





CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Identificación, localización celular y caracterización funcional de la  
proteína *EhSERCA* en la virulencia *in vitro* de *Entamoeba histolytica* y  
de *EiSERCA* en el enquistamiento de *Entamoeba invadens*”**

T E S I S

Que presenta

M. EN C. AARÓN ALBERTO MARTÍNEZ HIGUERA

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Director de Tesis: Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio 2 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de 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 225225.

## **DEDICATORIAS**

### **A MI FAMILIA**

Mis papas Herlinda y Jesús y a mi hermano Jesús, por siempre creer en mí y motivarme a seguir, además de darme ese cariño incondicional y estar siempre ahí. A ustedes gracias, por ustedes hoy me encuentro aquí y soy lo que de ustedes aprendí.

### **A MI OTRA FAMILIA**

Mis hermanos Francisco Robles, Omar Almaráz y Rubén Badilla, quienes siempre me apoyaron desde el otro lado del país de manera incondicional.

### **A MI NOVIA**

Ana Patricia Martínez Camacho, después de 6 años de estar juntos aun eres capaz de tolerarme y enseñarme, además de guiarme. Te doy las gracias por todo lo que juntos hemos construido.

Yo la quiero hasta el fondo de todos los abismos,  
Hasta el último vuelo de la última ala,  
Cuando la carne toda no sea carne,  
Ni el alma sea alma (Jaime Sabines).

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A MI TUTOR, Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez**

Son casi 7 años en su laboratorio, es mucho lo que he aprendido y mucho lo que tengo que agradecerle. Doc, usted me ayudo mucho en mi formación, ya fuese aportando ideas o animándome cuando las cosas no salían. Un tutor no solo ofrece un espacio para trabajar sino también confianza y paciencia y eso es lo que me tiene aquí hoy.

Gracias por recibirme en su laboratorio Dr. Mario, fueron unos excelentes años en todos los sentidos

GRACIAS

### **A MIS ASESORES**

**Dra. Bibiana Chávez Munguia**

**Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández**

**Dr. Ricardo Félix Grijalva**

**Dr. Andrés Salas Casas**

Quienes aportaron ideas importantes para la realización de este trabajo.

### **APOYO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO**

Dra. Guillermina García Rivera

M. en C. Tomas Sánchez Maldonado

### **APOYO TÉCNICO**

Q.B.P. Carlos Vázquez Calzada

Mario Rodríguez Nieves

### **A MIS NUEVAS AMISTADES**

Javier Cazares, Martha Valle, Tania Domínguez, Marcos Muñiz, Abel Trujillo, Eduardo Mora, Cinthia Dionicio, Salome Cabrera, Mariana Rodríguez y todos los demás que me brindaron su amistad. Gracias por los buenos momentos y los recuerdos que juntos hemos construido.

	<b>PÀGINA</b>
<b>I. LISTA DE TABLAS</b>	I
<b>II. LISTA DE FIGURAS</b>	II
<b>III. RESUMEN</b>	III
<b>IV. SUMMARY</b>	IV
<b>1. ANTECEDENTES GENERALES</b>	1
<b>1.1 AMIBIASIS</b>	1
<b>1.2 HISTORIA</b>	1
<b>1.3 BIOLOGÍA DE <i>E. histolytica</i></b>	4
<b>1.3.1 MORFOLOGÍA</b>	4
<b>1.3.2 CICLO DE VIDA</b>	6
<b>1.4 FACTORES DE VIRULENCIA</b>	6
<b>1.4.1 LECTINA INHIBIBLE POR RESIDUOS DE GALACTOSA/N-ACETIL D-GALACTOSAMINA (GAL/GAL NAC)</b>	7
<b>1.4.2 COMPLEJO <i>EHCPADH112</i></b>	8
<b>1.4.3 LECTINA DE 220 KDA (L220)</b>	10
<b>1.4.4 PROTEÍNA RICA EN SERINAS (SREHP)</b>	10
<b>1.4.5 AMEBAPORO</b>	11
<b>1.4.6 CISTEÍNA PROTEASAS</b>	12
<b>1.5 Entamoeba invadens COMO MODELO DE ENQUISTAMIENTO</b>	13
<b>1.6 HOMEOSTASIS DE IÓN CALCIO</b>	14
<b>1.6.1 CANALES IÓNICOS</b>	16
<b>1.6.2 CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE (VGCCS)</b>	17
<b>1.6.3 CANALES DE CALCIO REGULADOS POR DEPÓSITOS INTRACELULARES (SOCCS)</b>	18
<b>1.6.4 BOMBAS DE CALCIO</b>	20
<b>2 ANTECEDENTES DIRECTOS</b>	22
<b>2.1 IMPORTANCIA DEL CALCIO EN <i>Entamoeba</i></b>	22
<b>2.2 CANALES IONICOS EN <i>Entamoeba</i></b>	24
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	27
<b>4. HIPÓTESIS</b>	27
<b>5. OBJETIVOS</b>	27
<b>5.1 OBJETIVO GENERAL</b>	27

<b>5.2 OBJETIVOS PARTICULARES</b>	27
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	28
<b>6.1 CULTIVO CELULAR DE <i>E. histolytica</i> Y <i>E. invadens</i></b>	28
<b>6.2 ENQUISTAMIENTO DE <i>E. invadens</i></b>	28
<b>6.3 TINCION CON CALCOFLUOR</b>	28
<b>6.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE TROFOZOITOS</b>	29
<b>6.5 EXTRACCION DE PROTEINAS DE QUISTES</b>	29
<b>6.6 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)</b>	29
<b>6.7 WESTERN BLOT</b>	30
<b>6.8 INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL</b>	31
<b>6.9 MICROSCOPIA ELECTRONICA</b>	33
<b>6.10 TRATAMIENTO CON BLOQUEADORES ESPECIFICOS DE ATPasas DE CALCIO DEL TIPO DE SERCA</b>	34
<b>6.11 CULTIVO DE CÉLULAS MDCK</b>	35
<b>6.12 EFECTO CITOPÁTICO</b>	35
<b>6.13 ERITROFAGOCITOSIS</b>	36
<b>7. RESULTADOS</b>	37
<b>7.1 IDENTIFICACIÓN <i>IN SILICO</i> DE <i>Ei</i>SERCA</b>	40
<b>7.2 INMUNODETECCION DE <i>Ei</i>SERCA</b>	40
<b>7.3 LOCALIZACION SUBCELULAR DE <i>Eh</i>SERCA Y <i>Ei</i>SERCA</b>	40
<b>7.4 EFECTO DEL ÁCIDO CICLOPIAZONICO EN LA VIRULENCIA <i>IN VITR</i> DE <i>E. histolytica</i></b>	48
<b>7.5 LOCALIZACIÓN DE <i>Ei</i>SERCA DURANTE EL ENQUISTAMIENTO DE <i>invadens</i></b>	52
<b>7.6 EFECTO DE TG Y CPA EN EL PROCESO DE ENQUISTAMIENTO</b>	52
<b>8. DISCUSIÓN</b>	60
<b>9. CONCLUSIONES</b>	67
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	68
<b>11. REFERENCIAS</b>	69

## **I. LISTA DE TABLAS**

	<b>Pagina</b>
<b>Tabla 1.- Análisis de los aminoácidos del bolsillo de unión para CPA en EhSERCA.</b>	50
<b>Tabla 2.- Análisis de los aminoácidos del bolsillo de unión para TG y CPA en EiSERCA.</b>	56

## II. LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1.- Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .	9
Figura 2.- Caracterización <i>in silico</i> de EiSERCA.	39
Figura 3.- Inmunodetección de EiSERCA.	43
Figura 4.- Localización subcelular de EhSERCA mediante microscopia confocal.	44
Figura 5.- Localización de EhSERCA por inmunomicroscopía electrónica.	45
Figura 6.- Localización de EhSERCA con EhPMR1 por inmunomicroscopía electrónica.	46
Figura 7.- Localización subcelular de EiSERCA.	47
Figura 8.- Efecto de CPA en la viabilidad y virulencia <i>in vitro</i> en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .	51
Figura 9.- Localización subcelular de EiSERCA durante el enquistamiento.	55
Figura 10.- Efecto de Tapsigargina y ácido ciclopiazonico en la viabilidad de <i>E. invadens</i> .	57
Figura 11.- Efecto de Tapsigargina y ácido ciclopiazonico en el enquistamiento de <i>E. invadens</i> .	58
Figura 12.- Análisis estructural de los quistes formados en presencia de T o CPA.	59

### III. RESUMEN

La amibiasis es una enfermedad parasitaria infecciosa del tracto gastrointestinal causada por la contaminación con quistes del protozoo parasito *Entamoeba histolytica*. Esta parasitosis presenta una distribución mundial afectando principalmente a países donde las condiciones socioeconómicas e higiénicas son deficientes. El ion calcio es una molécula de señalización importante considerada como un segundo mensajero, este ión es utilizado por las células eucariotas y controla diversas funciones celulares entre las cuales se encuentran la contracción muscular, división celular, diferenciación, transcripción de genes, secreción de hormonas y permeabilidad a los iones sodio y potasio. Diversos trabajos muestran la importancia del calcio en *E. histolytica*. Donde se ha demostrado que el ion está involucrado en el crecimiento y la virulencia *in vitro* de *E. histolytica*. Además, el utilizar antagonistas del calcio e inhibidores de calmodulina, tiene como resultado una alteración del enquistamiento en *E. invadens*, lo cual nos indica que el ion no solo es importante en la virulencia amibiana, sino también en el ciclo de vida del parasito. Sin embargo, poco se sabe sobre las proteínas que están involucradas en la regulación del ion calcio en *E. histolytica*. En nuestro trabajo de maestría se encontraron ocho secuencias génicas que podrían codificar para ATPasas de calcio. Una de ellas (EHI\_027710) filogenéticamente se agrupó con ATPasas de calcio de retículo endoplásmico, presentó los dominios de ATPasa de calcio y una posible secuencia de retención para retículo endoplásmico HDDL, similar a la secuencia de retención reportada en *Saccharomyces cerevisiae* (HDEL). Al realizar ensayos de virulencia *in vitro* con Trofozoítos con Tapsigargina se observó un decremento del 39% en eficiencia de adhesión, un 58% en citopatogenicidad y un 45% en eritrofagocitosis. Para localizar subcelularmente a EhSERCA se hicieron anticuerpos específicos contra un péptido de la proteína. En Western blot se detectó una proteína de aproximadamente 115 kDa y en la inmunolocalización la proteína se encontró delimitando estructuras de tipo vacuolar.

En este trabajo logramos identificar la ATPasa de calcio del tipo de SERCA en *E. invadens* (EiSERCA). Esta bomba de calcio al igual que EhSERCA, contiene todos los dominios involucrados en el transporte de calcio, incluso en el extremo del carboxilo terminal cuenta con una posible secuencia de retención para retículo endoplásmico (HEDL). Para conocer la ubicación celular de esta proteína se utilizo el anticuerpo de conejo anti-EhSERCA y se encontró que esta bomba de calcio al igual que EhSERCA se localiza en un sistema vesicular que conforma el retículo endoplásmico en la amiba.

El calcio tiene un papel importante en la biología del parásito, por lo tanto resultaba interesante el estudiar la importancia de esta ATPasa de calcio en el enquistamiento de *E. invadens*. Se encontró que esta proteína se relocaliza a la membrana plasmática del parásito. Después, se utilizaron Tapsigargina y ácido ciclopiazónico, fármacos que inhiben SERCA de manera específica. Al analizar el efecto de los fármacos se demostró que ambos son capaces de inhibir el enquistamiento de manera significativa, además de que aquellos quistes que se forman muestran una formación anormal, lo que indica que SERCA es una molécula importante en la biología de la amiba, la cual se podría postular como una molécula blanco para el desarrollo de nuevos fármacos anti-amibianos.

#### IV. SUMMARY

Amoebiasis is an infectious parasitic disease of the gastrointestinal tract caused by contamination with parasite protozoan cysts *Entamoeba histolytica*. This parasitosis has a worldwide distribution mainly affecting countries where socioeconomic and hygienic conditions are poor. Calcium ion is an important signaling molecule regarded as a second messenger, this ion is used by eukaryotic cells and controls several cell functions among which are muscle contraction, cell division, differentiation, gene transcription, secretion of hormones and permeability to sodium and potassium ions. Several studies show the importance of calcium in *E. histolytica*, where it has been shown that the ion is involved in the *in vitro* growth and virulence of the parasite. Moreover, using calcium channel blockers and calmodulin inhibitors, results in an alteration of *E. invadens* encystment, which indicates that the ion is not only important in amebic virulence, but also in the life cycle of the parasite. However, little is known about proteins that are involved in calcium regulation in *E. histolytica*. In our MSc work, we found eight *E. histolytica* gene sequences that could encode for calcium ATPases. One of them (EHI\_027710) was phylogenetically grouped with sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPases (SERCA). This protein showed all the calcium ATPases domains with a HDDL sequence at the carboxyl terminus, which is similar to the endoplasmic reticulum retention sequence reported in *Saccharomyces cerevisiae* (HDEL). To determine the role of the possible EhSERCA in the amoeba virulence, trophozoites were treated with Thapsigargin a SERCA specific blocker and virulence *in vitro* assays were conducted, observing a decrease of 39% in the adhesion efficiency, 58% in cytopathogenicity, and 45% in erythrophagocytosis. Western blot assays with the specific antibodies against EhSERCA detected a 115 kDa protein and immunolocalization showed that the protein delimits vacuolar-like structures near to the cell nucleus.

In this work we identified a SERCA-type calcium ATPase in *E. invadens* (EiSERCA). This calcium pump contains all the domains involved in calcium transport, even it has a possible retention sequence for endoplasmic reticulum (HEDL). For the cellular location of this protein the anti-rabbit EhSERCA antibody was used and we found that this calcium pump like EhSERCA is located in a vesicular system comprising the endoplasmic reticulum in the amoeba. Calcium

plays an important role in the biology of the parasite, so it was interesting to study the importance of the calcium ATPase on *E. Invadens* encystment and we found that this protein is relocated to the plasma membrane of the parasite. Then Thapsigargin and cyclopiazonic acid, drugs that specifically inhibit SERCA were used. When we analyze the effect of the drugs, we demonstrated that both drugs are able to inhibit significantly the encystment, besides those formed cysts exhibit an abnormal formation, indicating that SERCA is an important molecule in the amoeba biology which could be postulated as a target molecule for the development of new anti-amebic drugs.

## **1. ANTECEDENTES GENERALES**

### **1.1. AMIBIASIS**

La amibiasis es una enfermedad parasitaria infecciosa del tracto gastrointestinal causada por protozoario parásito *Entamoeba histolytica* y es transmitida por la contaminación de alimentos con los quistes del parásito. 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 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). Las personas infectadas con *E. histolytica* pueden dividirse en dos grupos de acuerdo a las manifestaciones clínicas; asintomáticos y sintomáticos que representan un 90 y 10% de los casos. A nivel intestinal los individuos sintomáticos presentan un cuadro clínico de disentería amibiana, rectocolitis aguda o colitis no disentérica crónica; mientras que a nivel extraintestinal se presenta el absceso hepático amibiano, el absceso cerebral y enfermedad genitourinaria (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000). Se estima que al año se infectan a nivel mundial 500 millones de personas y mueren entre 40,000 y 110,000 por complicaciones; así, la amibiasis es considerada la tercera parasitosis causante de mortalidad mundial después de la malaria y la esquistosomiasis (Buss *et al.*, 2008; López *et al.*, 2008).

### **1.2 HISTORIA**

Desde hace mucho tiempo se describieron cuadros clínicos semejantes a los que se presentan en una amibiasis; como ejemplo se encuentra la descripción hecha por Celso e Hipócrates en el 300 AC, quienes observaron a un paciente que padecía

de fiebre y diarrea muco-sanguinolenta. Al observar el cuadro clínico de esta enfermedad, decidieron llamarle “flujo de vientre” (Pinilla *et al.*, 2008). En 1855, Lambal estudió el caso de un niño con disentería, al analizar la materia fecal del niño se percató de la presencia de un protozoo que emitía pseudópodos. Sin embargo, Lambal no logró observar más de dicho microorganismo. En 1873 Friedrich Löschen mejor conocido como Lösch, descubrió microorganismos móviles en las heces disentéricas de un campesino de 24 años. Estos microorganismos poseían ecto y endoplasma, además de glóbulos rojos en su interior. Lösch logró reproducir la enfermedad en perros, los cuales inoculaba con heces del campesino y de estos logró obtener amibas, además de observar ulceraciones en la mucosa intestinal; no obstante el hallazgo más importante en su trabajo fue obtener las amibas al realizar la autopsia al campesino, encontrando que estas causaban ulceraciones en la mucosa del colon (Pinilla *et al.*, 2008). En 1886, Koch estudió casos de disentería en los cuales encontró a la amiba en lesiones hepáticas, hallazgos que fueron confirmados ese mismo año por Esteban Kartulis, al demostrar la presencia de amibas en 150 autopsias de pacientes con disentería (Pinilla *et al.*, 2008). Kartulis es considerado el primero en afirmar que la amiba es el agente causal de la disentería y que el absceso hepático es secuela de la disentería (Botero y Restrepo, 1998; Pinilla *et al.*, 2008). En 1901, Councilman y Lafleur al estudiar 14 casos de disentería, lograron describir meticulosamente las lesiones intestinales provocadas por la amiba y pudieron discernir claramente una disentería amibiana de una bacteriana, además de acuñar el término de “disentería amibiana” y “absceso hepático” (Ravdin, 1988). En 1894, Quincke y Roos al experimentar con gatos encontraron que estos se pueden infectar con *E. histolytica* de forma oral o rectal, siempre y cuando sean infectados con quistes, es aquí por primera vez que se empieza a hablar del quiste como la forma infectiva (Cox, 2002). En 1903, Heuber hizo

la descripción de los quistes de la amiba y Schaudinn la del trofozoíto, además este último diferenció dos especies: *Endamoeba histolytica* o amiba patógena y *Endamoeba coli* o amiba no patógena. Schaudinn pretendió demostrar la diferencia en cuanto a la patogenicidad de estas amibas ingiriendo quistes, lo que desafortunadamente le causó dos crisis disintéricas, las cuales al parecer fueron la causa de su temprana muerte (Pinilla *et al.*, 2008). Diez años más tarde, Musgrave, Clegg, Walker y Sellards realizaron estudios de patogenicidad en individuos sanos que ingirieron quistes de *E. histolytica* y de *E. coli*. Solo aquellos que ingirieron quistes de *E. histolytica* presentaron disentería, demostrando así el importante papel de los quistes en la transmisión de la enfermedad (Pinilla *et al.*, 2008). En ese mismo año, Dobell describe el ciclo de vida de la amiba y en 1925 Brumpt, con base en la presencia de individuos sintomáticos y asintomáticos propuso la existencia de dos especies distintas de la amiba, una patógena y una no patógena, sin embargo, ambas eran morfológicamente iguales (Botero & Restrepo, 1998; Gillespie & Pearson, 2001). Los medios de cultivo desarrollados a lo largo de la historia han facilitado el estudio de la amibiasis, entre estos podemos encontrar el medio desarrollado por Boeck y Drbohlav, en el cual la amiba era cultivada en presencia de bacterias hasta que se logró hacer el primer cultivo monoxénico el cual fue realizado por Cleaveland y Sanders en 1930, pero no fue hasta 1961, que Diamond obtuvo el primer cultivo axénico de *E. histolytica* (Clark & Diamond, 2002). En 1978, Sargeant logró diferenciar la variante patogénica de *E. histolytica* de la no patogénica, mediante la aplicación de técnicas isoenzimáticas, y en 1993, es el mismo Diamond quien demostró que en realidad se trataba de dos especies diferentes correspondientes a *E. histolytica* para la amiba patogénica y *E. dispar* para no patogénica (Clark & Diamond, 2002). Como consecuencia de esto, la OMS en 1997, decide recomendar que se diferencien las dos especies para efectos de

diagnóstico y tratamiento, en caso de que el diagnóstico se llevase a cabo mediante microscopia óptica, este se reportaría como *E. histolytica/dispar* (Clark & Diamond, 2002; Gómez *et al.*, 2007).

### **1.3 BIOLOGIA DE *E. histolytica***

*E. histolytica* es un protozooario no flagelado que se encuentra en el phylum *Rhizopoda*, género *Entamoeba*. En esta última, además de *E. histolytica* también se encuentran otras especies que infectan al humano, como son: *E. dispar*, *E. gingivalis* y *E. moshkovskii*, sin embargo, podemos encontrar especies como *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. invadens* y *E. polecki*, las cuales no infectan al humano (Southwick, 2007; Ximénez *et al.*, 2007).

#### **1.3.1 MORFOLOGÍA**

La amiba *E. histolytica* se encuentra en la naturaleza principalmente en dos estadios: la forma móvil conocida como trofozoíto y la forma infectiva conocida como quiste. El trofozoito coloniza la mucosa intestinal del colon, donde se multiplica por fisión binaria (Ximénez *et al.*, 2007). Esta forma móvil mide de 20 a 40  $\mu\text{m}$  y emite un pseudópodo amplio (digitiforme), hialino y transparente, el cual se proyecta al exterior de la célula y presenta una apariencia granulosa (Ximénez *et al.*, 2007). La tracción que ejerce el pseudópodo sobre la célula es indispensable para el desplazamiento de la amiba. Una característica distintiva de este estadio es que en general se encuentra un solo núcleo, el cual cuenta con un solo cariosoma central compacto (Botero & Restrepo, 1998; Gómez *et al.*, 2007). El siguiente estadio es la fase infectiva no móvil conocida como quiste, el cual presenta una estructura redondeada de 10 a 15  $\mu\text{m}$  y en su interior alberga de 1 a 4 núcleos según la maduración. El quiste presenta una pared

gruesa compuesta de quitina de un grosor de 125 a 150 nm, cuya función es brindar resistencia cuando el parásito se encuentra fuera del conducto intestinal del huésped (Gillespie & Pearson, 2001; Southwick, 2007).

La membrana nuclear de *E. histolytica* consiste en una capa doble de 120 nm de grosor, con numerosos poros distribuidos de manera irregular. Estos poros tienen un diámetro de 50 a 65 nm (Kretschmer, 1994; Ravdin, 1988). Una de las características más importantes del núcleo de *E. histolytica* es que éste 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 (Teixeira & Huston., 2008) y al aparato de Golgi (Ghosh *et al.*, 1999). Gran parte del citoplasma se encuentra ocupado por vacuolas circulares de aproximadamente 0.5 a 9  $\mu\text{m}$ . 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 cúmulos helicoidales con 300 nm de longitud y 40 nm de diámetro (Martínez-Palomo, 1986; Ravdin, 1988). La caracterización de la membrana plasmática es crucial para poder comprender las interacciones que se llevan a cabo entre la amiba y el huésped, sin embargo, el estudio de esta membrana ha sido difícil, ya que se ha tenido que estudiar de manera fraccionada. A través del fraccionamiento fue posible conocer la composición lipídica de la membrana, la cual difiere de manera cuantitativa y cualitativa de las presentes en mamíferos. Los lípidos que componen esta membrana son la fosfatidil-etanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ceramida aminoetilfosfonato, el cual es un lípido poco

común (Ravdin, 1988). Se piensa que esta composición de lípidos poco habitual puede ser la razón de gran plasticidad que presenta el trofozoíto, además de conferirle estabilidad (Martínez-Palomo, 1986; Ravdin, 1988).

### **1.3.2 CICLO DE VIDA**

En la figura 1, se esquematiza el ciclo de vida *E. histolytica* que inicia con la ingestión de quistes presentes en alimentos y agua contaminados con materia fecal humana. Los quistes ingeridos no se ven afectados por el pH ácido del estómago debido a la pared de quitina que presenta, sin embargo, es reblandecido por los jugos gástricos y pancreáticos, lo cual permite su desenquistamiento en la región ileo cecal (Gómez *et al.*, 2007). Durante el desenquistamiento hay una división del citoplasma y del núcleo, dando paso a la generación de ocho nuevos trofozoítos, que después migran hacia el intestino grueso donde se alojan en las criptas intestinales y se alimentan de bacterias residentes y restos celulares (Ximénez *et al.*, 2007). Una vez que los trofozoítos se han localizado en el intestino grueso, éstos se adhieren a la mucosa intestinal, donde pueden vivir como comensales, sin causar un daño aparente. Sin embargo, en algunos casos los trofozoítos invaden el intestino, provocando la amibiasis intestinal. En ocasiones incluso pueden atravesar la barrera intestinal y diseminarse a hígado, cerebro y pulmón, donde provocan abscesos. El ciclo de vida de la amiba se completa cuando el trofozoíto enquistado a medida que avanza por el colon, ya que será eliminado con las heces (Sehgal *et al.*, 1996; Ximénez *et al.*, 2007).

### **1.4 FACTORES DE VIRULENCIA**

El daño citopático causado por los trofozoítos de *E. histolytica* es resultado de un evento secuencial compuesto de tres pasos fundamentales que son: adhesión, citólisis

o lisis celular y fagocitosis (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). El daño citopático es un evento multifactorial ya que son diversas las moléculas que actúan para que este proceso se lleve a cabo, moléculas que se conocen como factores de virulencia.

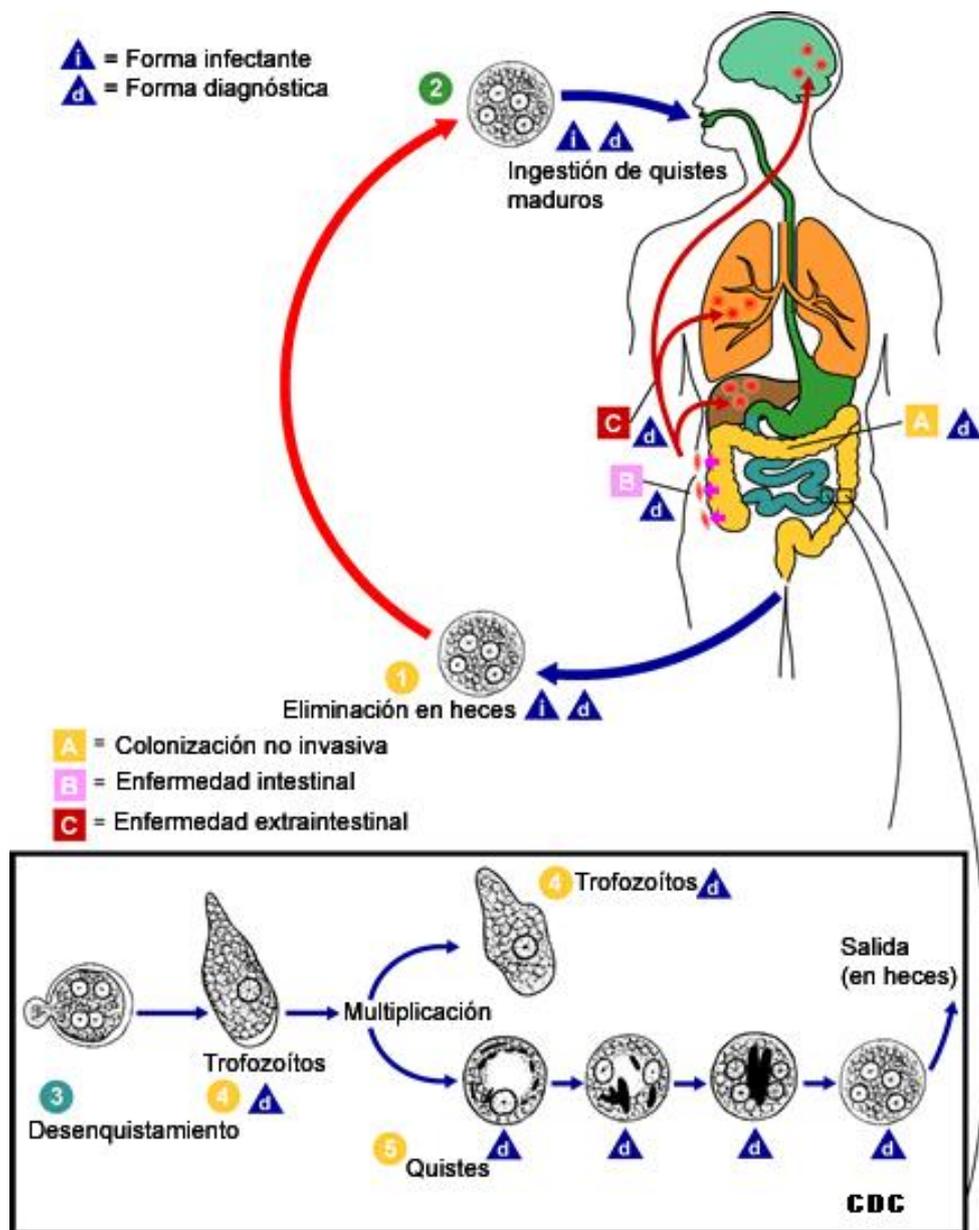
#### **1.4.1 LECTINA INHIBIBLE POR RESIDUOS DE GALACTOSA/N-ACETIL-D-GALACTOSAMINA (Gal/Gal NAc)**

La lectina integral de membrana que une residuos de Galactosa/N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNac) es la lectina más estudiada debido a su importante papel en el proceso de adhesión a glicoproteínas de las células del hospedero (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). Esta lectina es una glicoproteína heterodimérica de 260 kDa compuesta por una subunidad pesada de 170 kDa (Hgl) y una ligera de 31-35 kDa (Lgl), ambas unidas por puentes disulfuro (Huston, 2004). La lectina Gal/GalNac también está involucrada en citotoxicidad, fagocitosis, transducción de señales y evasión del sistema del complemento (Trejos-Suárez & Castaño-Osorio, 2009). Aun no se sabe cómo es que esta lectina modula la virulencia y la endocitosis, sin embargo, se sabe que al truncar el extremo amino terminal de la Lgl se tiene como resultado una eritrofagocitosis deficiente (Katz *et al.*, 2002). Se sabe también que la Hgl tiene un dominio de reconocimiento a carbohidratos (CRD) en la porción extracelular de la proteína, y también dos dominios semejantes a integrina en el carboxilo terminal citoplásmico (Laughlin & Temesvari, 2005). La adición de galactosa o N-acetil-D-galactosamina reduce la adherencia de los trofozoítos a monocapas celulares hasta en un 90%, resultado que indica la especificidad de esta lectina a estos sacáridos y su importancia en el proceso de adhesión (Laughlin & Temesvari, 2005).. Adicionalmente,

se ha reportado una disminución de la adhesión de *E. histolytica* a células CHO que presentan patrones de glicosilación alterados (Li *et al*, 1988).

#### **1.4.2 COMPLEJO *EhCPADH***

La segunda molécula de adherencia más estudiada es el complejo proteico (*EhCPADH*) de 124 kDa, el cual está compuesto por una proteína de adhesión (*EhADH112*) y una con actividad proteolítica del tipo cisteína (*EhCP112*) (García-Rivera *et al.*, 1999). Este complejo se encuentra en membrana plasmática y vacuolas citoplasmáticas (García-Rivera *et al.*, 1999). La adhesina *EhADH112* presenta tres posibles dominios transmembranales y con el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la adhesina se logró bloquear la adhesión, la fagocitosis y la destrucción de monocapas celulares (Arroyo & Orozco., 1987), sugiriendo que este complejo tiene un papel importante en la virulencia del parásito. Por otro lado, diferentes estudios han demostrado que al inocular hámsteres con péptidos recombinantes o con una mezcla del cDNA de la adhesina y de la cisteína proteasa, los animales presentan una protección parcial contra la amibiasis hepática (Madriz *et al.*, 2004; Martínez-López *et al.*, 2004; Martínez *et al*, 2009).



**Figura 1.- Ciclo de vida de *E. histolytica*.** La infección inicia con la ingesta de quistes, los cuales son capaces de resistir el pH gástrico. En el intestino delgado se da el desencistamiento, que consiste en la división del quiste tetraucleado y el citoplasma, dando origen a ocho trofozoítos. Los trofozoítos se dirigen a intestino grueso para colonizarlo, ahí se alimentan de bacterias y restos celulares. Finalmente, los trofozoítos pueden enquistarse y completar el ciclo. Sin embargo, en algunos casos los trofozoítos invaden el intestino, provocando la amibiasis intestinal. En ocasiones incluso pueden atravesar la barrera intestinal y diseminarse a hígado, cerebro y pulmón, donde provocan abscesos (CDC, 2009).

### **1.4.3 LECTINA DE 220 kDa (L220)**

Esta proteína que une oligosacáridos de N-acetilglucosamina fue aislada y purificada de la cepa HM1: IMSS y se localizó en la membrana plasmática del parásito (Rosales-Encinas *et al*, 1987; Meza *et al*, 2006). Poco se sabe de la función o ligando extracelular de esta adhesina, sin embargo, se ha visto que es altamente inmunogénica en ratones, hámsteres y conejos (Rosales-Encinas *et al*, 1987; Talamás-Rohana & Meza 1988). En el modelo del ratón esta adhesina tiene un efecto inmunomodulador, ya que cuenta con la capacidad de suprimir o activar la proliferación de linfocitos T (Talamás-Rohana *et al.*, 1995). *In vitro*, la proteína purificada bloquea la adhesión de los trofozoítos amibianos a monocapas celulares y aglutina eritrocitos humanos (Rosales-Encinas *et al*, 1987). De igual manera, anticuerpos dirigidos contra esta proteína inhiben parcialmente la adhesión a células blanco y la eritrofagocitosis (Talamás & Meza 1988). Los anticuerpos policlonales dirigidos contra esta lectina reconocen proteínas del mismo peso en cepas virulentas y no virulentas, mientras que anticuerpos monoclonales sólo reconocen a la proteína en las cepas patógenas HM1.IMSS o HM1:HM38, lo cual sugiere que es posible que exista una isoforma de esta adhesina, que está presente únicamente en las cepas patógenas de *E. histolytica* (Talamás-Rohana & Meza 1988).

### **1.4.4 PROTEÍNA RICA EN SERINAS (SREHP)**

Esta proteína fue identificada mediante un tamizaje diferencial de cDNA comparando una cepa patógena con otra no patógena (Stanley *et al*, 1990). Esta proteína localizada en la membrana del parásito se encuentra modificada con grupos palmitol y tiene un alto grado de modificaciones postraduccionales, un alto número de residuos de serina y secuencias hidrofílicas repetidas aleatoriamente (Stanley *et al*,

1995; Stanley *et al*, 1995). Los anticuerpos dirigidos contra esta proteína mostraron un bloqueo de la adhesión a monocapas celulares, aunque no se ha logrado identificar el ligando o la función que pudiera tener esta proteína de membrana (Stanley *et al*, 1995).

#### **1.4.5 AMEBAPORO**

El amebaporo es un péptido compuesto por 77 aminoácidos y se conocen las isoformas A, B y C, las cuales se producen en una proporción de 35:10:1 (Leippe, 1997). Las tres isoformas del amebaporo pertenecen a la familia de las proteínas del tipo saposina (SAPLIP), proteínas que se caracterizan por tener un motivo conservado de residuos de cisteína unidas por tres puentes disulfuro que permiten la interacción con lípidos (Hecht *et al.*, 2004; Winkelmann *et al.*, 2006). Las tres isoformas del amebaporo muestran una interesante similitud en cuanto a estructura y función con otros péptidos formadores de poros, en este caso a las lisinas y granulólisinas de las células NK y las células T citotóxicas de cerdos (Andersson *et al.*, 1995; Leippe, 1995, 1997).

El amebaporo en la amiba se encuentra en estructuras similares a los lisosomas de donde puede viajar a fagosomas o ser secretado al medio extracelular donde se encarga de dañar la membrana de las células blanco (Lynch *et al.*, 1982). El mecanismo de acción de este péptido consiste en permeabilizar la membrana mediante su inserción en la bicapa lipídica donde se une a fosfolípidos aniónicos, una vez unido a los fosfolípidos se dan interacciones entre los mismos péptidos formadores de poros, es decir, una interacción péptido-péptido, interacción que tiene como resultado la formación de una molécula de mayor tamaño, la cual da paso a un flujo anormal de iones y otras moléculas, en consecuencia se crea un desbalance en el medio

intracelular trayendo como resultado la muerte celular por choque osmótico (Leippe, 1997; Trejos-Suárez & Castaño-Osorio, 2009).

#### **1.4.6 CISTEÍNA PROTEASAS**

Además del amebaporo, otro factor importante en la lisis celular inducida por la amiba son las cisteína proteasas. A la fecha se han reportado veinte genes que codifican para cisteína proteasas (EhCP1-EhCP19 y Ehcp112), pero solo ocho de estas se han detectado que se expresan *in vitro* (Trejos-Suárez & Castaño-Osorio, 2009). EhCP1 (27-35 kDa), EhCP2 (35 kDa) y EhCP5 (29kDa) componen el 90% de la actividad total de las proteasas del tipo cisteína en la amiba (Bruchhaus *et al.*, 2003; Trejos-Suárez & Castaño-Osorio, 2009). EhCP1 junto con la EhCP2, 3, 5 y 112 se han identificado y localizado en membrana plasmática, endosomas y en el espacio extracelular debido a su secreción (Bruchhaus *et al.*, 2003; Hellberg *et al.*, 2001; Luaces & Barrett., 1988; Ocadiz *et al.*, 2005; Que *et al.*, 2002). EhCP1, 2, 3 y 112 participan en la destrucción de la matriz extracelular donde degradan fibronectina, laminina y colágeno, lo cual tiene como resultado la separación entre células facilitando así la invasión, además se sabe que estas tres proteasas participan en la fagocitosis (Laughlin & Temesvari, 2005; Ocadiz *et al.*, 2005).

EhCP5 es la proteasa del tipo cisteína más estudiada en *E. histolytica*, se sabe que esta contribuye a la evasión de la respuesta inmune montada por el hospedero ya que es capaz de degradar a IgA, IgG, IL-18 (clave en procesos inflamatorios, mediadora de la respuesta Th1, activadora de macrófagos y secreción de IFN) y subunidades del complemento como C3a y C5a (Kelsall *et al.*, 1993; Que *et al.*, 2003; Reed *et al.*, 1995; Tran *et al.*, 1998). EhCP5 también presenta actividad de enzima

convertasa de IL-1 $\beta$ , actividad que podría activar la cascada de las caspasas dentro de los hepatocitos causando apoptosis (Zhang *et al.*, 2000).

EhCP112 es única entre las cisteína proteasas producidas por la amiba ya que ésta se encuentra formando un complejo con una adhesina EhADH112 y es funcional, ya que al utilizar un anticuerpo monoclonal contra el complejo se inhibe la adhesión, fagocitosis y destrucción a células por parte de la amiba (García-Rivera *et al.*, 1999; Ocádiz *et al.*, 2005).

### **1.5 *Entamoeba invadens* COMO MODELO DE ENQUISTAMIENTO**

Como se menciona anteriormente el ciclo de vida del género *Entamoeba* en protozoarios parásitos que pertenecen al género *Entamoeba* comprende dos estadios: el primero se conoce como quiste. Este estadio no solo ayuda al parásito a sobrevivir en condiciones adversas que supone el medio ambiente, sino que también es la forma que produce la infección. Una vez que el quiste ha sido ingerido por el hospedero, este tiene que llegar al intestino donde se lleva a cabo el desenquistamiento y se libera la forma móvil del parásito, el cual es el segundo estadio del parásito y es conocido como trofozoito (Gómez *et al.*, 2007). El estudio de las proteínas específicas de ambos estadios así como aquellas que están involucradas en el cambio de estadio es de vital importancia para comprender la biología del parásito. *E. histolytica* es un parásito de gran importancia clínica y numerosas son las proteínas de este parásito que han sido estudiadas en la fase de trofozoito, sin embargo, estudiar las proteínas que participan en los procesos de diferenciación quiste-trofozoito y trofozoito-quiste resulta un problema, ya que en el caso de *E. histolytica* aun no se ha logrado inducir el enquistamiento de manera *in vitro*.

*E. invadens* es el agente causal de la amibiasis en reptiles, enfermedad que tiene una tasa de mortalidad de casi el 100% (McConnachie, 1969). Este parásito es genética y morfológicamente similar a *E. histolytica*, pero a diferencia de éste, en *E. invadens* ya se ha logrado llevar a cabo el enquistamiento de manera *in vitro*, mismo que por su alta eficiencia y relativa facilidad se ha aceptado como un modelo de estudio válido para el enquistamiento en el género *Entamoeba* (Ganguly & Lohia, 2001; López-Romero & Villagómez-Castro, 1993).

## **1.6 HOMEOSTASIS DEL IÓN CALCIO**

El ión calcio es una molécula de señalización importante considerada como un segundo mensajero (Moreno & Docampo; 2003), este ión es utilizado por las células eucariotas y controla diversas funciones celulares entre las cuales se encuentran la contracción muscular, división celular, diferenciación, transcripción de genes, secreción de hormonas y permeabilidad a los iones sodio y potasio (Meza *et al.*, 2006; Welling, 2009).

La célula puede elevar los niveles de calcio citoplasmático para activar diferentes funciones celulares mediante la obtención del ión de manera extracelular o mediante su liberación de organelos de almacenaje como el retículo endoplásmico (Díaz, 2003). La obtención de calcio extracelular es llevada a cabo por canales iónicos, los cuales son controlados por diversos mecanismos como cambios de voltaje, unión a ligando o por la misma liberación de calcio intracelular. Estos mecanismos permiten la apertura del canal y el paso de los iones a través de los mismos (Aidley & Stanfield, 1996).

El aumento en la concentración de calcio intracelular también es regulada mediante la liberación del ión del retículo endoplásmico, liberación que es resultado de

un proceso de señalización que consiste en la activación de la fosfolipasa C (PLC $\gamma$ 1), enzima que hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) y produce diacilglicerol (DAG) e inositol 3-fosfato (IP3), este último se une a su receptor en el retículo endoplásmico y conduce a la liberación de calcio al citosol (Nowycky & Thomas, 2002). Los canales del retículo endoplásmico activados por rianodina también conducen a la liberación del calcio (Higgins *et al.*, 2006).

El calcio, a diferencia de otras moléculas de señalización, no puede ser degradado, por lo tanto una vez que el calcio citoplasmático alcanza un nivel umbral para llevar a cabo diversos procesos de señalización, se activan diferentes mecanismos dirigidos a disminuir la concentración de calcio intracelular a su nivel basal (Díaz, 2003). Entre estos mecanismos reguladores se encuentra la actividad de diferentes ATPasas de calcio, cuya función es expulsar de la célula o atrapar en organelos intracelulares el exceso de calcio citoplásmico con el fin de regular la concentración normal del ión (Clapham, 2007). En la membrana plasmática, la ATPasa de calcio (PMCA, del inglés plasma membrane calcium ATPase) funciona como una bomba, ya que se encarga de expulsar al ión al espacio extracelular, mientras que la ATPasa de calcio del retículo endoplásmico (SERCA, del inglés sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase) se encarga de capturar calcio, ya que como se mencionó anteriormente, este organelo es un lugar de almacenaje del ión (Benaim, 2004).

Para que estos procesos de regulación se activen, es necesario que existan sensores que verifiquen la concentración de calcio intracelular, un ejemplo de esto es la proteína de 17 kDa conocida como calmodulina. La calmodulina contiene un dominio conocido como EF-hand, que le permite unir calcio (Díaz, 2003). Otro ejemplo es la molécula de interacción estromal 1 (STIM1), la cual es una proteína de 90 kDa, que funciona como sensor de calcio en el retículo endoplásmico y al igual que la

calmodulina contiene un dominio EF-hand que le permite unir calcio (Fahrner *et al.*, 2009).

### **1.6.1 CANALES IÓNICOS**

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que permiten el paso de una gran cantidad de iones ( $1 \times 10^{10-12}$  iones/seg) específicos por difusión pasiva, condición que los diferencia de los transportadores o bombas, los cuales sólo pueden pasar uno o muy pocos iones (Feranchak, 2003; Jentsch *et al.*, 2004). Los canales iónicos presentan características funcionales comunes, como son: un poro acuoso por el cual los iones son capaces de pasar un filtro de selectividad que permite discriminar entre los tipos de iones como sodio, potasio, calcio y cloro; y una compuerta con la cual el canal puede cerrarse o abrirse al flujo de iones (Hille, 2002). Para que estos canales permitan el flujo de iones a través de ellos, es necesario que cambien de su forma cerrada a su forma abierta, cambio que es controlado por diferentes señales como el voltaje, unión de ligandos, concentración de calcio intracelular o neurotransmisores extracelulares como el ácido gamma-aminobutírico (GABA), modificaciones post-traduccionales como la fosforilación y factores microambientales como los niveles de ATP y el pH (Hille, 2002; Jentsch *et al.*, 2004).

La función de los canales iónicos es mantener la homeostasis electroquímica en los diferentes compartimentos intracelulares mediante la regulación del flujo de cargas a través de las membranas biológicas como consecuencia del movimiento de carga eléctrica, acarreada por distintas especies iónicas que producen cambios en el potencial de membrana (Hille, 2002). Los canales iónicos se encuentran en la membrana celular de los organismos (Guda *et al.*, 2007). Se sabe que los canales participan en infinidad de funciones biológicas. A nivel celular controlan el volumen, la

proliferación y la señalización. En células excitables como las neuronas, los canales iónicos se encargan de transmitir los impulsos eléctricos con el fin de excitar a las células, excitación que conduce a la transducción sensorial, el aprendizaje y la memoria (Feranchak, 2003). A nivel gastrointestinal los canales iónicos contribuyen en la motilidad del intestino, el balance de agua y sal, en la secreción pancreática y la digestión, entre otras (Feranchak, 2003). Los canales iónicos también son importantes en el sistema inmune, ya que mediante vías de señalización activadas por cambios en los niveles de los iones, conducen a la proliferación de linfocitos T (Cahalan & Chandy, 1997; Cahalan *et al.*, 2001). Procesos como la mitosis y la secreción de hormonas también son regulados por canales iónicos (Ponce & Cereijido, 2000).

Los canales dependientes de voltaje son aquellos donde un cambio en el potencial eléctrico de membrana induce al canal a abrirse, permitiendo así el flujo de iones a través de él (Aidley & Stanfield, 1996). Otro mecanismo es el de los canales dependientes de ligando, donde un neurotransmisor u hormona interacciona con el receptor del canal, lo que crea un cambio en el potencial de membrana y en la conformación del canal (Collingridge *et al.*, 2009). Si el ligando actúa directamente con el receptor del canal, este es un mecanismo ionotrópico, mientras que el metabotrópico activa al canal de manera indirecta, ya que el neurotransmisor se une a un receptor no asociado al canal, sin embargo, activa redes de señalización que culminan en la fosforilación del canal y la apertura del mismo (Aidley & Stanfield, 1996; Hille, 2002).

### **1.6.2 CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE (VGCCs)**

Todas las células excitables expresan canales de calcio dependientes de voltaje, los cuales traducen la actividad eléctrica a señales bioquímicas. La despolarización de la membrana trae como resultado la apertura de los canales permitiendo así una rápida

entrada del calcio, el cual regula procesos como la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos, excitabilidad neuronal y plasticidad, entre otros (Cao, 2006).

Los canales de calcio dependientes de voltaje son los más estudiados y se clasifican con base en su cinética y propiedades farmacológicas en canales L, T, N, P, Q y R (Catterall, 2000). Los canales del tipo L son encontrados en tejido cardíaco, son dependientes de dihidropiridinas (DHP). Los tipo P, N, T, Q y R se expresan en cerebro, los P y N son dependientes de  $\omega$ -conotoxina, mientras que los T no dependen de ningún agonista (Ponce & Cereijido, 2000). Los canales del tipo L son los mejor caracterizados y consisten en las subunidades denominadas  $\alpha_1$  (190 kDa), el heterodímero unido por puentes disulfuro  $\alpha_2\delta$  (170 kDa),  $\beta$  (55 kDa) y  $\gamma$  (33 kDa), donde la subunidad de 200 aminoácidos  $\alpha_1$  es la más importante, ya que forma el poro, expresa el filtro de selectividad y el sensor de voltaje, además de que contiene el sitio de unión para agonistas y antagonistas de los canales de calcio (Catterall, 2000; Welling, 2009).

### **1.6.3 CANALES DE CALCIO REGULADOS POR DEPÓSITOS INTRACELULARES (SOCCS)**

Otros canales involucrados en la regulación del calcio intracelular son los canales de calcio regulados por depósitos intracelulares (SOCCs). De estos, los mejor caracterizados son los canales activados por liberación de calcio (CRAC), los cuales fueron descritos por primera vez en células T de humano, donde son requeridos para la respuesta a antígenos, para proliferación y secreción de citocinas (Frischauf *et al.*, 2008; Guo & Huang., 2008). La búsqueda de los componentes moleculares de estos canales trajo como resultado el hallazgo de dos moléculas clave, que son STIM1 y Orai1 (Fahrner *et al.*, 2009). STIM1 inicialmente se caracterizó como 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, además de un dominio 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 N-glicosilado permite la relocalización de STIM1 a membrana plasmática (Frischauf *et al* 2008; Várnai *et al.*, 2009). STIM1 funciona como sensor de calcio en el retículo endoplásmico, cuando el calcio se encuentra en bajas concentraciones en este organelo, STIM1 es capaz de relocalizarse en membrana plasmática donde activa a Orai1, activación que permite una corriente de calcio conocida como  $I_{CRAC}$  (Fahrner *et al* 2009). Orai1 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 subunidades 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, 2008).

Los receptores de potencial transitorio (TRP) 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, detección de feromonas y recepción térmica, entre otros (Liu & Liman, 2003). Los TRP son canales iónicos selectivos para los cationes de calcio y magnesio, estos 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 son agrupados en base a su secuencia de aminoácidos y

similitud estructural, dividiéndolos así en las familias TRPA, TRPC, TRPM, TRPML, TRPN, TRPP y TRPV (Huang, 2004., Ramsey *et al.*, 2006).

Los canales TRP pueden ser activados por receptores, ligandos o por activación directa. La activación por receptores es llevada por receptores acoplados a proteínas G y por receptores de tirosina cinasas que activan a la PLC, la cual modula la activación de los TRP, esto mediante tres vías que son: la hidrólisis del PIP<sub>2</sub>, la producción de DAG, o la producción de IP<sub>3</sub> (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, IP<sub>3</sub>, eicosanoides); por nucleótidos púricos y sus metabolitos (adenosin difosforibosa,  $\beta$ 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 IP<sub>3</sub> y por fosforilación del canal, sin embargo, aun es poco lo que se sabe de este tipo de activación (Ramsey *et al.*, 2006).

#### **1.6.4 BOMBAS DE CALCIO**

En la célula se encuentra tres familias de ATPasas capaces de bombear calcio: las ATPasas de calcio de membrana plasmática (PMCA), las ATPasas de calcio de retículo sarcoendoplásmico (SERCA) y las residentes del aparato de Golgi, también conocidas como ATPasas de calcio de vías secretoras (SPCA o PMR1) (Díaz, 2003; Rudolph *et al.*, 1989).

Las PMCA se encargan de expulsar calcio citoplasmático con el fin de mantener la concentración normal del ión. La masa molecular de las PMCA es de aproximadamente 138 kDa, poseen diez fragmentos transmembranales y presenta un

sitio de fosforilación por ATP, además de un sitio de unión al ATP; ambos sitios son característicos de las bombas del tipo “P”, definidas así por la formación de un intermediario fosforilado (aspartil-fosfato) durante el ciclo catalítico (Strehler *et al.*, 2007). Estas bombas expulsan una molécula de calcio por cada molécula de ATP hidrolizada (Benaim, 2004) y en el humano existen las isoformas PMCA1, 2, 3 y 4, todas codificadas por genes diferentes (Strehler *et al.*, 2007).

Las ATPasas de calcio del tipo de SERCA son proteínas intracelulares que se encargan de introducir calcio al retículo endoplásmico mediante la hidrólisis de ATP. La salida del ión almacenado en el retículo endoplásmico es regulada por receptores de rianodina e IP3 que se encuentran acoplados a canales de calcio (Higgins *et al.*, 2006). Las ATPasas de calcio del tipo de SERCA tienen una masa molecular de entre 109 y 115 kDa, éstas al igual que las PMCA pertenecen a la familia de las ATPasas del tipo “P”, sin embargo, esta ATPasa es capaz de transportar dos moléculas de calcio por cada molécula de ATP hidrolizada (Benaim, 2004). En el humano las SERCA presentan diez fragmentos transmembranales y existen las isoformas SERCA1, 2 y 3 (Martin *et al.*, 2002).

La primer ATPasa de calcio de Golgi reportada fue la de *Saccharomyces cerevisiae*, nombrada como PMR1 (Rudolph *et al.*, 1989). Conforme se ha avanzado en el estudio de este tipo de ATPasa de calcio 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, del inglés secretory pathway calcium ATPase) (Benaim, 2004; Mitchell *et al.*, 2004; Raeymaekers, 2002). Se sabe que esta ATPasa atrapa calcio, el cual se utiliza 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).

Otros componentes implicados en la regulación del calcio son los intercambiadores de sodio/calcio (NCX) y los intercambiadores sodio/calcio-potasio (NCKX) (Dong *et al.*, 2006).

Los NCX pertenecen a la superfamilia de antitransportadores catión/catión, las cuales son proteínas localizadas en la membrana plasmática que tienen como función la extrusión del calcio de la célula para mantener la homeostasis del ión, sin embargo, en ocasiones estas proteínas pueden operar de modo reverso y causar un influjo de calcio (Díaz, 2003). La bomba realiza el intercambio de los iones en una relación de 1 a 3, es decir, una molécula de calcio por tres moléculas de sodio, este intercambio de iones utiliza la energía almacenada en el gradiente electroquímico del sodio, cuenta con 9 fragmentos transmembranales y en el humano existen tres isoformas NCX1, 2 y 3 (Blaustein & Lederer, 1999; Díaz, 2003).

Las NCKX al igual que las NCX se localizan en membrana plasmática y llevan a cabo la misma función, sin embargo, las NCKX son proteínas de cotransporte, que expulsan una molécula de calcio y una de potasio por cada cuatro moléculas de sodio que entran. Las NCKX tienen 11 fragmentos transmembranales y en el humano existen las isoformas NCKX1, 2, 3, 4, 5 y 6 (Altimimi & Schnetkamp, 2007).

## **2. ANTECEDENTES DIRECTOS**

### **2.1 IMPORTANCIA DEL CALCIO EN *Entamoeba***

El ion calcio es utilizado en la señalización celular en prácticamente todos los seres vivos, incluyendo protozoarios parásitos del humano como *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania spp*, *Plasmodium spp*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*,

*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis* (Moreno & Docampo, 2003).

Específicamente en *E. histolytica*, para que el proceso citopatológico comience, es necesario que la amiba se adhiera a la célula blanco, adhesión que puede ser inhibida por bloqueadores de canales de calcio como el Verapamil y el Bepridil (Ravdin *et al.*, 1982). Estos mismos bloqueadores son capaces de inhibir tanto el crecimiento como el enquistamiento de la amiba (Makioka *et al.*, 2001). Además, el uso de estos bloqueadores de canales de sodio y calcio inhiben la lisis celular (Ravdin *et al.*, 1982). Por otra parte, el calcio también induce en la amiba la exocitosis de vesículas ácidas (Ravdin *et al.*, 1988), las cuales pueden contener cisteína proteasas (Que & Reed, 2000), que, como se mencionó antes, son factores de virulencia importantes para la amiba, ya que degradan componentes de matriz extracelular (Trejos-Suárez & Castaño-Osorio, 2009).

En los trofozoítos de *E. histolytica* se ha encontrado una proteína similar a calreticulina (González *et al.*, 2002) una proteína que une calcio residente de retículo endoplásmico en otros organismos. También se sabe que el inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y el inositol 1,3,4,5-tetrafosfato (IP4) promueven la liberación de calcio de depósitos intracelulares presentes en la amiba (Raha *et al.*, 1994, 1995). Además se ha reportado que la Tapsigargina, un bloqueador específico de SERCA es capaz de provocar una liberación de calcio en la amiba (Carbajal *et al.*, 1996). En conjunto estos resultados sugieren que es posible que la amiba aunque no posee un retículo endoplásmico bien desarrollado presenta estructuras similares al retículo endoplásmico que funcionen como depósitos del ión (Raha *et al.*, 1994; Raha *et al.*, 1995).

La liberación de calcio en el citoplasma de los trofozoítos trae como resultado la activación de diversas cinasas y proteínas unidoras de calcio (CaBPs). De estas

últimas se conocen dos isoformas: *EhCaBP1* y *EhCaBP2*. *EhCaBP1* se une directamente a actina (Talamás-Rohana & Meza; 1988), la inhibición de *EhCaBP1* tiene como resultado una baja proliferación de la ameba, una deficiente eritrofagocitosis y una baja activación de cinasas endógenas, cinasas que pueden estar involucradas en procesos de señalización que inducen la formación del fagosoma (Jain *et al.*, 2008; Sahoo *et al.*, 2004). La segunda isoforma es la *EhCaBP2*, una proteína monomérica de 15 kDa, que al igual que la *EhCaBP1*, presenta cuatro dominios que unen calcio (EF-hand) (Chakrabarty *et al.*, 2004). Ambas proteínas son funcionalmente diferentes, ya que difieren en los sitios de unión y en las cinasas que activan (Chakrabarty *et al.*, 2004).

El calcio también está involucrado en la regulación transcripcional de *E. histolytica*. URE3-BP es un factor de transcripción que se une al motivo URE3 y que es regulado por calcio, este factor modula la expresión genética de al menos un factor de virulencia, la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc (*hgl5*) (Gilchrist *et al.*, 2008). *In vitro*, la adición de calcio inhibe la unión de URE3-BP a la secuencia URE3 y por tanto modifica la expresión de *hgl5* y posiblemente otros de los factores de virulencia (Gilchrist *et al.*, 2008).

A pesar de la importancia de la señalización por calcio en la biología de *Entamoeba*, hasta el momento no se han estudiado las moléculas involucradas en regular la concentración intracelular del ion.

## **2.2 CANALES IÓNICOS EN *Entamoeba***

En *E. histolytica* 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 ameba pertenecen

a la familia de canales de cloro de membrana plasmática, lo cual fue confirmado para *EhClC-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 de la amiba se mostró que el canal tiene especificidad por el ión cloro y que este canal está implicado en la regulación del pH y del volumen celular (Salas-Casas *et al.*, 2006).

Hasta hoy 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 amiba y no en la membrana plasmática (Ghosh *et al.*, 2000). Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios funcionales que permitan conocer el papel de esta u otras ATPasas en la homeostasis del calcio de *E. histolytica* y en diversos procesos celulares como motilidad, enquistamiento o patogenicidad en este parásito.

En nuestro trabajo de tesis de maestría (Martínez Higuera, 2010) se detectó mediante análisis *in silico* varias secuencias génicas que codifican para proteínas que presentan los dominios típicos de ATPasas de calcio. Análisis filogenéticos sugirieron que tres de estas se relacionan con miembros de la familia de PMCA, una con miembros de SPCA y una más se agrupó con ATPasas de calcio de retículo

endoplásmico, además de que experimentalmente se demostró que todos esos genes se transcribían en los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

Con el fin de conocer la participación de la posible ATPasa del tipo de SERCA (EhSERCA) en la virulencia amibiana, se trataron trofozoítos con Tapsigargina el cual es un bloqueador específico de SERCA y se realizaron ensayos de virulencia *in vitro*, en los cuales se observó un decremento del 39% en eficiencia de adhesión, un 58% en citopatogenicidad y un 45% en eritrofagocitosis, pero el efecto en esas actividades solo se obtuvo cuando los trofozoítos se incubaron con la droga durante periodos cortos (5 min); pero a mayor tiempo, esas actividades eran similares a las mostradas por los trofozoítos control (Martínez-Higuera, 2010). De cualquier manera esos ensayos sugirieron un posible papel de EhSERCA en la virulencia de *E. histolytica*.

Para localizar subcelularmente a la posible EhSERCA, se seleccionó un péptido específico de esta proteína, el cual se sintetizó y se utilizó para obtener anticuerpos específicos contra la posible EhSERCA. Al realizar la inmunodetección con los anticuerpos específicos en ensayos de Western blot se detectó una proteína de aproximadamente 115 kDa y en la inmunolocalización mediante microscopia confocal, la proteína se encontró delimitando estructuras de tipo vacuolar cercanas al núcleo (Martínez-Higuera, 2010). Sin embargo, hasta el momento no se tiene una idea clara del papel funcional de esta proteína en la biología del parásito.

### **3 JUSTIFICACIÓN**

El estudio de ATPasas de calcio en parásitos del género *Entamoeba* es importante, ya que en numerosos organismos se ha demostrado que estas moléculas participan en la homeostasis del calcio, el cual participa en numerosas vías de señalización que en la amiba podrían inducir desde la activación de los diversos factores de virulencia hasta mecanismos de diferenciación trofozoíto-quiste.

### **4 HIPÓTESIS**

*E. histolytica* y *E. invadens* cuentan con ATPasas de calcio del tipo de SERCA, fundamentales para la homeostasis y regulación de la concentración intracelular del calcio y que tienen un papel importante en el proceso patogénico y en la diferenciación de estos parásitos.

### **5 OBJETIVOS**

#### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Identificar y caracterizar funcionalmente la proteína EhSERCA en la virulencia *in vitro* de *Entamoeba histolytica* y EiSERCA en el enquistamiento de *Entamoeba invadens*.

#### **5.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Identificar en *E. invadens* la ATPasa de calcio del tipo de SERCA (EiSERCA)
- 2.- Localizar subcelularmente a EhSERCA y EiSERCA
- 3.- Estudiar la participación de EhSERCA en la virulencia *in vitro* de *E. histolytica*
- 4.- Analizar la participación de EiSERCA en el proceso de enquistamiento

## **6 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 CULTIVO CELULAR DE *E. histolytica* Y *E. invadens***

Trofozoítos de *E. histolytica* de la clona A (cepa HM1-IMSS) (Orozco *et al.*, 1983) y trofozoítos de *E. invadens* (cepa IP1) se cultivaron en tubos de vidrio de 125 mm con tapa de rosca estériles a 37 °C en medio axénico TYI suplementado con 20 % de suero bovino, 3 % de mezcla de vitaminas de Diamond, 0.25 UI de penicilina y 35 µg/ml de estreptomina (Diamond 1978). Para resembrar las células, los tubos con trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento se incubaron en hielo por 5-10 min para despegarlas de las paredes del tubo. Entonces, una porción del cultivo se inoculó en medio fresco. Para cosechar los trofozoítos, después de enfriar los cultivos, estos se centrifugaron a 360 x g por 7 min a 4 °C.

### **6.2 ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens***

Trofozoítos de *E. invadens* en fase logarítmica de crecimiento se resuspendieron en medio LG frío (TYI sin glucosa). Una vez resuspendidos se tomó una alícuota para hacer el conteo de viabilidad por medio de la técnica de exclusión de azul de tripano. Posteriormente, las células se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron a una concentración final de  $1 \times 10^7$  amibas/ml. Posteriormente, 0.75 ml de esta suspensión se pasaron a un tubo con 14.25 ml de medio LG diluido al 47%. La concentración final del suero fue de 5%.

### **6.3 TINCIÓN CON CALCOFLUOR**

Los quistes obtenidos se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 1 h a 28°C. Después se realizaron tres lavados con PBS y las muestras se incubaron con

calcofluor al 0.02% (1 mg en 10ml de PBS). Después las muestras se lavaron con PBS y se fijaron para ser observadas al microscopio de fluorescencia.

#### **6.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE TROFOZOITOS**

Para la obtención de las proteínas de los trofozoítos,  $3 \times 10^6$  células se cosecharon enfriando en hielo de 5 a 10 min, los trofozoítos se lavaron dos veces con PBS pH 6.8 y se centrifugarán a  $360 \times g$  durante 7 min a  $4^{\circ}C$ . Posteriormente a las células se les añadió el inhibidor de proteasas “complete” (Roche) relación v/v. Las se congelaron en  $N_2$  líquido y se descongelaron a temperatura ambiente de forma alterna y se mezclaron con vórtex. Finalmente, los extractos se centrifugaron a  $10\,000 \times g$  durante 15 min a  $4^{\circ}C$  y los sobrenadantes se guardaron a  $-20^{\circ}C$  hasta su uso.

#### **6.5 EXTRACCIÓN DE PROTEINAS DE QUISTES**

Los quistes de *E. invadens* se resuspendieron en 200  $\mu$ l de amortiguador de lisis (50 mM Tris-Hcl pH 7.2, 150 mM NaCl, inhibidor de proteasas complete v/v (Roche) y triton-X100 al 2%, se sometieron a sonicación durante 5 seg por 5 seg de descanso durante 10 min a  $4^{\circ}C$ . Entonces las muestras se centrifugaron a  $10\,000 \times g$  durante 20 min a  $4^{\circ}C$  y se guardaron a  $-20^{\circ}C$  hasta su uso.

#### **6.6 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: acrilamida 10%, Bis-acrilamida 0.9%, Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8), SDS al 0.1%. PSA (persulfato de amonio) 0.1% y 0.15% de TEMED; mientras que el gel concentrador se preparó con acrilamida 29%, Bis-acrilamida 0.9%,

Tris-HCl 0.5% M (pH 6.8), SDS al 0.1%, PSA 0.1% y 0.15% de TEMED; como amortiguador de corrida se utilizó una solución de Tris 0.25 M y glicina 1.9 M y 0.1% de 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, estos se tiñeron durante 20 min con azul de Coomassie al 0.05% en metanol al 50% y ácido acético al 10% a temperatura ambiente y en agitación. Para desteñir los geles, éstos se incubaron en una solución de metanol al 5% y ácido acético al 7% en agitación, hasta que las bandas de las proteínas aparecieron azules sobre un fondo transparente.

## **6.7 WESTERN BLOT**

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  $\mu\text{m}$  (Millipore) se equilibraron por 40 min en una solución amortiguadora de transferencia (Tris 48 mM; glicina 39 mM pH 8.3 y metanol al 20 %). Entonces, 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 de este el papel de nitrocelulosa pero hacia el ánodo. Posteriormente, se colocó otro pedazo de papel filtro, 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 (policlonal anti-EhSERCA) (Martinez-Higuera, 2010) diluido 1:1000 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 1:10000 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, NaCl 150 mM y por último se lavó con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM. Finalmente, las membranas se lavaron y revelaron por quimioluminiscencia (ECL Plus, Amersham), de acuerdo al protocolo del fabricante. Como control de carga se utilizó un anticuerpo un anticuerpo contra actina (amablemente proporcionado por el Dr. Manuel Hernández Hernández el Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN).

## **6.8. INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL**

Los trofozoítos de *E. histolytica* y *E. invadens* se despegaron de las cajas de cultivo por enfriamiento en hielo y se vertieron  $1 \times 10^6$  trofozoítos a cajas de seis pozos (1 ml/pozo) (Costar) a las cuales previamente se les colocó un cubreobjetos estéril. Las células se incubaron por 1 h a 37°C para permitir la adherencia de las amibas al cubreobjetos. Posteriormente las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% incubando a 37°C por 40 min y se lavaron con PBS (pH 7.4). Después, se

permeabilizaron con PBS-Triton X-100 al 0.5%, incubando a 37°C por 40 min y se lavaron dos veces con PBS (pH 7.4). Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con albúmina al 1% y se incubaron por 1 h a 37°C.

Para la localización de EhSERCA e EiSERCA se agregó el anticuerpo policlonal de conejo anti-EhSERCA a una dilución 1:50 en PBS y se incubó por 1 h a 37°C. Después se lavó con PBS hasta eliminar el exceso de anticuerpo primario, para después, agregar el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con FITC (ZYMED) a una dilución de 1:200 por 1 h a 37°C. Para la localización de EhSERCA y calreticulina (EhCRT), después de realizar la incubación de los anticuerpos primario y secundario para localizar EhSERCA. Las muestras se incubaron con el anticuerpo anti-calreticulina hecho en ratón (González *et al*, 2011) a una dilución 1:50 en PBS y posteriormente el anticuerpo secundario anti-igG de ratón acoplado a rodamina (Zymed) a una dilución 1:200 por 1 h a 37°C. Finalmente se volvió a lavar hasta eliminar el exceso de anticuerpo secundario.

Los quistes fueron procesados en suspensión y fijados con paraformaldehído al 4% durante 1 h a 28°C, después se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 ml para posteriormente ser empastillados por centrifugación. Entonces, las muestras se resuspendieron en 200 µl y se realizaron tres ciclos de congelación/descongelación. Después, los quistes se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.2% (1ml) durante 5 min a temperatura ambiente en agitación suave. Terminado este tiempo, las muestras se lavaron durante 1 min con PBS. Entonces, para bloquear los sitios inespecíficos se utilizó suero fetal bovino al 10% en PBS (1ml) por 1 h a temperatura ambiente en agitación suave. Posteriormente, se dieron tres lavados de 1 min con PBS. Después, las células se incubaron con anticuerpo anti-EhSERCA durante 12 h a 4°C en agitación

suave y posteriormente con el anticuerpo secundario (anti-ratón acoplado a rodamina) diluido 1:100 durante 1 h a 37°C.

En todos los casos, los núcleos se tiñeron durante 15 min a temperatura ambiente con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (400mM) (Sigma). El montaje de las muestras se realizó utilizando 7 µl del medio de montaje para fluorescencia VECTASHIELD (VECTOR Laboratories, Inc. H-1000). Finalmente, las muestras fueron examinadas en un microscopio de epifluorescencia y en un microscopio confocal LSM700 (Zeiss). Se realizaron 15 cortes ópticos con un grosor de 1 µm.

## **6.9. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

Los ensayos de microscopia electrónica se llevaron a cabo utilizando la metodología reportada por Segovia-Gamboa *et al* (2011). Los trofozoítos de *E. histolytica* se fijaron con paraformaldehído al 4% y 0.1% de glutaraldehído en medio DMEM libre de suero por 1 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron embebidas en la resina LR White (London Resin Company Ltd) y polimerizadas bajo UV a 4°C durante toda la noche. Se obtuvieron los cortes de 60 nm y se montaron en rejillas de níquel cubiertas con formal-polivinil (Electron Microscopy Sciences). Después las muestras se incubaron con los anticuerpos de conejo anti-EhSERCA y anticuerpos de ratón anti-EhCRT. Alternativamente, las muestras se incubaron con los anticuerpos de conejo anti-EhSERCA y anticuerpos de ratón dirigidos contra la ATPasa de calcio del tipo SPCA de *E. histolytica* (EhPMR1). Todos los anticuerpos se utilizaron en una dilución 1:20. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron cabra anti-conejo acoplado a partículas de oro de 30 nm y cabra anti-ratón acoplado a partículas de oro de 15 nm (Ted Pella Inc), ambos anticuerpos se utilizaron a una dilución 1:60. El inmunomarcaje

se llevó a cabo a temperatura ambiente. Finalmente las muestras se analizaron por microscopia electrónica de transmisión en el microscopio Jeol JEM-1011.

En el caso de los quistes, estos fueron fijados en glutaraldehído al 2.5% (v/v) en amortiguador de cacodilato de sodio (0.1M pH 7.2) por 1 h. Después, los quistes fueron post-fijados por 60 min con tetraóxido de osmio al 1% en el mismo amortiguador. Después de que las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol y óxido de propileno, los quistes fueron embebidos en resina epoxy (Polysciences) y polimerizados a 60 °C por 24 h. Los cortes fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo antes de ser examinados por microscopia electrónica de transmisión en el microscopio Jeol JEM-1011.

#### **6.10. TRATAMIENTO CON BLOQUEADORES ESPECÍFICOS DE ATPasas DE CALCIO DEL TIPO DE SERCA**

Trofozoítos de *E. histolytica* e *E. invadens* crecidos en medio TYI o de *E. invadens* en el medio de enquistamiento se incubaron en presencia de Tapsigargina 50 nm (TG) (Sigma) o con ácido ciclopiazónico (CPA) (Sigma) a diferentes concentraciones disueltos en Dimetilsulfoxido (DMSO) durante diferentes tiempos. Como control de vehículo, los trofozoítos se incubaron solo en presencia de DMSO.

Para las curvas de viabilidad los trofozoítos no tratados o los trofozoítos tratados durante 24, 48 y 72 h con DMSO, CPA y TG, se enfriaron en hielo y se centrifugaron a 360 x g por 7 min a 4 °C. Una vez empastillados los trofozoítos se contaron en una cámara de Neubauer y la viabilidad se determinó utilizando la técnica de exclusión de azul de tripano. Para los ensayos de virulencia *in vitro* de *E. histolytica* los trofozoítos se incubaron con las drogas 5, 10 y 15 min antes de realizar dichos ensayos.

Para analizar el efecto de los bloqueadores en el enquistamiento, los trofozoítos se incubaron en medio LG, como se menciona anteriormente, dividiéndose en cuatro muestras, amibas sin tratar, amibas tratadas con DMSO (control del vehículo), amibas tratadas con TG y amibas tratadas con CPA. Después de 72 h los quistes formados en cada condición se contaron en una cámara de Neubauer.

### **6. 11. CULTIVO DE CÉLULAS MDCK**

Las células de la línea MDCK (células de riñón de perro Madin-Darby) se cultivaron en medio de Eagle, suplementado con 10% de suero de ternera y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 U/ml). Las células se sembraron a altas densidades en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Falcon) y en multicámaras Linbro (Linbro) y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> y aire (5:95%). Las células se utilizaron cuando las monocapas presentaron confluencia.

### **6.12. EFECTO CITOPÁTICO**

Para medir el efecto citopático sobre las células en cultivo, los trofozoítos se ajustaron a una concentración  $1 \times 10^5$  trofozoítos/ml en medio TYI sin suero. Después, monocapas celulares de la línea MDCK cultivadas en multicámaras Linbro se incubaron durante 1 h a 37°C con 1 ml de la suspensión de trofozoítos sin tratar o tratados con CPA disuelto en DMSO o solo con DMSO. Al término de este tiempo, las multicámaras se incubaron durante 10 min a 4°C para despegar las amibas. Las multicámaras se lavaron tres veces con PBS y se determinó la destrucción de la monocapa. Para ello, las células aun presentes en las multicámaras se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en PBS, se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron durante 10 min con azul de metileno al 0.1% con solución amortiguadora de boratos 0.1 M (pH

8.7). Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces con PBS, el colorante absorbido por las células fue extraído con 1 ml de HCl 0.1 M y la absorbancia se leyó a 660 nm. El 100% de destrucción se tomó de los valores registrados de las monocapas que estuvieron en contacto con los trofozoítos tratados con el vehículo (DMSO), mientras que el 0% se tomó de las capas que no estuvieron en contacto con los trofozoítos.

### **6.13. ERITROFAGOCITOSIS**

Los trofozoítos de *E. histolytica* se ajustarán a  $1 \times 10^6$  trofozoítos/ml en medio TYI sin suero. Después, 0.4 ml de esta suspensión se incubaron con 0.4 ml de una suspensión de eritrocitos humanos ( $1 \times 10^8$  eritrocitos/ml) durante 5, 10 y 15 min a 37°C. Al término de cada tiempo se agregaron 10 ml de agua bidestilada y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente para lisar los eritrocitos no ingeridos. Los trofozoítos se recuperaron por centrifugación durante 5 min a 360 x g y el sobrenadante se desechó. Una vez que se tenía la pastilla se agregó 1 ml de ácido fórmico (Sigma). Finalmente las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a una absorbancia de 400nm, longitud de onda a la cual se detecta el grupo hemo de los eritrocitos.

## 7. RESULTADOS

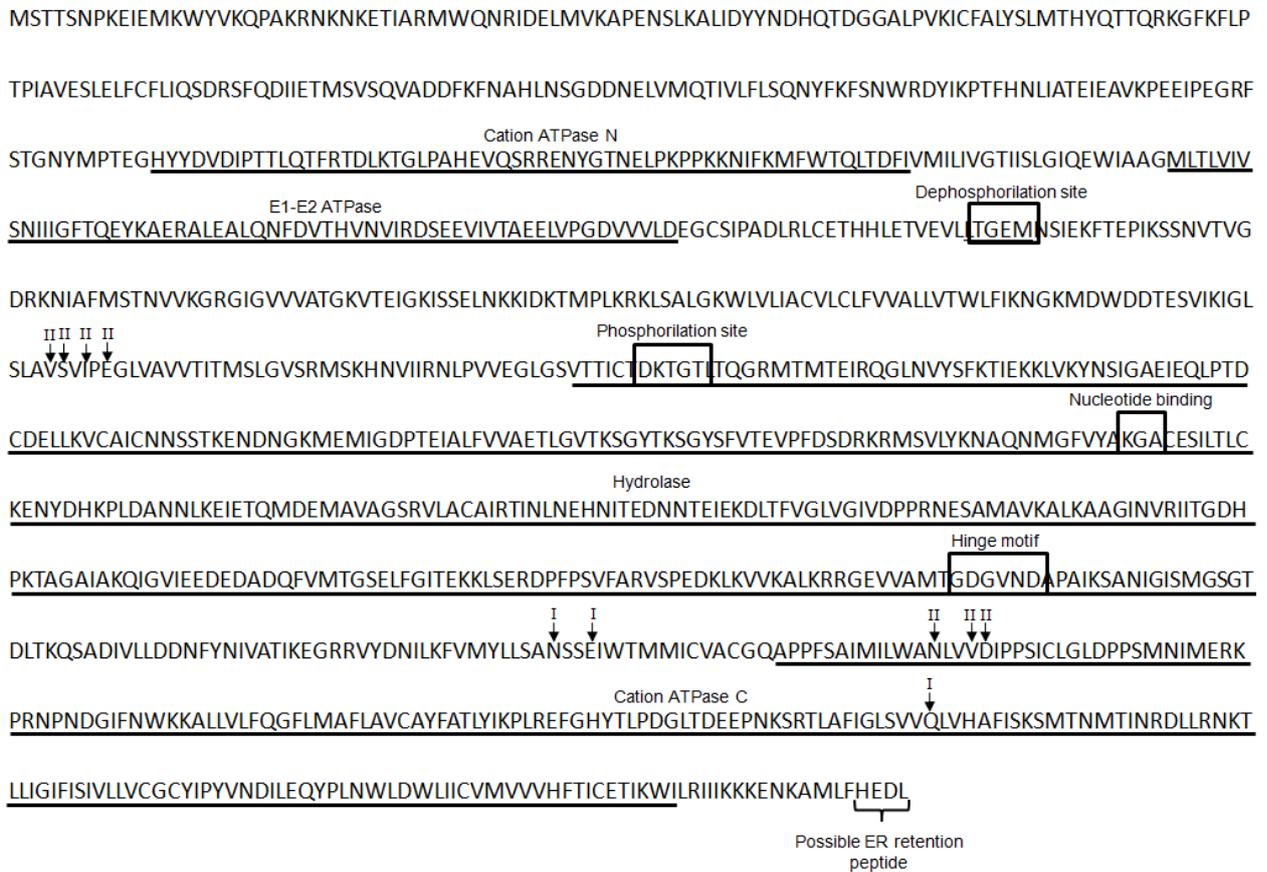
### 7.1 IDENTIFICACIÓN *IN SILICO* DE *Ei*SERCA

La ATPasa de calcio del tipo SERCA está involucrada en diversos procesos celulares, incluyendo motilidad, diferenciación, contracción, transcripción, etc. (Papp *et al.*, 2004). En trofozoítos parásitos la inhibición de esta bomba por fármacos específicos tiene como resultado la alteración de diversos procesos biológicos como en el ciclo de vida de *Giardia lamblia* and *Eimeria tenella* (Reiner *et al.*, 2003, del Cacho *et al.*, 2010).

Anteriormente identificamos la presencia de una ATPasa de calcio del tipo de SERCA en *E. histolytica* (Martinez-Higuera, 2010), la cual mediante su función de regular la concentración citoplasmática de calcio, podría participar en diversos procesos celulares del parásito, incluyendo la virulencia y ciclo de vida. Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado el papel de SERCA en la biología de este parásito. Por otra parte, al día de hoy no se ha logrado inducir el enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica*. Por esta razón es que se utiliza a *E. invadens* para estudiar el proceso de enquistamiento, ya que en esta especie del género *Entamoeba* se ha logrado inducir el enquistamiento en condiciones *in vitro* de manera satisfactoria (Avron *et al.*, 1986; Bailey & Rengypian, 1980; Vázquez de Lara-Cisneros & Arroyo-Begovich, 1984), por lo tanto este parásito de reptiles nos resulta útil para estudiar el papel de la bomba SERCA en el enquistamiento de *Entamoeba*.

Primero para identificar a la proteína SERCA en *E. invadens* se llevó a cabo un BLAST en la base de datos del genoma de este parásito (<http://www.amoebadb.org>), usando la secuencia de EhSERCA como sonda. Mediante esta estrategia logramos encontrar seis proteínas que podrían codificar para ATPasas de calcio (EIN\_498880,

EIN\_406410, EIN\_376430, EIN\_170510, EIN\_409700, EIN\_081777). En particular la secuencia EIN\_081770 consta de 1137 aminoácidos y muestra una identidad del 72% y una homología del 84% con a EhSERCA. Además este polipéptido contiene diversos dominios que resultan indispensables para la actividad de una ATPasa de calcio, los dominios de fosforilación y de defosforilación, el sitio de unión el nucleótido y el dominio Hinge, los dominios de catión ATPasa N y C, el dominio E1-E2 y el dominio de hidrolasa (Fig. 2). Además esta proteína contiene la mayoría de los aminoácidos de los motivos I y II de unión a calcio presentes en SERCA de mamíferos (Fig. 2). Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que esta proteína codifica para una ATPasa del tipo de SERCA en *E. invadens* (EiSERCA). Interesantemente, este polipéptido presenta en el carboxilo terminal la secuencia HEDL (Fig. 2), la cual es similar a la secuencia de retención para retículo endoplásmico de *S. cerevisiae* (HDEL) y a la secuencia encontrada en el carboxilo terminal de EhSERCA, sugiriendo que el polipéptido EIN\_081770 se localiza en el retículo endoplásmico del parásito y consecuentemente que se trata de una ATPasa de calcio del tipo de SERCA.



**Figura 2.- Caracterización *in silico* de EiSERCA.** El alineamiento de EiSERCA con SERCA 1a de *Oryctolagus cuniculus* nos permitió identificar los dominios involucrados en el transporte del calcio. Las cajas indican los dominios de fosforilación y de defosforilación, el sitio de unión del nucleótido y el dominio Hinge. Las secuencias subrayadas muestran los dominios de catión ATPasa N, el dominio E1-E2, el dominio de hidrolasa y el dominio de catión ATPasa C. Los sitios que unen calcio están marcados por flechas como I y II. En el extremo carboxilo se marca una posible secuencia de retención para retículo endoplásmico.

## 7.2 INMUNODETECCIÓN DE *Ei*SERCA

El anticuerpo anti-EhSERCA está dirigido contra una secuencia de 16 aminoácidos, localizada en la posición 959-974 (MSNIMERKPRDPNSNI) de la proteína EhSERCA (Martínez Higuera, 2010) Al analizar la secuencia de EiSERCA encontramos que el epítipo que reconoce el anticuerpo está presente en EiSERCA en la misma posición que EhSERCA (959-974), aunque con pequeñas diferencias (Fig 3A), sin embargo, aun cuando no todos los aminoácidos están conservados, el número de aminoácidos conservados son los suficientes para sugerir el reconocimiento de EiSERCA por el anticuerpo anti-EhSERCA.

Esta hipótesis se comprobó al llevar a cabo ensayos de Western blot en extractos de *E. invadens*, donde observamos el reconocimiento de una sola banda proteica de aproximadamente 115 kDa (Fig 3B). El peso molecular estimado a partir de la secuencia de aminoácidos de EiSERCA es de 127 kDa, por lo que el reconocimiento de una proteína de menor tamaño puede deberse a modificaciones postraduccionales de esta proteína, aunque no se puede descartar una degradación parcial ocasionada durante el proceso de extracción de proteínas. Interesantemente, EhSERCA también tiene un peso molecular estimado de 127 kDa, pero el anticuerpo en su contra reconoce un polipéptido de 115 kDa (Martínez Higuera, 2010), sugiriendo una modificación postraduccional similar en EhSERCA y EiSERCA.

## 7.3 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE *Eh*SERCA Y *Ei*SERCA

En ensayos anteriores de inmunolocalización se observó a *Eh*SERCA en una estructura similar a red vesicular continua (Martínez Higuera, 2010). Sin embargo, era necesario confirmar la localización de estas proteínas. Para ello se realizaron ensayos de co-localización utilizando un anticuerpo contra una proteína residente de retículo

endoplásmico como es el caso de calreticulina (EhCRT) (González et al., 2011). Al realizar estos ensayos mediante microscopia confocal se encontró que *EhCRT* al igual que *EhSERCA* se localizan en una red de vesículas continuas en trofozoítos de *E. histolytica* (Fig. 4 a-d). Esta red se ha sugerido que corresponde al retículo endoplásmico de la amiba (Teixeira and Huston, 2008). Al analizar el porcentaje de co-localización, encontramos que ambas proteínas co-localizan en un 14% (Fig. 4e).

La co-localización de *EhSERCA* y *EhCRT* se comprobó mediante inmunomicroscopía electrónica, donde *EhSERCA* se encontró asociada a las membrana de algunas vesículas (Fig 5b), mientras que *EhCRT* se detectó en el interior de las mismas vesículas (Fig 5c), corroborando que la proteína de interés corresponde a una ATPasa de calcio de retículo endoplásmico (*SERCA*).

En nuestro laboratorio también obtuvimos anticuerpos contra una ATPasa de calcio de Golgi, mejor conocida como *PMR1* o *SPCA* (*EhPMR1*). Al no haber orgánulos definidos en *E. histolytica* nos preguntamos si las vesículas que contiene a *EhSERCA* (retículo endoplásmico) contienen también a *EhPMR1* y funcionar a la vez como aparato de Golgi, o bien si esas ATPasas tienen una localización diferente. Al realizar los ensayos de colocalización mediante inmunomicroscopia electrónica encontramos que las dos ATPasas de *E. histolytica* no están presentes en las mismas vesículas (Fig 6c). Estos resultados indican que ambas proteínas se localizan en sistemas vesiculares independientes que llevan a cabo funciones diferentes. Estos resultados sugieren que *EhSERCA* y *EhPMR1* podrían ser utilizados como marcadores de retículo endoplásmico y de Golgi, respectivamente en *E. histolytica*.

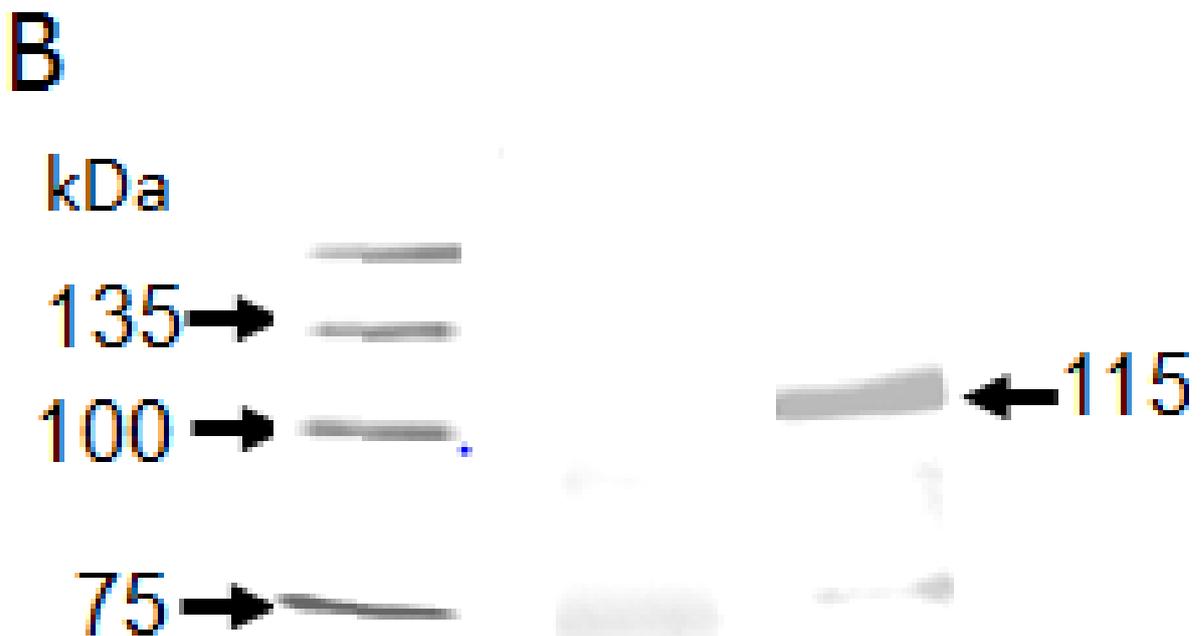
Por otra parte, los ensayos de inmunofluorescencia en trofozoítos de *E. invadens* utilizando los anticuerpos anti-*EhSERCA*, mostraron que la distribución celular de *EiSERCA* es similar a la encontrada para *EhSERCA* en *E. histolytica*, ya que

también se localizó en estructuras del tipo vesicular y co-localiza con calreticulina (Figura 7), sugiriendo fuertemente que la proteína EiSERCA también se localiza en el retículo endoplásmico de *E. invadens*.

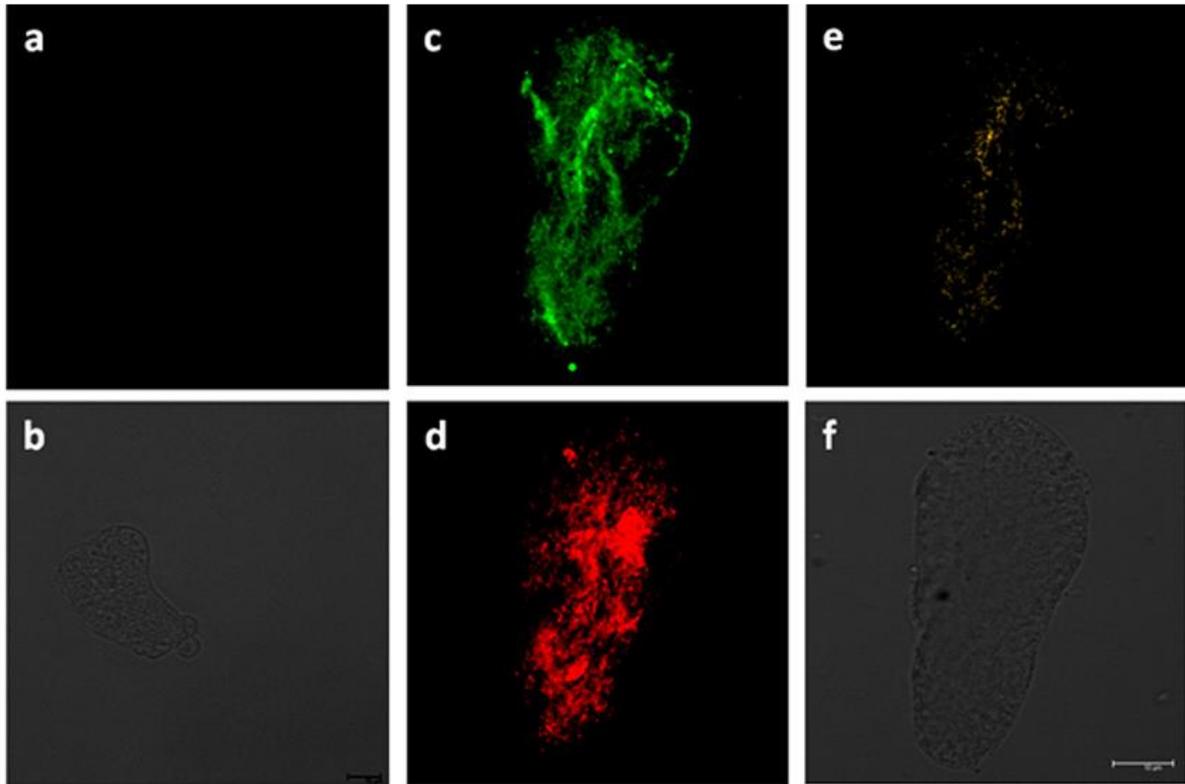
**A**

*E. invadens* 960 MNIMERKPRNPNDGI 974

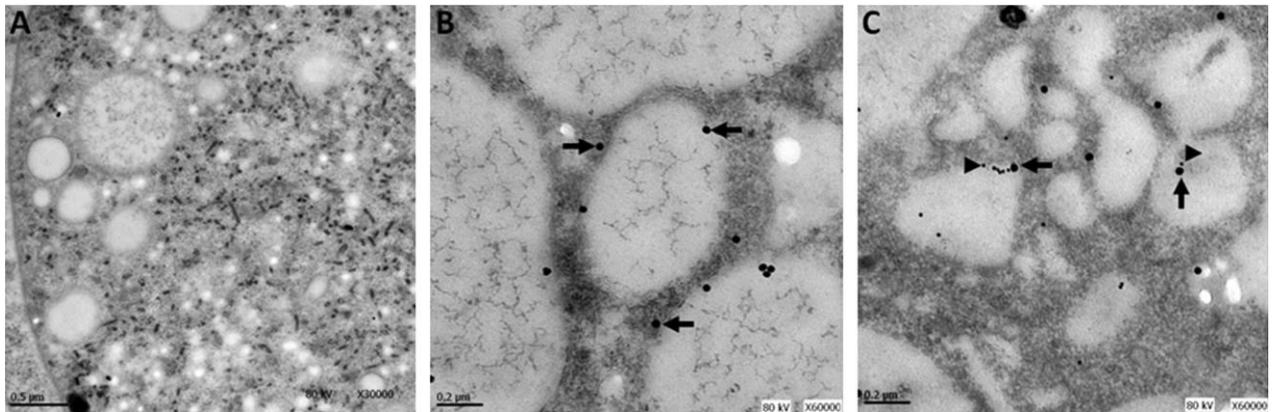
*E. histolytica* SNIMERKPRDPNSNI



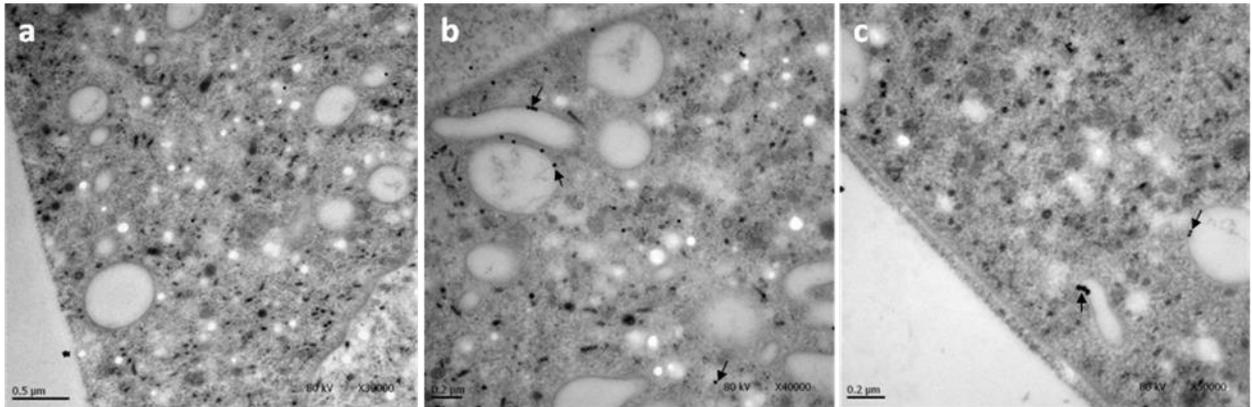
**Figura 3.- Inmunodetección de EiSERCA.** A. Identificación del epítipo reconocido por el anticuerpo anti EhSERCA en EiSERCA. La secuencia del péptido de EhSERCA que fue utilizado para obtener anticuerpos específicos se alineó con EiSERCA. Los números indican la posición del péptido en las proteínas. B. Western blot. Extractos proteicos de trofozoítos *E. invadens* fueron separados por SDS-PAGE y después transferidos a nitrocelulosa, para posteriormente ser incubadas con suero preinmune o con el anticuerpo anti-EhSERCA y con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. Finalmente, el reconocimiento del anticuerpo fue revelado mediante quimioluminiscencia. Línea 1, suero preinmune. Línea 2 anti EhSERCA.



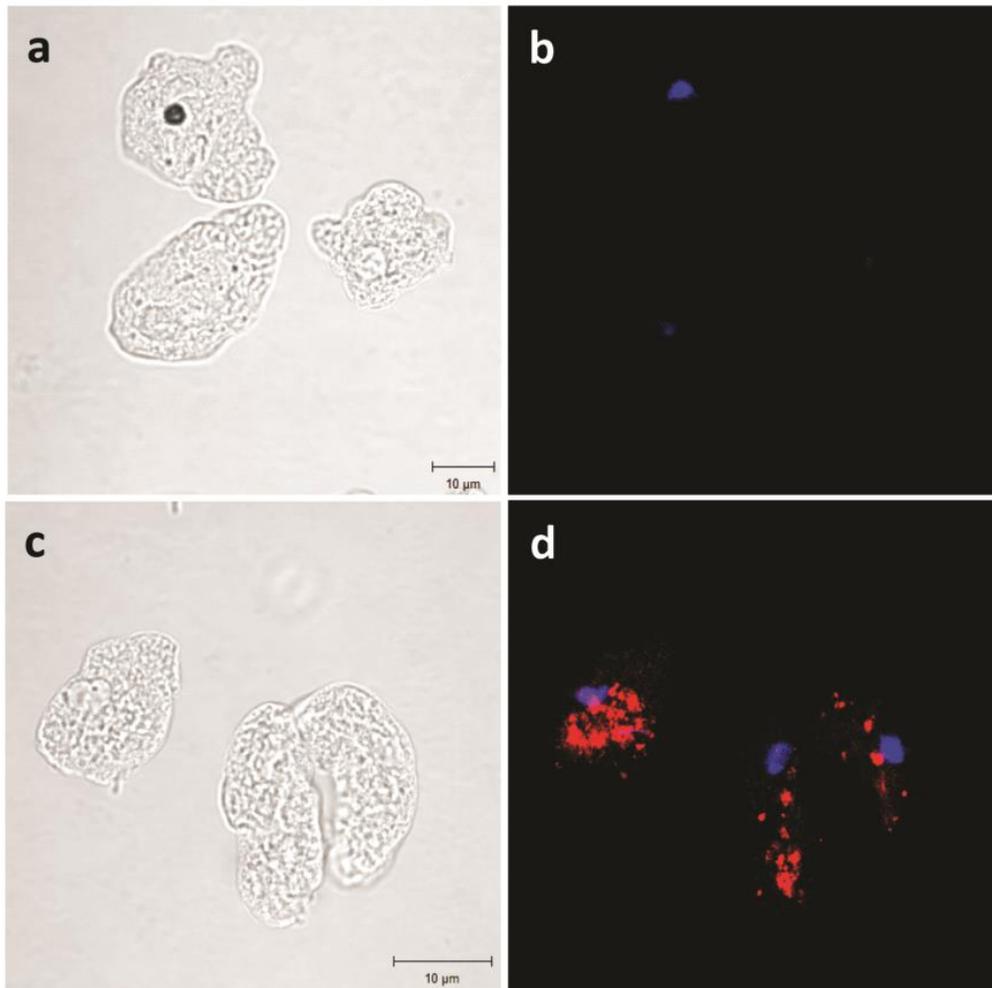
**Figura 4.- Localización subcelular de EhSERCA mediante microscopia confocal.** Trofozoítos de *E. histolytica* fueron fijados, permeabilizados e incubados con anticuerpos de conejo contra EhSERCA y anticuerpos de ratón contra EhCRT. Después, se incubaron con anticuerpos secundarios anti IgG de conejo acoplados a fluoresceína (verde) y anti-IgG de ratón acoplados a rodamina. Finalmente, las muestras fueron observadas mediante microscopia confocal. a. Control negativo usando suero preimmune. b. Contraste de fase del control. c. Canal verde mostrando la localización de EhSERCA. d. Canal rojo mostrando la localización de calreticulina. e. Co-localización. f. Contraste de fase de la co-localización.



**Figura 5.- Localización de EhSERCA por inmunomicroscopía electrónica.** Cortes de trofozoítos fueron incubados con anticuerpos anti-EhSERCA y anti-EhCRT después se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, mismos que se encontraban acoplados a partículas de oro de diferente tamaño: 30nm para anti-conejo (para localizar EhSERCA) y 15nm (para localizar EhCRT). Las muestras fueron analizadas por microscopia electrónica de transmisión. A. Control sin anticuerpo primario. B. Inmunomarcaje de EhSERCA. C. Inmunomarcaje de EhSERCA y EhCRT. Las flechas indican la localización de EhSERCA, mientras que las cabezas de flecha indican la localización de EhCRT.



**Figura 6.- Localización de EhSERCA con EhPMR1 por inmunomicroscopía electrónica.** Cortes de trofozoítos fueron incubados con anticuerpos anti-EhSERCA y anti-EhPMR1 después se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, mismos que se encontraban acoplados a partículas de oro de diferente tamaño: 30nm para anti-conejo (para localizar EhSERCA) y 15nm para anti-ratón (para localizar EhPMR1). Las muestras fueron analizadas por microscopia electrónica de transmisión. a. Control sin anticuerpo primario. b. Inmunomarcaje de EhPMR1. c. Inmunomarcaje de EhSERCA y EhPMR1. Las flechas indican la localización de EhSERCA, mientras que las cabezas de flecha indican la localización de EhPMR1.



**Figura 7.- Localización subcelular de EiSERCA.** Trofozoítos de *E. invadens* fueron fijados, permeabilizados e incubados con anticuerpos anti EhSERCA, posteriormente, se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a rodamina. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Finalmente las células fueron analizadas mediante microscopia confocal. a, b. Trofozoítos incubados solamente con anticuerpo secundario. c, d. anticuerpos incubados con anti EhSERCA y anticuerpo secundario.

#### **7.4 EFECTO DEL ÁCIDO CICLOPIAZONICO EN LA VIRULENCIA *IN VITRO* DE *E. histolytica***

En el trabajo desarrollado durante la maestría tratamos trofozoítos de *E. histolytica* con Tapsigargina (TG), un inhibidor específico de SERCA y encontramos que este fármaco es capaz de alterar la virulencia *in vitro* por parte del parásito, pero solo de manera temporal (Martínez Higuera, 2010). Al analizar en EhSERCA la presencia de los aminoácidos donde se une TG a la SERCA de mamíferos (mejor conocido como binding pocket o bolsillo de unión) (Arnou *et al*, 2011; Kotšubei *et al* 2013), notamos que no todos los aminoácidos involucrados se encuentran conservados. Por esta razón se optó por utilizar otro fármaco que inhibiera a SERCA de forma específica. El ácido ciclopiazonico (CPA) es un ácido indol tetramérico producido por *Penicillium cyclopium* y *Aspergillus flavus* que al igual que TG es capaz de inhibir específicamente a SERCA mediante la unión del fármaco con la bomba en su conformación libre de calcio llamada (E2) (Laporte *et al*, 2004). Al analizar el bolsillo de unión para CPA en EhSERCA encontramos que la mayoría de los aminoácidos que forman este bolsillo de unión se encuentran conservados y unos pocos son cambiados, sin embargo, esos cambios son por aminoácidos del mismo grupo de los residuos (Tabla 1), sugiriendo una mayor afinidad de CPA a EhSERCA, en comparación con TG. Este hallazgo sugería que podríamos analizar mejor el papel de EhSERCA en la virulencia del parásito al bloquear su función con CPA.

Antes de llevar a cabo los ensayos de virulencia, fue necesario realizar curvas de viabilidad de los trofozoítos en presencia del fármaco. En esos ensayos se encontró que CPA provoca la muerte en los trofozoítos sólo cuando se utiliza una concentración elevada del mismo (60  $\mu$ m), mientras que todas las demás concentraciones probadas

que están por debajo de ésta (0.5, 1 y 10  $\mu\text{m}$ ) no causaron daño alguno en la viabilidad de los trofozoítos (Fig. 8A).

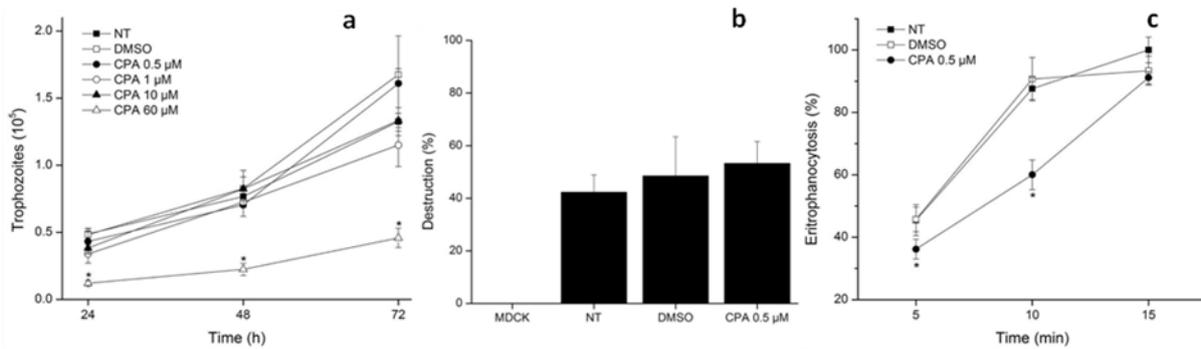
Posteriormente, para conocer el efecto de CPA sobre la fagocitosis de *E. histolytica*, se analizó la capacidad de los trofozoítos tratados con CPA (0.5 $\mu\text{m}$ ) para ingerir eritrocitos humanos. En estos experimentos se halló que la eritrofagocitosis a los 5 y 10 min es menor a la obtenida en los controles, donde a los 10 min de fagocitosis observamos el mayor grado de inhibición. Sin embargo, a los 15 min de fagocitosis parece haber un efecto de recuperación en la que ya no se puede apreciar diferencia significativa entre los trofozoítos tratados y los controles (Fig. 8B). Esto sugiere que el flujo de calcio mediado por EhSERCA tiene un papel importante durante los tiempos iniciales de la fagocitosis, pero posteriormente, el desbalance de calcio causado por el bloqueo de esta bomba puede ser regulado por otras proteínas implicadas en controlar la concentración citoplasmática del ion.

Por otra parte, al analizar la destrucción de monocapas de células MDCK por los trofozoítos tratados con CPA, se encontró que no hay diferencia significativa entre trofozoítos tratados y no tratados (Fig. 8C). En este tipo de ensayos, la interacción de los trofozoítos con las células blanco se realizó durante 2 h, por lo que si el papel de EhSERCA en esta actividad es solo en tiempos tempranos, similar a lo sugerido para la fagocitosis, este no pudo ser detectado.

Tabla 1.- Análisis de los aminoácidos del bolsillo de unión para CPA en EhSERCA.

CPA binding pocket	
<b>SERCA1a</b> <b>(rabbit)</b>	<b>EiSERCA</b> <b>(<i>E. histolytica</i>)</b>
Q56	<b>Q257</b>
F57	<u>I258</u>
D59	<b>D260</b>
L61	<u>I262</u>
V62	<b>V263</b>
L65	<b>L266</b>
L98	<u>I289</u>
N101	<b>N292</b>
L253	<b>L440</b>
F256	<u>L443</u>
G257	<b>G444</b>
I307	<b>I493</b>
P308	<b>P494</b>
P312	<b>V498</b>

Los aminoácidos conservados se muestran en negritas y los cambios conservados se encuentran subrayados.



**Figura 8.- Efecto de CPA en la viabilidad y virulencia *in vitro* en trofozoítos de *E. histolytica*.** a. Efecto de CPA en la viabilidad. Trofozoítos de *E. histolytica* fueron tratados con diferentes concentraciones de ácido ciclopiazónico. La viabilidad de los trofozoítos fue determinada después de las 24, 48 y 72 h utilizando la técnica de exclusión de azul de tripano. Para todos los experimentos se utilizó DMSO como control del vehículo. b. Efecto de CPA en la destrucción de monocapas celulares. Trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron con CPA durante 5 min. Entonces, los trofozoítos se lavaron para eliminar el fármaco y se realizaron los ensayos de efecto citopático sobre monocapas de la línea MDCK. Como 0% de destrucción se utilizó el valor obtenido de las monocapas de células MDCK que no estuvieron en contacto con trofozoítos. c. Efecto de CPA en la fagocitosis. Trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron con CPA durante 5 min. Los trofozoítos se lavaron para eliminar la droga y se realizaron los ensayos de fagocitosis de eritrocitos humanos. Los eritrocitos fagocitados en el grupo control se tomó como el 100% de eficiencia. Los resultados se indican como el promedio de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado  $\pm$  desviación estándar. Los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control ( $P < 0.05$ ).

## **7.5 LOCALIZACIÓN DE EiSERCA DURANTE EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens***

Para analizar el papel de EiSERCA en el proceso de enquistamiento de *E. invadens*, primero analizamos si la localización de esta ATPasa sufría algún cambio durante este proceso de diferenciación. Para ello, trofozoítos de *E. invadens* fueron inducidos al proceso de enquistamiento en medio LG y llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta a diferentes tiempos de inducción (12, 24, 48 y 72 h). Al analizar las laminillas encontramos que EiSERCA se relocaliza a la membrana plasmática de los trofozoítos (Fig. 9). Esta relocalización se observó en todos los tiempos de inducción por lo que solo se muestra la localización de EiSERCA a las 24 y 72 h (Fig 10), sin embargo, es remarcable la diferencia en la localización de la bomba entre el trofozoito y quiste (Fig. 9), esta redistribución sugiere que el transporte de calcio por la bomba es importante en el proceso de enquistamiento.

## **7.6 EFECTO DE TG Y CPA EN EL PROCESO DE ENQUISTAMIENTO**

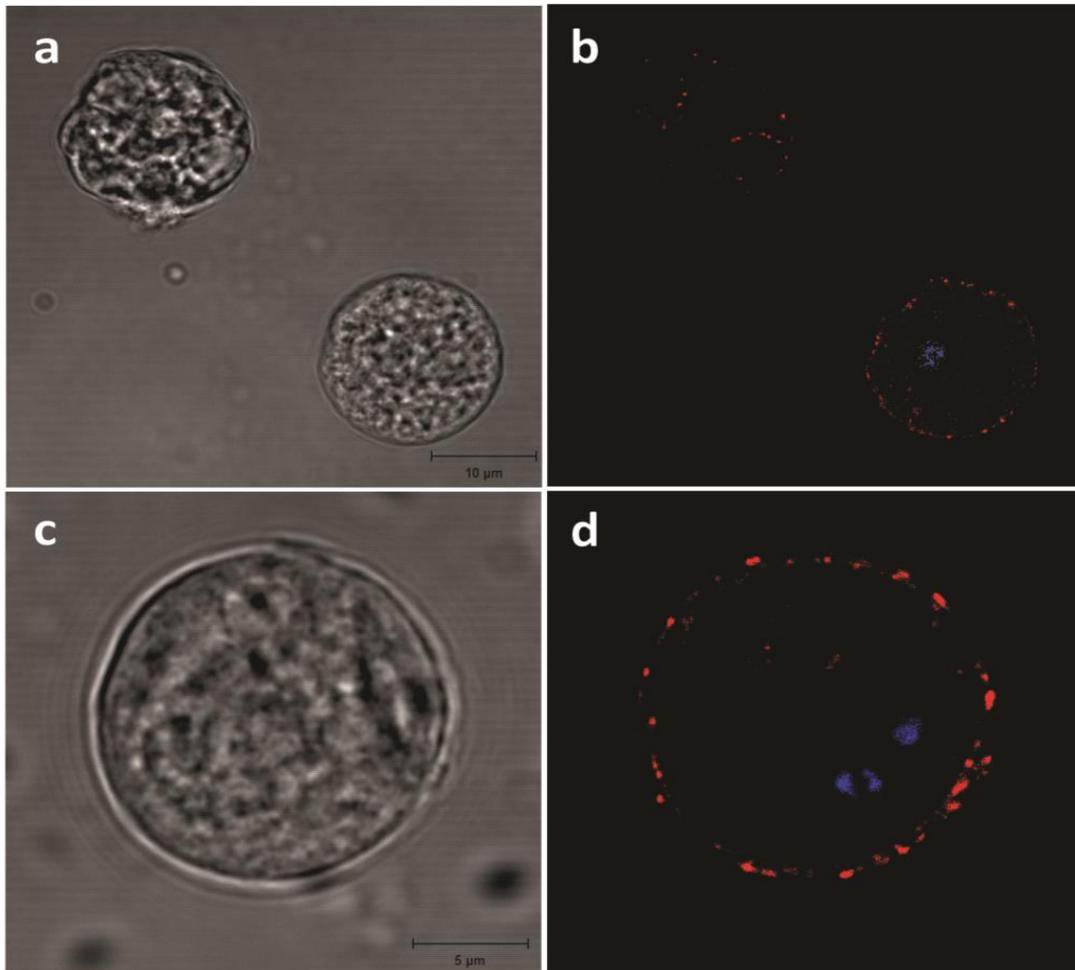
Reportes previos indican que el calcio juega un papel importante en el enquistamiento de *E. invadens* (Makioka *et al.*, 2001, Makioka *et al.*, 2002) sin embargo, no se sabe aún cuales son las proteínas involucradas en el flujo de calcio durante este proceso. Después de un incremento de la concentración citoplasmática de calcio la proteína SERCA tiene como función capturar o introducir parte del calcio excedente del citoplasma al retículo endoplásmico, el cual es el almacén más grande de este ion en la célula. Por lo tanto, es posible que el bloqueo de EiSERCA por fármacos específicos de cómo resultado una desregulación de la homeostasis del ion, provocando que procesos dependientes de calcio como el enquistamiento se vean afectados. TG y CPA son inhibidores que muestran una gran especificidad y un gran

poder de inhibición sobre SERCA (Michelangeli & East, 2011). Es por esto que el utilizar ambos inhibidores en el proceso de enquistamiento nos ayudará a dilucidar la importancia de esta bomba de calcio en este evento. Con el fin de determinar si los inhibidores podrían unirse a EiSERCA se empezó analizando si esta proteína posee los aminoácidos que forman el bolsillo de unión a los fármacos, los cuales han sido descritos para la SERCA de mamíferos (Arnou *et al*, 2011; Kotšubei *et al* 2013). En el caso del bolsillo de unión de TG encontramos que de los 18 que lo conforman, solo 3 se encuentran conservados, mientras que 8 muestran cambios conservados (Tabla 2). Por otro lado en el caso de CPA el bolsillo se compone de 14 aminoácidos, de estos, 9 se encuentran conservados, mientras que los restantes 5 muestran cambios conservados (Tabla 2). Estos resultados sugieren que EiSERCA podría unir ambos fármacos, aunque posiblemente TG tenga una afinidad baja por la enzima.

Posteriormente, para estudiar el papel de EiSERCA durante el enquistamiento se utilizaron TG y CPA, sin embargo, primero fue necesario llevar a cabo una curva de viabilidad de los trofozoítos, con la finalidad de conocer si las concentraciones a utilizar tendrían un efecto adverso en los trofozoítos. En estos ensayos se observó que ninguna de las concentraciones del TG utilizadas provocaron daño alguno en la viabilidad de los trofozoítos (Fig. 10A), aun en concentraciones 10 veces más altas a las utilizadas en células de mamífero. Tampoco se observó efecto en la viabilidad de los trofozoítos cuando estos se incubaron con DMSO, el cual se utilizó como vehículo para el fármaco (Fig. 10A). Por el otro lado al probar el efecto de CPA se encontró que sólo la concentración más alta (60  $\mu$ m) es capaz de alterar la viabilidad (Fig. 10B) Una vez que se determinaron las concentraciones de las drogas que no afectan la viabilidad de los trofozoítos, se procedió a realizar los ensayos de enquistamiento en presencia de los fármacos. Los resultados obtenidos muestran que EiSERCA participa en el

proceso de enquistamiento, ya que al utilizar TG se encontró que el enquistamiento se inhibe en aproximadamente 50% (Fig. 11A). En el caso de CPA se observó que la inhibición del enquistamiento es dependiente de dosis, donde la concentración más baja (0.5  $\mu\text{m}$ ) mostró un efecto de inhibición del enquistamiento en aproximadamente 50%, mientras que en la concentración más elevada que no causa muerte en los trofozoítos (10  $\mu\text{m}$ ), la inhibición del enquistamiento fue del 95% (Fig. 11B).

Cuando observamos que el número de quistes disminuía por el efecto de los inhibidores, nos preguntamos si los pocos quistes formados en estas condiciones tenían una estructura normal. Para contestar esta pregunta las muestras no tratadas y las tratadas con DMSO, TG y CPA fueron examinadas mediante microscopía electrónica de transmisión. En estos experimentos encontramos que los quistes obtenidos en los controles (sin tratamiento e incubados con DMSO) presentaban una estructura esférica con abundantes vesículas citoplasmáticas (Fig. 12a, b). En contraste los quistes obtenidos después del tratamiento con los inhibidores de SERCA, aunque presentan una pared en su superficie, mostraron una estructura amorfa y un número menor de vesículas citoplasmáticas (Fig. 12c). Estos resultados indican que la inhibición de la bomba de calcio SERCA con bloqueadores específicos tiene como resultado una disminución en el número de quistes formados, además de una formación anómala del los mismos.

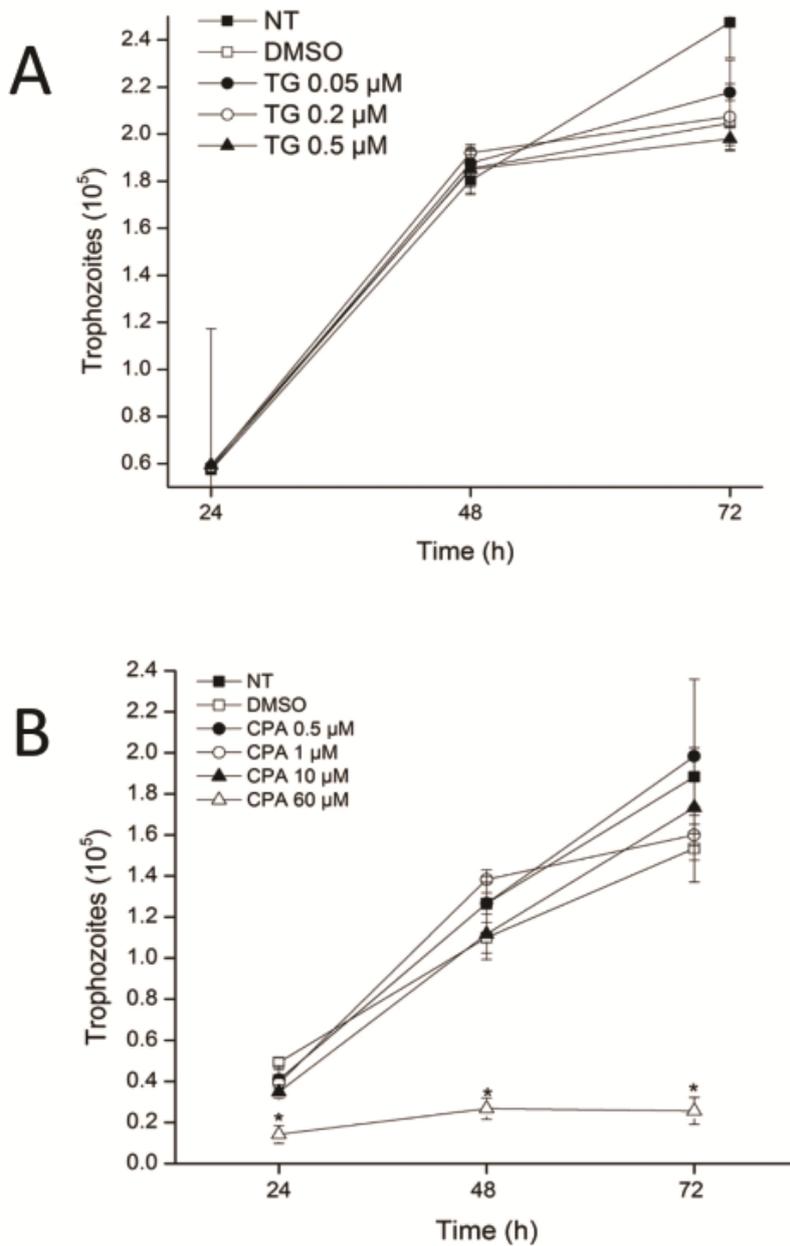


**Figura 9.- Localización subcelular de EiSERCA durante el enquistamiento.** Trofozoítos de *E. invadens* fueron sometidos a enquistamiento en medio LG a diferentes tiempos se tomaron muestras que fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con el anticuerpo anti-EhSERCA, después, con un anticuerpo secundario acoplado a rodamina (rojo). Posteriormente, se tiñeron núcleos con DAPI (azul) y las células se observaron por microscopia confocal. a, b. 24 h de enquistamiento. c, d. 72 h de enquistamiento. a, c. Contraste de fases. b, d. Inmunofluorescencia.

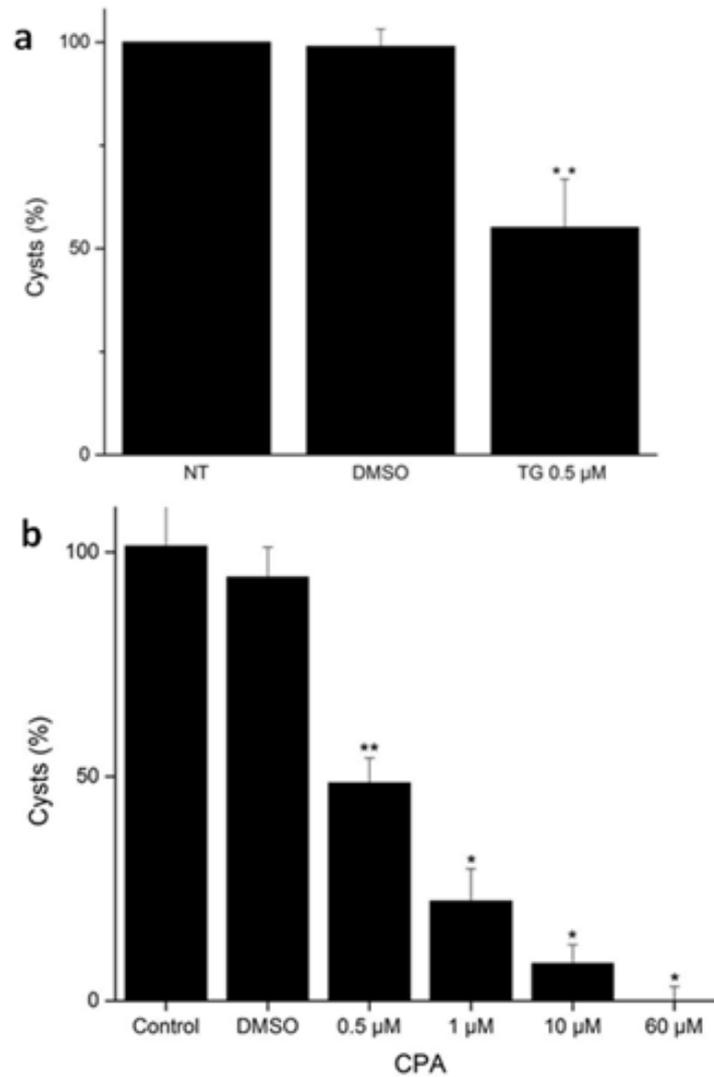
**Tabla 2.- Análisis de los aminoácidos del bolsillo de unión para TG y CPA en EiSERCA.**

TG binding pocket		CPA binding pocket	
SERCA1a (rabbit)	EiSERCA ( <i>E. invadens</i> )	SERCA1a (rabbit)	EiSERCA ( <i>E. invadens</i> )
L253	L440	Q56	Q257
E255	A442	F57	<u>L258</u>
F256	<u>L443</u>	D59	<b>D260</b>
Q259	W446	L61	<u>I262</u>
L260	<b>L447</b>	V62	<b>V263</b>
V263	<u>I450</u>	L65	<b>L266</b>
I267	<u>L454</u>	L98	<u>I289</u>
A306	V492	N101	<b>N292</b>
I765	<u>L911</u>	L253	<b>L440</b>
N768	<b>N914</b>	F256	<u>L443</u>
V769	S915	G257	<b>G444</b>
V772	<u>I918</u>	I307	<b>I493</b>
F776	<u>M922</u>	P308	<b>P494</b>
L828	<u>I974</u>	P312	V498
I829	<u>F975</u>		
F834	A980		
Y837	L983		
M838	V984		

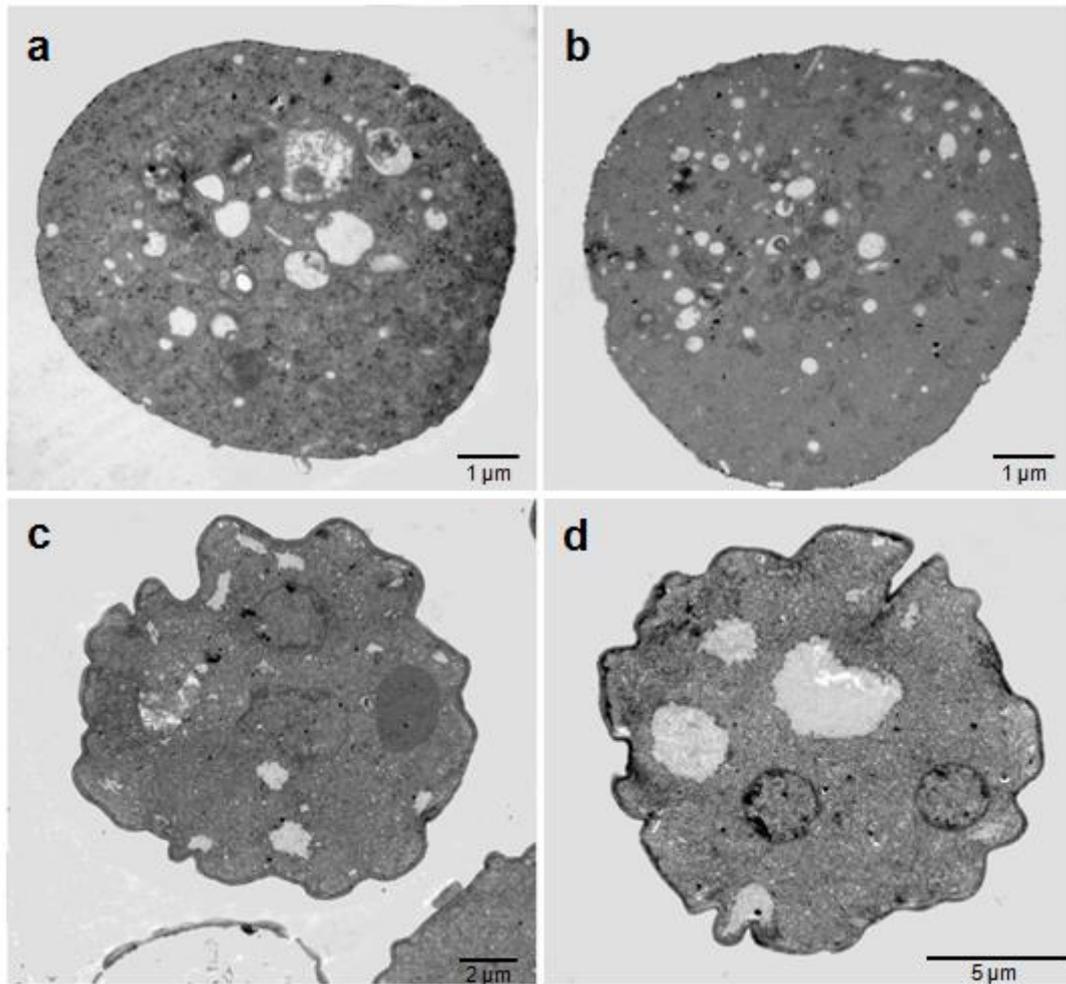
Los aminoácidos conservados se indican en negritas y los cambios conservados se encuentran subrayados.



**Figura 10.- Efecto de Tapsigargina y ácido ciclopiazónico en la viabilidad de *E. invadens*.** Trofozoitos de *E. invadens* fueron tratados con diferentes concentraciones de Tapsigargina o ácido ciclopiazónico. La viabilidad y el número de trofozoitos fue determinada después de 24, 48 y 72 h utilizando la técnica de exclusión de azul de tripano. Para todos los experimentos se utilizó DMSO como control del vehículo. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican una diferencia significativa ( $P < 0.005$ ).



**Figura 11.- Efecto de Tapsigargina y ácido ciclopiazónico en el enquistamiento de *E. invadens*.** Trofozoítos de *E. invadens* fueron inducidos al proceso de enquistamiento en presencia de TG 0.5 μm (a) o a diferentes concentraciones de ácido ciclopiazónico (b). Después el porcentaje de quistes formados se determinaron después de la 24 h. Para todos los experimentos se utilizó DMSO como control del vehículo. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican una diferencia significativa (P <0.005).



**Figura 12.- Análisis estructural de los quistes formados en presencia de TG o CPA.** Trofozoítos de *E. invadens* fueron inducidos al enquistamiento por 72 h, en ausencia de la droga (control), en presencia de DMSO (vehículo) o 0.5 µm de los inhibidores de SERCA. Posteriormente las muestras fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión. a. control. b. DMSO. c. TG. d. CPA.

## 8. DISCUSION

El ion calcio es una molécula de señalización importante considerada como un segundo mensajero (Moreno & Docampo; 2003), este ión es utilizado por las células eucariotas y controla diversas funciones celulares entre las cuales se encuentran la contracción muscular, división celular, diferenciación, transcripción de genes, secreción de hormonas y permeabilidad a los iones sodio y potasio (Meza *et al.*, 2006; Welling, 2009).

Diversos son los trabajos que muestran la importancia del calcio en la amiba. Se ha demostrado que el ion está involucrado en el crecimiento y la virulencia *in vitro* de *E. histolytica* (Ravdin & Guerrant, 1981, Ravdin *et al.*, 1980, Ravdin *et al.*, 1985, Carbajal *et al.*, 1996, Makioka *et al.*, 2001, Jain *et al.*, 2008). Además, el utilizar antagonistas del calcio e inhibidores de calmodulina, tiene como resultado una alteración del enquistamiento en *E. invadens*, lo cual nos indica que el ion no solo es importante en la virulencia amibiana, sino también en el ciclo de vida del parasito (Makioka *et al.*, 2001, Makioka *et al.*, 2002).

Poco se sabe sobre las proteínas que están involucradas en la regulación del ion calcio en *E. histolytica*. Es por esto que en nuestro trabajo de maestría (Martínez-Higuera, 2010) nos abocamos a buscar proteínas que participaran de manera directa en la regulación del ion. Mediante análisis *in silico* fue posible encontrar una proteína que podría funcionar como una SERCA en *E. histolytica* (EhSERCA) (Martínez-Higuera, 2010).

La ATPasa de calcio del tipo de SERCA ha sido identificada en otros protozoarios parásitos. En *Trichomonas vaginalis* se identifico un gen que codifica para una proteína que contiene los diferentes dominios funcionales de una SERCA típica (TVCA1) (Meade *et al.*, 1997), sin embargo, no se ha descrito la localización subcelular

ni la función de dicha proteína en la biología del parásito. En *Leishmania amazonensis* también se reportó un gen que codifica para una ATPasa de calcio del tipo de SERCA (Lmmaa1). Cuando esta bomba se sobreexpresó en *L. amazonensis*, se observó un aumento en la virulencia del parásito, lo que muestra una importante relación entre la expresión de SERCA, la regulación de calcio, señalización y virulencia (Rodríguez et al., 2002). La SERCA de *Plasmodium falciparum* (PfATP6) es la ATPasa de calcio más estudiada en protozoarios parásitos, esto debido a que se ha postulado a esta proteína como un importante blanco terapéutico contra la malaria (Eckstein-Ludwig et al., 2003). Estos hallazgos indican que el flujo de calcio mediado por bombas de calcio del tipo de SERCA es importante para la biología de protozoarios parásitos y por lo tanto, sugieren que en *Entamoeba* SERCA también podría tener un papel importante en la virulencia o en su ciclo de vida.

Al estudiar las secuencias de EhSERCA y EiSERCA encontramos que estas proteínas contenían los dominios necesarios para llevar a cabo la función de una bomba de calcio. Además, estas proteínas también presentaban una posible señal de retención para retículo endoplásmico, aunque es necesario demostrar experimentalmente que estas secuencias son en realidad señal de retención en el retículo endoplásmico. De cualquier manera, los ensayos de inmunolocalización nos permitieron detectar a ambas proteínas en estructuras de tipo vesicular que en *E. histolytica* conforman un retículo endoplásmico. Sin embargo, aun resultaba necesario confirmar que esta proteína en realidad se encontraba en el retículo endoplásmico amibiano. Calreticulina es una proteína ampliamente distribuida en células eucariotas y que se encuentra en retículo endoplásmico, donde ayuda al plegamiento de proteínas y la regulación del calcio (Michalak et al, 1999). En *E. histolytica* ya se ha reportado la presencia de calreticulina (EhCRT) (Gonzales et al, 2011), la cual co-localiza con la

proteína disulfuro isomerasa de *E. histolytica* (EhPDI) (Ramos *et al*, 2011) proteína que también es residente de retículo endoplásmico. Por lo tanto la co-localización de EhSERCA con EhCRT nos confirma que la ATPasa de calcio del tipo de SERCA si se encuentra en el sistema vesicular que compone al retículo endoplásmico amibiano. Hay que mencionar que tanto el retículo endoplásmico como el aparato de Golgi en *Entamoeba* no se encuentran estructurados como en eucariontes superiores, por lo que aun cuando el retículo endoplásmico del parasito está conformado por un sistema vesicular, esto no significa que todas las vesículas presentes en los trofozoítos forman parte del retículo. De hecho, ensayos de localización de la proteína amibiana EhPMR1, que se relaciona filogenéticamente con la ATPasa de calcio presente en el aparato de Golgi de otros eucariontes (Martínez-Higuera, 2010), indican que esta proteína se encuentra también en vesículas citoplásmicas, pero EhSERCA y EhPMR1 no colocalizan, lo que sugiere que aun cuando las dos proteínas se encuentran en vesículas, estas forman parte de sistemas independientes. Estos resultados también sugieren que EhSERCA y EhPMR1 podrían ser utilizados como marcadores de retículo endoplásmico y aparato de Golgi respectivamente, en *Entamoeba*.

Conforme avanzábamos en el estudio de esta proteína más interrogantes se nos presentaban, y una de ellas era estudiar la importancia de EhSERCA en la biología del parasito, incluyendo su virulencia y su ciclo de vida. Estudiar el papel de la bomba en trofozoítos no sería problema, pero si el estudiarla en quistes, ya que en *E. histolytica* aun no se ha logrado reproducir este fenómeno de manera *in vitro*. Es por esto que se opto por buscar el análogo de SERCA en *E. invadens*, del cual se cuenta con una metodología eficiente para inducir el enquistamiento *in vitro*. Utilizando la secuencia aminoacidica de EhSERCA como sonda, fue posible encontrar seis secuencias que podrían codificar para ATPasas de calcio, pero solo una para el tipo de

SERCA. Al analizar la SERCA de *E. invadens* (EiSERCA) notamos que al igual que EhSERCA, esta cuenta con todos los dominios funcionales, incluso con una posible secuencia de retención para retículo endoplásmico similar a la *S. cerevisiae* (HEDL) y *E. histolytica* (HDDL).

Una vez que identificamos una proteína del tipo de SERCA en *E. invadens*, lo siguiente era inmunodetectarla y localizarla subcelularmente, para ello contábamos con el anticuerpo dirigido contra su homólogo en *E. histolytica*. Aun cuando el anticuerpo no fue producido contra EiSERCA, el utilizar el mismo para inmunodetección e inmunofluorescencias no sería un problema, ya que la secuencia de aminoácidos que reconoce el anticuerpo es bastante parecida entre ambas amibas, ya que de 14 aminoácidos que componen la secuencia, 10 se encuentran conservados. Cuando se realizó la inmunodetección y la localización subcelular de EiSERCA, obtuvimos resultados similares a los obtenidos a EhSERCA. Por ejemplo en el caso de la inmunodetección se encontró que el anticuerpo reconocía una banda de aproximadamente 115 kDa, siendo que el peso predicho por la base de datos es de 127 kDa. Sin embargo, al igual que para EhSERCA esta reducción en el peso de la proteína puede deberse a modificaciones postraduccionales o una degradación durante el proceso de extracción de proteínas. En la localización subcelular encontramos que la ATPasa se encuentra presente en un sistema vesicular, que como se ha venido mencionando es el equivalente del retículo endoplásmico en la amiba.

El descubrimiento de inhibidores potentes y específicos de SERCA, nos ha permitido analizar la importancia de la bomba en diversos procesos celulares (Michelangeli & East, 2011). Tapsigargina y ácido ciclopiazónico son inhibidores altamente específicos de SERCA, ambos fármacos son capaces de inhibir a la bomba, ya que bloquean a SERCA en su estado E2, estado que posee menor afinidad por el

calcio (Laporte *et al*, 2004). En *E. histolytica* se ha reportado que Tapsigargina es capaz de elevar la concentración de calcio en el citoplasma de manera transitoria (Carbajal *et al*, 1996). Tomando en cuenta que TG es altamente específico y que no ejerce efecto en otra proteína que no sea SERCA (Laporte, 2004), es factible pensar que el aumento del calcio intracelular provocado por TG en los trofozoítos se debe al bloqueo de EhSERCA. El efecto del ácido ciclopiazónico no ha sido probado en *E. histolytica* o en *E. invadens*, pero sí en otro protozoario parásito como *P. falciparum* donde se encontró que el fármaco inhibe a la SERCA (PfATP6), incluso con un poder mayor que TG (Arnou *et al.*, 2011).

En el trabajo de tesis desarrollado en maestría (Martínez-Higuera, 2010), encontramos que TG no afecta la viabilidad de la amiba en las concentraciones probadas. Sin embargo, esta droga es capaz de afectar la virulencia *in vitro* de *E. histolytica*, aunque, el efecto observado fue solo a tiempos tempranos de interacción con el fármaco (5 y 10 min), ya que la virulencia *in vitro* de los trofozoítos incubados con TG a tiempos mayores (15 min) fue similar a la mostrada por los controles (Martínez-Higuera, 2010). Lo primero que pensamos fue que tal vez la afinidad del fármaco por EhSERCA era baja, esto debido a que cuando se analizó el bolsillo de unión del fármaco en EhSERCA, encontramos que pocos aminoácidos del bolsillo de unión se encontraban conservados. El mismo hallazgo de pocos aminoácidos del bolsillo de unión a TG conservados fue detectado en EiSERCA. Interesantemente, el análisis *in silico* de la SERCA de *T. vaginalis*, *L. amazonensis* y *P. falciparum*, indican que estas proteínas tampoco contienen todos los aminoácidos que conforman el bolsillo de unión para TG (Lu *et al.*, 1997; Uhlemann *et al.*, 2005). Es probable que por esta razón PfATP6 tiene una afinidad menor por TG que la SERCA de eucariontes

superiores (Arnou *et al.*, 2011), misma situación que podría estar sucediendo en *E. histolytica* y *E. invadens*.

Cuando estudiamos el efecto de TG en el enquistamiento de *E. invadens*, observamos que, a pesar de que EiSERCA tiene pocos aminoácidos conservados en el bolsillo de unión del fármaco, éste es capaz de inhibir el enquistamiento en casi un 50%, además de que los quistes que se llegan a formar muestran una morfología anómala, y no así los tratados con el vehículo del fármaco (DMSO). Esto nos hace pensar que el flujo de calcio llevado por la bomba EiSERCA está involucrado en el proceso de enquistamiento.

Antes de llevar a cabo ensayos con CPA, se analizó el bolsillo de unión de EhSERCA y EiSERCA a esta droga y se encontró que estas proteínas presentan un mayor número de aminoácidos conservados con respecto al de SERCA de mamíferos, lo que sugería que este fármaco podría tener un efecto mayor que el de TG en la biología de *Entamoeba*. Al realizar los ensayos de eritrofagocitosis y efecto citopático en los trofozoítos de *E. histolytica*, se observó que el tratamiento con la droga no afectó la virulencia *in vitro* del parásito, resultado que puede deberse a que tal vez la concentración del fármaco utilizada era baja (0.5  $\mu\text{M}$ ), sin embargo, esta misma concentración fue capaz de inhibir el proceso de enquistamiento en *E. invadens* en un 50% y conforme la concentración del fármaco era aumentada, mayor era el porcentaje de inhibición en la formación de quistes, además de que aquellos que se formaban también presentaban una morfología anormal.

Los resultados obtenidos con ambos fármacos nos hace pensar que tal vez SERCA en amiba no tiene gran relevancia en la virulencia, sin embargo, para aclarar esto sería necesario realizar experimentos *in vivo*, donde se utilicen trofozoítos que tuviesen silenciado a SERCA o en el caso contrario que sobreexpresen la ATPasa.

Donde sí es claro el efecto de la inhibición de la bomba TG y CPA es en los ensayos de enquistamiento. Este efecto puede ser derivado del bloqueo de SERCA, ya que la inhibición de la misma resulta en una desregulación intracelular del calcio. Este resultado al igual que el obtenido con tratamientos con bloqueadores de canales calcio (Makioka *et al.*, 2001, 2002), muestran claramente que el calcio participa en el ciclo de vida del parásito.

En conclusión, en este trabajo logramos identificar una ATPasa de calcio del tipo de SERCA en *E. invadens* (EiSERCA). Esta bomba de calcio al igual que EhSERCA, contiene todos los dominios involucrados en el transporte de calcio y se localiza en un sistema vesicular que conforma el retículo endoplásmico en la amiba. EiSERCA se relocaliza a membrana plasmática durante el enquistamiento. Además, se demostró que Tapsigargina y ácido ciclopiazónico, no afectan de manera significativa la virulencia *in vitro* de *E. histolytica*, pero alteran el enquistamiento de *E. invadens*, lo que indica que SERCA es una molécula importante en la biología de la amiba, la cual incluso se podría postular como una molécula blanco para el desarrollo de nuevos fármacos anti-amibianos.

## 9. CONCLUSIONES

*E. histolytica* y *E. invadens*, cuentan con una ATPasa de calcio con motivos que corresponden a SERCA.

*E. histolytica* y *E. invadens* se localizan en un sistema vesicular que corresponde al retículo endoplásmico amibiano.

Las vesículas que contienen a EiSERCA se relocalizan hacia la superficie de *E. invadens* durante el proceso de enquistamiento.

A las concentraciones analizadas ni TG ni CPA, inhibidores específicos de SERCA, afectan significativamente la virulencia *in vitro* de *E. histolytica*.

TG y CPA inhiben el enquistamiento de *E. invadens*, sugiriendo que el flujo de calcio mediado por EiSERCA tiene un papel importante en el ciclo de vida del género *Entamoeba*.

## 10. PERSPECTIVAS

- Estudiar el efecto del silenciamiento y de la sobreexpresión de SERCA en trofozoítos de ambas amibas.
- Mutar los dominios funcionales de SERCA y estudiar su repercusión tanto en *E. histolytica* como *E. invadens*.
- Confirmar la posible secuencia de retención en retículo en ambas SERCA.
- Estudiar las interacciones que pueda llevar a cabo SERCA con otras proteínas en condiciones normales y de estrés por calcio.
- Caracterizar farmacológicamente las bombas EhSERCA y EiSERCA con más inhibidores específicos.
- Desarrollar un inhibidor específico de la SERCA amibiana.

## 11. REFERENCIAS

- Aidley, D., Stanfield, P. 1996. Ion channels molecules in action. Cambridge University Press. First edition. Pp 6-7.
- Altimimi, H., Schnetkamp, P. 2007. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-K<sup>+</sup> exchangers (NCKX) functional properties and physiological roles. Landes Bioscience. 1: 62-69.
- Andersson, M., Gunne, H., Agerberth, B., Boman, A., Bergman, T., Sillard, R., Jomvall, H., Mutt, Y., Olsson, B., Wigzell, H. 1995. NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. The EMBO Journal. 14: 1615-1625.
- Arnou, B., Montigny, C., Morth, J., Nissen, P., Jaxel, C., Mller, J & Maire, M. 2011. The Plasmodium falciparum ca<sup>2+</sup> ATPase PfATP6: insensitive to artemisinin, but a potential drug trget. Biochemical Society Transactions. 39: 823-831.
- Arroyo, R., Orozco, E. 1987. Localization and identification o fan *Entamoeba histolytica* adhesin. Molecular and Biochemical Parasitology. 23: 151-158.
- B. Avron, T. Stolarsky, A. Chaven and D. Mirelman. 1986. Encystation of *Entamoeba invadens* IP.1 is induced by lowering the osmotic pressure and depletion of nutrients from the medium. Journal of Protozoology. 33: 522-525.
- G. B. Bailey and S. Rengypian. 1980. Osmotic stress as a factor controlling encystations of *Entamoeba invadens*. Archivos de Investigación Médica. 11: 11-16.
- 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 Ca<sup>2+</sup> -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., Pham Van, L., Anh Ton Nu, P., Duong Thi, H., Muller-Myhsok, B., Buss, H., Tannich, E. 2002. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 66: 578-583.

Botero, D., Restrepo, M. 1998. Parasitosis humanas. Segunda edición. Editorial corporación para investigaciones biológicas. Colombia. Pp 27-28, 40.

Bruchhaus, I., Loftus, B., Hall, N., Tannich, E. 2003. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryotic Cell*. 2: 501-509.

Buss, S., Kabir, M., Petri, W., Haque, P. 2008. Comparison of two immunoassays for detection of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology*. 46: 2778-2779.

Cahalan, M., Chandy, G. 1997. Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Current Opinion in Biotechnology*. 8: 749-756.

Cahalan, M., Wulff, H., Chandy, G. 2001. Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *Journal of Clinical Immunology*. 21: 235-252.

Cao, Y. 2006. Voltage-gated calcium channels and pain. *Pain*. 126: 5-9.

Carbajal, M., Manning-Cela, R., Piña, A., Franco, E., Meza, I. 1996. Fibronectin-induced intracellular calcium rise in *Entamoeba histolytica* trophozoites: effect on adhesion and the actin cytoskeleton. *Experimental Parasitology*. 82: 11-20.

Catterall, w. 2000. Structure and regulation of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 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.

Clapham, D. 2007. Calcium signaling. *Cell*. 131: 1047-1058.

Clark, C. G. & Diamond, L.S.. 2002. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clinical Microbiology Reviews*. 15: 329-341.

Collingridge, G., Olsen, R., Peters, J., Spedding, M. 2009. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*. 56: 2-5.

Cox, F. 2002. History of human parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*. 15: 596-612.

del Cacho E, Gallego M, Francesch M, Quilez J & Sanchez-Acedo C. 2010. Effect of artemisinin on oocyst wall formation and sporulation during *Eimeria tenella* infection. *Parasitology international* 59: 506-511

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 regulación y función en la célula  $\beta$  pancreática. *Revista Cubana de Endocrinología*. 14:270-281.

Dong, H., Jiang, Y., Triggle, C., Li, X., Lytton, J. 2006. Novel role for  $K^+$ -dependent  $Na^+/Ca^{2+}$  exchangers in regulation of cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  and contractility in arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology*. 291: 1226-1235.

- Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA & Krishna S. 2003. Artemisinin target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 424: 957-961.
- Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A. 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 13: 318-331.
- Fahrner, M., Muik, M., Derler, I., Shindi, R., Fritsch, R., Frischauf, I., Romanin, C. 2009. Mechanistic view on domains mediating STIM1-Orai coupling. *Immunological Reviews*. 231: 99-112.
- Feranchak, A. 2003. Ion channels in digestive health and disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 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.
- Gallespie, S., Pearson, R. 2001. Principles and practice of clinical parasitology. Second edition. Wiley. England. Pp 197-199.
- Ganguly, A and Lohia, A. 2001. The cell cycle of *Entamoeba invadens* during vegetative growth and differentiation. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 112: 277-285.
- García-Rivera, G., Rodríguez, M., Ocádiz, R., Martínez-López, M., Arroyo, R., González-Robles, A., Orozco, E. 1999. *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular Microbiology*. 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.

Gómez, J., Cortés, J., Cuervo, S., López, M. 2007. Amibiasis intestinal. *Infectio*. 11:36-45.

González, E., Rico, G., Mendoza, G., Ramos, F., García, G., Morán, P., Valadez, A., Melendro, E., Ximénez, C. 2002. Calreticulin-like molecule in trophozoites of *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS (swissprot:accesión P83003). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 67: 636-639.

González, E., de Leon, M. D. C. G., Meza, I., Ocadiz-Delgado, R., Gariglio, P., Silva-Olivares, A., Galindo-Gómez, S., Shibayama, M., Morán, P., Valadez, A., Limón, A., Rojas, L., Hernandez, E. G., Cerritos, E. & Ximenez, C. 2011. *Entamoeba histolytica* calreticulin: an endoplasmic reticulum protein expressed by trophozoites into experimentally induced amoebic liver abscesses. *Parasitology research*. 108: 439-449.

Guda, P., Bourne, P., Guda, C. 2007. Conserved motifs in voltage-sensing and pore-forming modules of voltage-gated ion channel proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 352: 292-298.

Guo, R., Huang, L. 2008. New insights into the activation mechanism of store-operated calcium channels: roles of STIM and Orai. *Journal of Zhejiang University*. 9: 591-601.

Hecht, O., van Nuland, NA., Schleinkofer, K., Dingley, AJ., Bruhn, H., Leippe, M., Grötzinger, J. 2004. Solution structure of the pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 17834-17841.

Hellberg, A., Nickel, R., Lotter, H., Tannich, E., Bruchhaus, I. 2001. Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-

induced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. *Cellular Microbiology*. 3:13-20.

Higgins, E., Cannell, M., Sneyd, J. 2006. A buffering SERCA pump in models of calcium dynamics. *Biophysical Journal*. 91: 151-163.

Hille, B (2002) *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, USA. Pp 229-265.

Huang, C. 2004. The transient receptor potential superfamily of ion channels. *Journal of the American Society of Nephrology*. 15:1690-1699.

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

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.

Jentsch, T., Hübner, C., Fuhrmann, J. 2004. Ion channels: function unravelled by dysfunction. *Nature Cell Biology*. 6: 1039-1047.

Katz, U., Ankri, S., Stolarsky, T., Nuchamowitz, Y., Mirelman, D. 2002. *Entamoeba histolytica* expressing a dominant negative N-truncated light subunit of its Gal-lectin are less virulent. *Molecular Biology of the Cell*. 13: 4256-4265.

Kelsall, B., Ravdin, J. 1993. Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *Journal of infectious Diseases*.168: 1319-1322.

Kotšubei, A., Gorgel, M., Morth, J. P., Nissen, P., & Andersen, J. L. 2013. Probing determinants of cyclopiazonic acid sensitivity of bacterial Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *FEBS Journal*, 280: 5441-5449.

Kretschmer, R. 1994. Amibiasis infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Primera edición. Editorial trillas. México. Pp 48, 66-74.

Laporte, R., Hui, A., Laher, I. 2004. Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. The American Society for Pharmacological and Experimental Therapeutics. 56: 439-513.

Laughlin, R., Temesvari, L. 2005. Cellular and molecular mechanisms that underlie *Entamoeba histolytica* pathogenesis: prospects for intervention. Experts reviews in Molecular Medicine. 7: 1-19.

Leippe, M. 1997. Amoebapores. Parasitology Today. 13: 178-183.

Leippe, M., 1995. Ancient weapons: NK-lysin is a mammalian homolog to pore-forming peptides of a protozoan parasite. Cell. 83: 17-18.

Li, E., Becker, A., Stanley, S. 1988. Use of Chinese hamster ovary cells with altered glycosylation patterns to define the carbohydrate specificity of *Entamoeba histolytica* adhesion. Journal of Experimental Medicine. 67: 1725-1730.

Liu, D., Liman, E. 2003. Intracellular  $Ca^{2+}$  and the phospholipid PIP2 regulate the taste transduction ion channels TRPM5. PNAS. 100: 15160-15165.

López, M., Quiroz, D., Pinilla, A. 2008. Diagnostico de la amebiasis intestinal y extraintestinal. Acta Médica Colombiana. 33: 75-83.

López-Romero, E., Villagómez-Castro, J.C. 1993. Encystation in *Entamoeba invadens*. Parasitology Today. 9: 225-227.

Lu, H. G., Zhong L., Chang, K. P. & Docampo, R. 1997. Intracellular  $Ca^{2+}$  pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes. The Journal of biological chemistry 272: 9464-9473.

Luaces, A., Barrett, A. 1988. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochemical Journal*. 250: 903-909.

Lynch, EC., Rosenberg, IM., Gitler, C. 1982. An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *The EMBO Journal*. 1: 801-804.

Madriz, X., Martínez, M., Rodríguez, M., Sierra, G., Martínez-López, C., Riverón, A., Flores, L., Orozco, E. 2004. Expression in fibroblasts and in live animals of *Entamoeba histolytica* polypeptides EhCP112 and EhçADH122. *Microbiology*. 150: 1251-1260.

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

Makioka, A., Kumagai, M., Kobayashi, S. & Takeuchi, T. 2002. Possible role of calcium ions, calcium channels and calmodulin in excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. *Parasitology research* 88: 837-843.

Martin, V., Bredoux, R., Corvazier, E., Van Gorp, R., Kovács, T., Gélébart, P., Enouf, J. 2002. Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) 3 isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 24442-24452.

Martínez-López, C., Orozco, E., Sánchez, T., García-Pérez, R., Hernández-Hernández, F., Rodríguez, M. 2004. The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cellular Microbiology*. 6: 367-376.

Martínez-Palomo, A. (1986). *The biology of Entamoeba histolytica*. Research Studies Press (John Wiley & Sons Ltd.)

Martinez-Higuera, A.A. 2010. Identificación de una posible ATPasa de calcio del tipo de SERCA en *Entamoeba histolytica* Tesis de maestría. Cinvestav.

Meade, J. C., Li, C., Moate, M. E., Davis-Hayman, S. R., Lushbaugh, W. B. & Finley, R. W. (1997). Molecular characterization of a sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase gene from *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 44: 480-486.

McConnachie, E. W. 1969. The morphology, formation and development of cysts of *Entamoeba*. *Parasitology*. 59: 41-53.

Michelangeli, F. & East, J. M. 2011. A diversity of SERCA Ca<sup>2+</sup> pump inhibitors. *Biochemical Society transactions*. 39: 789-797.

Michalak, M., Cobertt, E. F., Mesaeli, N., Nakamura, K., Opas, M. 1999. Calreticulin: one protein one gene, many functions. *Biochemical Journal*. 344: 28-92.

Meza, I., Talamás-Rohana, P., Vargas, M. 2006. The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: structure, function, and regulation by signaling pathways. *Archives of Medical Research*. 37: 234-243.

Mitchell, K., Tsuboi, T., Rutter, G. 2004. Role for plasma membrane-related Ca<sup>2+</sup> - ATPases-1 (ATP2C1) in pancreatic  $\beta$ -cell Ca<sup>2+</sup> homeostasis revealed by RNA silencing. *Diabetes*. 53: 393-400.

Moreno, S., Docampo, R. 2003. Calcium regulation in protozoan parasites. *Current Opinion in Microbiology*. 6: 359-364.

Nowycky, M., Thomas, A. 2002. Intracellular calcium signaling. *Journal of Cell Science*. 115: 3715-3716.

Ocádiz, R., Orozco, E., Carrillo, E., Quintas, L., Ortega-López, J., García-Pérez, R., Sánchez, T., Castillo-Juárez, B., García-Rivera, G., Rodríguez, M. 2005. EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cellular Microbiology*. 7: 221-232.

Orozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo, A., Sanchez, T. 1983 *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *Journal of Experimental Medicine*.158: 1511–1521.

Pinilla, A., López, M., Viasus, D. 2008. Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. *Revista Médica de Chile*. 136: 118-124.

Ponce, A., Cereijido, A, P. 2000. *Genética y medicina molecular*. Editorial Limusa. Primera edición. México. Pp 242.

Que, X., Brinen, L., Perkins, P., Herdman, S., Hirata, K., Torian, B., Rubin, H., McKerrow, J., Reed, S. 2002. Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 119: 23-32.

Que, X., Reed, S. 2000. Cystein proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 13: 196-206.

Que, X., Soo-Hyun, K., Sajid, M. 2003. A surface amebic cystein proteinase inactivates interleukin-18. *71:1274-1280*.

Raeymaekers, L., Wuytack, E., Willems, I., Michiels, C. W., Wuytack, F. 2002. Expression of a P-type Ca(2+)-transport ATPase in *Bacillus subtilis* during sporulation *Cell calcium* 32 (2): 93.

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.

Ramos, M., Mares, R., Magaña, P., Rivas, I., Meléndez-López, S. 2011. *Entamoeba histolytica*: biochemical characterization of a protein disulfide isomerase. *Experimental Parasitology*. 128: 76-81..

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

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

Ravdin, J.I., Guerrant, R.L., 1981. Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *The Journal of Clinical Investigation*. 68: 1305–1313.

Ravdin, J.I., Croft, B.Y., Guerrant, R.L., 1980. Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Experimental Medicine*. 152: 377–390.

Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Guerrant, R.L., Long-Krug, S.A., 1985. Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Experimental Diseases*. 152: 542–549.

Ravdin, J., Sperelakis, N., Guerrant, R. 1982. Effect of ion channel inhibitors on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Infectious Diseases*. 146: 336-340.

Reed, S., Ember, J., Herdman, D., DiScipio, R., Hugli, T, Gigli, I. 1995. The extracellular neutral cystein proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *The Journal of Immunology*. 155: 266-274.

Reiner, D., Hetsko, M., Meszaros, J., Sun, C., Morrison, H., Brunton, L. & Gillin, F. 2003. Calcium signaling in excystation of the early diverging eukaryote, *Giardia lamblia*. *The Journal of biological chemistry*. 278: 2533-2540.

Rodriguez, N., Docampo, R., Lu, H. & Scott, D. 2002. Overexpression of the *Leishmania amazonensis* Ca<sup>2+</sup>-ATPase gene *Imaa1* enhances virulence. *Cellular microbiology* 4: 117-126.

Rosales-Encina, J., Meza, I., López-De-Leon, A., Talamás-Rohana, P., Rojkind, M. 1987. Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Infectious Diseases*. 156: 790-797.

Rudolph, H., Antebi, A., Fink, 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 Ca<sup>2+</sup> ATPase family. *Cell*. 58: 133-145.

Sahoo, 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.

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.

Segovia-Gamboa, N., Talamás-Rohana, P., Ángel-Martínez, A., Cázares-Raga, F., González-Robles, A., Hernández-Ramírez, V., Martínez-Palomo, A., Chávez-Munguía, B. 2011. Differentiation of *Entamoeba histolytica*: a possible role for enolase. *Experimental Parasitology*. 129: 65-71.

Sehgal, D., Bhattacharya, A., Bhattacharya, S. 1996. Pathogenesis of infection by *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biosciences*. 21: 423-432.

Southwick, F. 2007. *Infectious diseases a clinical short course*. Second edition. McGraw-Hill. USA. Pp 205.

Stanley, S., Tian, K., Koester, J. & Li, E. 1995. The serine-rich *Entamoeba histolytica* protein is a phosphorylated membrane protein containing o-linked terminal N-acetylglucosamine residues. *The Journal of Biological Chemistry*. 270: 4121-4126.

Stanley, S., Becker, A., Kunz-Jenkins, C., Foster, L. & Li, E. 1990. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87: 4976-4980.

Strehler, E., Filoteo, A., Penniston, J., Caride, A. 2007. Plasma-membrane Ca<sup>2+</sup> pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochemical Society Transactions*. 35: 919-922.

Talamás-Rohana, P., Meza, I. 1988. Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: substrate degradation and changes in cytoskeleton organization. *The Journal of Cell Biology*. 106: 1787-1794.

Talamás-Rohana, P., Schlie-Guzmán, A., Hernández-Ramírez, V., Rosales-Encina, J. 1995. T-cell suppression and selective in vivo activation of th2 subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220-kilodalton lectin. *Infection and Immunity*. 63:3953-3958.

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

Tran, V., Herdman, D., Torian, B., Reed, S. 1998. The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. *Journal of Infectious Diseases*. 177: 508-511.

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

Uhlemann, A., Cameron, A., Eckstein-Ludwig, U., Fischbarg, J., Iserovich, P., Zuniga, F., East, M., Lee, A., Brady, L., Haynes, R., Krishna, S. 2005. A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. *Nature Structural and Molecular Biology*. 12: 628–629.

Vanoevelen, J., Dode, L., Van Baelen, K., Fairclough, R., Missiaen, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F. 2005. The secretory pathway  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  -ATPase 2 is a Golgi-localized pump with high affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  ions. *The Journal of Biological Chemistry*. 280: 22800-22808.

Várnai, P., Hunyady, L., Balla, T. 2009. STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends in Pharmacological Sciences*. 30: 118-128.

Vázquez de Lara-Cisneros, L., Arroyo-Begovich, A. 1984. Induction of encystation of *Entamoeba invadens* by removal of glucose from the culture medium. *Journal of Parasitology* 70: 629–633.

Welling, A. 2009. Voltage-dependent calcium channels. *Biotrend Reviews*. 4:1-11.

Winkelmann, J., Leippe, M. & Bruhn, H. 2006. A novel saposin-like protein of *Entamoeba histolytica* with membrane-fusogenic activity. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 147: 85-94.

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

Zhang, Z., Yan, L., Wang, L., Seydel, K., Li, E., Ankri, S., Mirelman, D., Stanley, S. 2000. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Molecular Microbiology*. 37: 542-548).