPasa de la membrana plasmática como enzima clave en la homeostasis intracelular del calcio. Estimulación por etanol y otros efectores. *Acta Científica Venezolana*. **55**: 304-314.

Blaustein M, Lederer J (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological Reviews* **79**: 763-854.

Blessmann J, Van Linh P, Nu PA, Thi HD, Muller-Myhsok B, Buss H, Tannich E (2002) Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* **66**: 578-583.

Boettner DR, Petri WA (2005) *Entamoeba histolytica* activates host cell caspases during contact-dependent cell killing. *Curr Top Microbiol Immunol* **289**: 175-184.

Botero D, Restrepo, M (1998) Parasitosis humanas. Segunda edición. Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas. Colombia. Pp 27-28, 40.

Braga LL, Ninomiya H, McCoy JJ, Eacker S, Wiedmer T, Pham C, Wood S, Sims PJ, Petri WA, Jr. (1992) Inhibition of the complement membrane attack

complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* **90**: 1131-1137.

Cao YQ (2006) Voltage-gated calcium channels and pain. *Pain* **126**: 5-9.

Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 521-555.

Chakrabarty P, Sethi D, Padhan N, Kaur K, Salunke D, Bhattacharya S, Bhattacharya, A (2004) Identification and characterization of EHCaBP2 a second member of the calcium-binding protein family of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 12898-12908.

Chan H, Babayan V, Blyumin E, Gandhi C, Hak K, Harake D, Kumar K, Lee P, Li TT, Liu HY, Lo TC, Meyer CJ, Stanford S, Zamora KS, Saier MH, Jr. (2010) The p-type ATPase superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* **19**: 5-104.

Choudhuri G, Rangan M (2012) Amebic infection in humans. *Indian J Gastroenterol* **31**:153–162.

Christy N, Petri Jr W (2011) Mechanisms of adherence, cytotoxicity and phagocytosis modulate the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiol* **6**: 1501–1519).

Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* **131**: 1047-1058.

Di Leva F, Domi T, Fedrizzi L, Lim D, Carafoli E (2008) The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation. *Arch Biochem Biophys* **476**: 65-74.

Diamond L, Harlow D, Cunnick C (1978) A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**: 431-432.

Díaz O (2003) El ion calcio: su regulacion y funcion en la célula β pancreática. *Revista Cubana de Endocrinologia* **14**: 270-281.

Dipolo and Beauge (2006) Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol Rev* **86**: 155–203.

Distelhorst CW, Bootman MD (2011) Bcl-2 interaction with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: role in Ca^{2+} signaling and disease. *Cell Calcium* **50**: 234-41.

Dremina ES, Sharov VS, Kumar K, Zaidi A, Michaelis EK, Schöneich C (2004) Anti-apoptotic protein Bcl-2 interacts with and destabilizes the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA). *Biochem J.* **383**: 361-370.

Dremina ES, Sharov VS, Schöneich C. (2006) Displacement of SERCA from SR lipid caveolae related domains by Bcl-2: a possible mechanism for SERCA inactivation. *Biochemistry* **10**: 175-84.

Espinosa-Cantellano M, Martinez-Palomo A (2000) Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* **13**: 318-331.

Fahrner M, Muik M, Derler I, Schindl R, Fritsch R, Frischauf I, Romanin C (2009) Mechanistic view on domains mediating STIM1-Orai coupling. *Immunol Rev* **231**: 99-112.

Fameli N, Breemen C, Kuo KH (2007) A quantitative model for linking $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger to SERCA during refilling of the sarcoplasmic reticulum to sustain $[\text{Ca}^{2+}]$ oscillations in vascular smooth muscle. *Cell Calcium* **42**: 565-575.

Fill M, Copello JA (2002) Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* **82**: 893-922.

Feranchak AP (2003) Ion channels in digestive health and disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **37**: 230-241.

Frischauf I, Schindl R, Derler I, Bergsman J, Fahrner M, Romanin C (2008) The STIM/Orai coupling machinery. *Channels* **2**: 1-8.

García ML, Usachev YM, Thayer SA, Strehler EE, Windebank AJ (2001) Plasma membrane calcium ATPase plays a role in reducing Ca^{2+} -mediated cytotoxicity in PC12 cells. *Journal of Neuroscience Research* **64**:661–669.

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

Ghosh S, Field J, Frisardi M, Rosenthal B, Mai Z, Rogers R, Samuelson J (1999) *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and golgi apparatus. *Infection and Immunity* **67**: 3073-3081.

Ghosh S, Rosenthal B, Rogers R, Samuelson J (2000) Vacuolar localization of an *Entamoeba histolytica* homologue of the plasma membrane ATPase (PMCA). *Molecular and Biochemical Parasitology* **108**: 125-130.

Gilchrist C, Baba D, Zhang Y, Crasta O, Evans C, Caler E, Sobral B, Bousquet C, Leo M, Hochreiter A, Connell S, Mann B, Petri W (2008) Targets of the *Entamoeba histolytica* transcription factor URE3-BP. *Neglected Tropical Diseases* **2**: 1-12.

Gillespie S, Pearson R (2001) Principles and practice of clinical parasitology. Second edition *Wiley* England 197-199.

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

Gómez J, Cortés J, Cuervo S, López M (2007) Amibiasis intestinal. *Asociación Colombiana de Infectología* **11**:36-45.

Gregory KN, Ginsburg KS, Bodi I, Hahn H, Marreez YM, Song Q, Padmanabhan PA, Mitton BA, Waggoner JR, Del Monte F, Park WJ, Dorn GW 2nd, Bers DM, Kranias EG (2006) Histidine-rich Ca binding protein: a

regulator of sarcoplasmic reticulum calcium sequestration and cardiac function. *J Mol Cell Cardiol* **40**: 653-65.

Guillen N, Boquet P, Sansonetti P (1998) The small GTP-binding protein RacG regulates uroid formation in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Cell Sci* **111**: 1729-1739.

Hofmann SL, Goldstein JL, Orth K, Moomaw CR, Slaughter CA & Brown MS (1989) Molecular cloning of a histidine-rich Ca²⁺-binding protein of sarcoplasmic reticulum that contains highly conserved repeated elements. *J Biol Chem* **264**: 18083–18090.

Huang CL (2004) The transient receptor potential superfamily of ion channels *J Am Soc Nephrol* **15**: 1690-1699.

Huston C (2004) Parasite and host contribution to the pathogenesis of amebic colitis. *Trends in Parasitology* **20**: 23-26.

Huston CD, Houpt ER, Mann BJ, Hahn CS, Petri WA, Jr. (2000) Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* **2**: 617-625.

Jain R, Santi-Rocca J, Padhan N, Bhattacharya S, Guillen N, Bhattacharya A (2008) Calcium-binding protein 1 of *Entamoeba histolytica* transiently associates with phagocytic cups in a calcium-independent manner. *Cellular Microbiology* **10**: 1373-1389.

James ZM, McCaffrey JE, Torgersen KD, Karim CB, Thomas DD (2012) Protein-protein interactions in calcium transport regulation probed by saturation transfer electronparamagnetic resonance. *Biophys J* **103**: 1370-1378.

Jentsch TJ, Hubner CA, Fuhrmann JC (2004) Ion channels: function unravelled by dysfunction. *Nat Cell Biol* **6**: 1039-1047.

Kang KJ, Kinjo TG, Szerencsei RT, Schnetkamp PP (2005) Residues contributing to the Ca²⁺ and K⁺ binding pocket of the NCKX2 Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchanger. *J Biol Chem* **280**: 6823-6833.

Kretschmer, R (1994) Amibiasis infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Primera edición. *Editorial Trillas México* **48**: 66-74.

Kuhlbrandt W (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 282-295.

Kuhlbrandt W, Auer M, Scarborough GA (1998) Structure of the P-type ATPases. *Curr Opin Struct Biol* **8**: 510-516.

Kuszczyk I, Kuner Rajneet, Samson SE, Grover AK (2010) Proximity of Na⁺ - Ca²⁺ -exchanger and sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in pig coronary artery smooth muscle: fluorescence microscopy. *Mol Cell Biochem* **339**: 293-300.

Labruyere E, Zimmer C, Galy V, Olivo-Marin JC, Guillen N (2003) EhPAK, a member of the p21-activated kinase family, is involved in the control of *Entamoeba histolytica* migration and phagocytosis. *J Cell Sci* **116**: 61-71.

Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL (2010) Ryanodine receptors: structure, expression, molecular detail, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a9003996.

Lee HG, Kang H, Kim DH & Park WJ (2001) Interaction of HRC (histidine-rich Ca²⁺ binding protein) and triadin in the lumen of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **276**: 39533–39538.

Leippe M (1997) Amoebapores. *Parasitol Today* **13**: 178-183.

Leippe M, Andra J, Nickel R, Tannich E, Muller-Eberhard HJ (1994) Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol Microbiol* **14**: 895-904.

Leippe M, Tannich E, Nickel R, van der Goot G, Pattus F, Horstmann RD, Muller-Eberhard HJ (1992) Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *EMBO J* **11**: 3501-3506.

Liu D, Liman E (2003) Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP2 regulate the taste transduction ion channels TRPM5. *PNAS* **100**: 15160-15165.

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, Guillen N, Gilchrist C, Stroup SE, Bhattacharya S, Lohia A, Foster PG, Sicheritz-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**: 865-868.

Londraville RL, Cramer TD, Franck JP, Tullis A, Block BA (2000) Cloning of a neonatal calcium atpase isoform (SERCA 1B) from extraocular muscle of adult blue marlin (*Makaira nigricans*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **127**: 223-233.

López JJ, Jardín I, Bobe R, Pariente JA, Enouf J, Salido GM, Rosado JA (2008) STIM1 regulates acidic Ca²⁺ store refilling by interaction with SERCA3 in human platelets. *Biochem Pharmacol* **75**: 2157-2164.

MacLennan DH, Kimura Y, Toyofuku T (1998) Sites of regulatory interaction between calcium ATPases and phospholamban. *Ann N Y Acad Sci* **853**: 31-42.

Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T (2001) Effect of calcium antagonists, calcium channel blockers and calmodulin inhibitors on the growth and encystation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Parasitol Res* **87**: 833-837.

Marion S, Guillen N (2006) Genomic and proteomic approaches highlight phagocytosis of living and apoptotic human cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* **36**: 131-139.

Martinez-Higuera A, Salas-Casas A, Calixto-Gálvez M, Chávez-Munguía B, Pérez-Ishiwara DG, Ximénez C, Rodríguez MA (2013) Identification of calcium-transporting ATPases of *Entamoeba histolytica* and cellular localization of the putative SERCA. *Exp Parasitol* **135**:79-86.

Martínez-López C, Orozco E, Sánchez T, García-Pérez RM, Hernández-Hernández F, Rodríguez MA (2004) The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cell Microbiol* **6**: 367-376.

Martinez-Palomo A (1987) Las amibas, enemigos invisibles. La ciencia desde México. Fondo de Cultura Económica.

Martinez-Palomo A (1986) Biology of *Entamoeba histolytica* *Amebiasis* 12-43.

McGugan GC, Jr., Temesvari LA (2003) Characterization of a Rab11-like GTPase, EhRab11, of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **129**: 137-146.

Meza I, Cazares F, Rosales-Encina JL, Talamas-Rohana P, Rojkind M (1987) Use of antibodies to characterize a 220-kilodalton surface protein from *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* **156**: 798-805.

Meza I, Talamas-Rohana P, Vargas MA (2006) The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: structure, function, and regulation by signaling pathways. *Arch Med Res* **37**: 234-243.

Meza I, Torres-Guerrero H, Meraz MA (1990) Molecular organization of *Entamoeba histolytica*. In Kretschmer R, Ed Amebiasis: Infection and Disease by *Entamoeba histolytica*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Mikoshiha K (2007) IP3 receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *Journal of NeuroChemistry* **102**: 1426-1446.

Mitchell K, Tsuboi T, Rutter G (2004) Role for plasma membrane-related Ca²⁺ - ATPases-1 (ATP2C1) in pancreatic β -cell Ca²⁺ homeostasis revealed by RNA silencing. *Diabetes* **53**: 393-400.

Moreno SN, Docampo R (2003) Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol* **6**: 359-364.

Ocádiz R, Orozco E, Carrillo E, Quintas LI, Ortega-López J, García-Pérez RM, Sánchez T, Castillo-Juarez BA, García-Rivera G, Rodríguez MA (2005) EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cell Microbiol* **7**: 221-232.

Olesen C, Picard M, Winther AM, Gyruup C, Morth JP, Oxvig C, Moller JV, Nissen P (2007) The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature* **450**: 1036-1042.

Olivos-García A, Tello E, Nequiz-Avendaño M, Gonzalez-Canto A, López-Vancell R, García de León MC, Montfort I, Pérez-Tamayo R (2004) Cysteine proteinase activity is required for survival of the parasite in experimental acute amoebic liver abscesses in hamsters. *Parasitology* **129**: 19-25.

On C, Marshall CR, Chen N, Moyes CD, Tibbits GF (2008) Gene structure evolution of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX) family. *BMC Evol Biol* **8**: 127.

Orozco E, Guarneros, Martínez-Palomo A, Sánchez T (1983) *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med* **158**: 1511-1521.

Ozawa T (2010) Modulation of ryanodine receptor Ca²⁺ channels. *Mol Med Rep.* **3**: 199-204.

Parekh AB, Putney JW, Jr. (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* **85**: 757-810.

Pathak RK, Anderson RG, Hofmann SL (1992) Histidine-rich calcium binding protein, a sarcoplasmic reticulum protein of striated muscle, is also abundant in arteriolar smooth muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil* **13**: 366–376.

Petri WA, Jr., Smith RD, Schlesinger PH, Murphy CF, Ravdin JI (1987) Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the *in vitro* adherence of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* **80**: 1238-1244.

Pritchard TJ, Kranias EG (2009) Junctin and the histidine-rich Ca²⁺ binding protein: potential roles in heart failure and arrhythmogenesis. *J Physiol* **13**: 3125–3133.

Que X, Brinen LS, Perkins P, Herdman S, Hirata K, Torian BE, Rubin H, McKerrow JH, Reed SL (2002) Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **119**: 23-32.

Rabinowitz S, Horstmann H, Gordon S, Griffiths G (1992) Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages. *J Cell Biol* **116**: 95-112.

Raha S, Dalal B, Biswas S, Biswas B (1994) Myo-inositol triphosphate-mediated calcium release from intestinal stores of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **65**: 63-71.

Raha S, Giri B, Bhattacharyya B, Biswas B (1995) Inositol (1,3,4,5) tetrakisphosphate plays an important role in calcium mobilization from *Entamoeba histolytica*. *Federation of European Biochemical Societies* **362**: 316-318.

Ramsey S, Delling M, Clapham E (2006) An introduction to TRP channels. *Annual Review of Physiology* **68**: 619-647.

Ravdin JI, Croft BY, Guerrant RL (1980) Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* **152**: 377-390.

Ravdin JI, Guerrant RL (1981) Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J Clin Invest* **68**: 1305-1313.

Ravdin JI, Murphy C, Schlesinger P (1988) The cellular regulation of vesicle exocytosis by *Entamoeba histolytica*. *Journal of Protozoology* **35**: 159-163.

Ravdin JI (1986) Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*. Studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. *Rev Infect Dis* **8**: 247-260.

Ravdin JI, Sperelakis N, Guerrant RL (1982) Effect of ion channel inhibitors on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* **146**: 335-340.

Roderick HL, Lechleiter JD, Camacho P (2000) Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca^{2+} oscillations via an interaction with SERCA2b. *J Cell Biol* **149**: 1235-48.

Rodríguez MA, García-Pérez RM, García-Rivera G, López-Reyes I, Mendoza L, Ortiz-Navarrete V, Orozco E (2000) An *Entamoeba histolytica* rab-like encoding gene and protein: function and cellular location. *Mol Biochem Parasitol* **108**: 199-206.

Rodríguez MA, Hernández F, Santos L, Valdez A, Orozco E (1989) *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Mol Biochem Parasitol* **37**: 87-99.

Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* **169**: 435–445.

Rudolph H, Antebi A, Finf G, Buckley C, Dorman T, LeVitre J, Davidow L, Mao J, Moir D (1989) The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca²⁺ ATPase family. *Cell* **58**: 133-145.

Saito-Nakano Y, Nakazawa M, Shigeta Y, Takeuchi T, Nozaki T (2001) Identification and characterization of genes encoding novel Rab proteins from *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **116**: 219-222.

Salas-Casas A, Ponce-Balderas A, García-Pérez R, Cortés-Reynosa P, Gamba G, Orozco E, Rodríguez M (2006) Identification and functional characterization of EhCLC-A, an *Entamoeba histolytica* CLC chloride channel located at plasma membrane. *Molecular Microbiology* **59**: 1249-1261.

Scarborough GA (2002) Molecular mechanism of the P-type ATPases. *J Bioenerg Biomembr* **34**: 235-250.

Seidler NW, Jona I, Vegh M, Martonosi A (1989) Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **264**: 17816-17823.

Seydel KB, Stanley SL, Jr. (1998) *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis. *Infect Immun* **66**: 2980-2983.

Shao N, Labruyère E, Bhattacharya S, Sen P, Guillén N, Bhattacharya A (2004) Calcium binding protein 1 of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* interacts with actin and is involved in cytoskeleton dynamics. *Journal of Cell Science* **117**: 3625-3634.

Stanley SL, Jr., Huizenga H, Li E (1992) Isolation and partial characterization of a surface glycoconjugate of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **50**: 127-138.

Stanley SL, Jr., Zhang T, Rubin D, Li E (1995) Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect Immun* **63**: 1587-1590.

Stanley S, Reed S (2001) Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. *American Journal of Physiology* **280**: 1049-1054.

Strange K, Yan X, Lorin-Nebel C, Xing J (2007) Physiological roles of STIM1 and Orai1 homologs and CRAC channels in the genetic model organism *Caenorhabditis elegans*. *Cell Calcium* **42**: 193-203.

Strehler EE, Filoteo AG, Penniston JT, Caride AJ (2007) Plasma-membrane Ca⁽²⁺⁾ pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochem Soc Trans* **35**: 919-922.

Suresh KJ, György H (2007) IP₃ receptors in cell survival and apoptosis: Ca²⁺ release and beyond. *Apoptosis* **12**: 951-968.

Sweadner KJ, Donnet C (2001) Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca⁽²⁺⁾-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J* **356**: 685-704.

Szlufcik K, Missiaen L, Parys JB, Callewaert G, Smedt HD (2006) Uncoupled IP₃ receptor can function as a Ca²⁺-leak channel: cell biological and pathological consequences. *Biol. Cell* **98**: 1-14.

Temesvari LA, Harris EN, Stanley SL, Jr., Cardelli JA (1999) Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab GTPases. *Mol Biochem Parasitol* **103**: 225-241.

Teixeira J, Huston C (2008) Evidence of a continuous endoplasmic reticulum in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic Cell* **7**: 1222-1226.

Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 2466-2470.

Traaseth NJ, Ha KN, Verardi R, Shi L, Buffy JJ, Masterson LR, Veglia G (2008) Structural and dynamic basis of phospholamban and sarcolipin inhibition of Ca⁽²⁺⁾-ATPase. *Biochemistry* **47**: 3-13.

Trejos-Suárez J, Castaño-Osorio J (2009) Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. *Revista Infectio* **13**:100-110.

Toyoshima C, Asahi M, Sugita Y, Khanna R, Tsuda T, MacLennan DH (2003) Modeling of the inhibitory interaction of phospholamban with the Ca²⁺ ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 467-472.

Vanoevelen J, Dode L, Van Baelen K, Fairclough R, Missiaen L, Raeymaekers L, Wuytack F (2005) The secretory pathway Ca²⁺/Mn²⁺ -ATPase 2 is a Golgi-localized pump with high affinity for Ca²⁺ ions. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 22800-22808.

Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B (2011) STIM and Orai in platelet function. *Cell Calcium* **50**: 270-278.

Voigt H, Olivo JC, Sansonetti P, Guillen N (1999) Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. *J Cell Sci* **112**: 1191-1201.

Welter BH, Laughlin RC, Temesvari LA (2002) Characterization of a Rab7-like GTPase, EhRab7: a marker for the early stages of endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **121**: 254-264.

Wong HN, Ward MA, Bell AW, Chevet E, Bains S, Blackstock WP, Solari R, Thomas DY, and Bergeron JJ (1998) Conserved in vivo phosphorylation of calnexin at casein kinase II sites as well as a protein kinase C/proline-directed kinase site. *J. Biol. Chem* **273**: 17227–17235.

Wuytack F, Dode L, Baba-Aissa F, Raeymaekers L (1995) The SERCA3-type of organellar Ca²⁺ pumps. *Biosci Rep* **15**: 299-306.

Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L (2002) Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* **32**: 279-305.

Ximénez C, Morán P, Ramos F, Ramiro M (2007) Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Medicina Interna de México* **23**: 398-407.

Yan L, Stanley SL, Jr. (2001) Blockade of caspases inhibits amebic liver abscess formation in a mouse model of disease. *Infect Immun* **69**: 7911-7914.

Zalk R, Lehnart SE, Marks AR (2007) Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annu. Rev. Biochem* **76**: 367-387.

Zlobl TL (2001) Amebiasis. *Prim Care Update Ob Gyns* **8**: 65-68.

Zhou YP, Teng D, Dralyuk F, Ostrega D, Roe MW, Philipson L, Polonsky KS. (1998) Apoptosis in insulin-secreting cells. Evidence for the role of intracellular Ca²⁺ stores and arachidonic acid metabolism. *J Clin Invest* **101**: 1623-32.

El Jurado designado por el departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular de Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, aprobó esta tesis el día 19 de agosto del 2013.

TUTOR

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez
Investigador Titular del Departamento de
Infectómica y Patogénesis Molecular
CINVESTAV-IPN

SINODALES

Dra. Patricia Talamás Rohana
Investigadora Titular del Departamento de
Infectómica y Patogénesis Molecular
CINVESTAV-IPN

Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández
Investigador Titular del Departamento de
Infectómica y Patogénesis Molecular
CINVESTAV-IPN