



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE  
ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN**



**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE  
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**Tesis:**

**Papel de grainina-2 y calpaína-like durante la  
muerte celular programada de  
*Entamoeba histolytica in vitro***

Que presenta:

**M. EN C. TANIA DOMÍNGUEZ FERNÁNDEZ**

Para obtener el grado de:

**D. EN C. EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS  
MOLECULAR**

**Directores de Tesis:**

D. en C. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez.

D. en C. David Guillermo Pérez Ishiwara.



### **CODIRECTORES DE TESIS:**

D. en C. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez.

D. en C. David Guillermo Pérez Ishiwara.

### **ASESORES:**

D. en C. María Esther Orozco Orozco

D. en C. Abigail Betanzos Fernández

D. en C. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

D. en C. María del Consuelo Gómez García

D. en C. José Manuel Hernández Hernández

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 2 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular de CINVESTAV Zacatenco y en el laboratorio de Biomedicina Molecular I de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, bajo la dirección de los doctores Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez y Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara.

*La ciencia es el alma de la prosperidad de  
las naciones y fuente de todo progreso.*

Louis Pasteur

(1822-1895)

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis doctoral, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte de la autora y sus directores de tesis, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en diferentes momentos.

Agradecer hoy y siempre a mis padres la Profra. María Guadalupe Fernández Villalobos y el Profr. Gregorio Domínguez Herrera porque a pesar de no estar presentes físicamente, sé que procuraron mi bienestar desde lejos, y siempre han manifestado su apoyo en todos los sentidos. A mis hermanos Kenia, David y Yoatzin los cuales me han brinda cariño y apoyo de diferente manera. Gracias familia por darme amor y la fortaleza necesaria para seguir adelante.

Y por último en este apartado, pero no menos importante, a mi nueva familia, mi esposo el Dr. Raúl Mendoza Ruíz, por estar conmigo en aquellos momentos en que el estudio y el trabajo ocuparon mi tiempo y esfuerzo, y ahí estuviste acompañándome en arduas horas de experimentos en el laboratorio. Gracias por todo tu amor y mostrarme el lado dulce de la vida. No fue sencillo culminar este proyecto, pero se ha logrado.

Por otro lado, específicamente en lo académico, agradezco a los directores del proyecto, por su paciencia, aportes y sugerencias al proyecto, gracias Dr. Mario y Dr. Guillermo, quiero señalar que inicialmente en la maestría el Dr. Guillermo Pérez me condujo y orientó en el área de la investigación, agradezco de antemano eso ya que he ampliado mi criterio como investigadora.

A mis asesores de tesis, mi reconocimiento a todos ustedes quienes juzgaron este proyecto con sus valiosas sugerencias y comentarios durante el desarrollo del trabajo. Al Dr. Manuel que en momentos no tan buenos en donde, como es lógico, flaqueamos, me motivó a seguir adelante con sus consejos y palabras, muchas gracias.

Y bueno, a lo largo de nuestra vida, conocemos a muchas personas, todas y cada una de ellas nos aportan siempre algo: una experiencia, diversión, un aprendizaje, un mal recuerdo, sentimientos y son estas personas las que nos ayudan a forjarnos una personalidad con el tiempo, a aprender, a madurar y a formar nuestra manera de gestionar la vida. Es por eso que también quiero agradecer a mis amigos, que apoyaron desde escuchándome hasta conseguirme o prestarme un reactivo, ayudándome en alguna duda sobre algún experimento o colaborando. Gracias por su compañía durante el tiempo que se requirió para el desarrollo y culminación de esta etapa.

## CONTENIDO

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	i
<b>Lista de tablas</b> .....	iii
<b>Lista de figuras</b> .....	iv
<b>Resumen</b> .....	vi
<b>Abstract</b> .....	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Historia .....	1
1.2. Ciclo Biológico .....	3
1.3. Morfología .....	3
1.3.1. Trofozoíto .....	4
1.3.2. Prequíste .....	5
1.3.3. Quíste .....	5
1.3.4. Metaquíste .....	5
1.4. Epidemiología .....	6
1.5. Mecanismos de patogenicidad y virulencia .....	7
1.6. Procesos involucrados en la patogénesis .....	8
1.6.1. Adhesión .....	9
1.6.2. Fagocitosis .....	9
1.6.3. Lisis .....	10
1.6.4. Invasión .....	11
1.7. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune .....	12
1.8. Muerte celular programada (MCP) o "suicidio celular" .....	13
1.8.1. Estimuladores externos de muerte, "Vía del receptor de muerte" .....	15
1.8.2. Estimuladores internos de muerte, "Vía mitocondrial" .....	15
1.9. Moléculas implicadas en el proceso de apoptosis: efectores intracelulares .....	16

1.9.1. Familia de proteínas Bcl-2 .....	16
1.9.2. La familia de las caspasas .....	17
1.9.3. Calpaína y MCP .....	18
1.10. MCP en parásitos protozoarios .....	20
1.10.1. MCP en <i>Leishmania sp.</i> .....	22
1.10.2. MCP en <i>Trypanosomas</i> .....	24
1.10.3. Regulación de la MCP en parásitos .....	25
1.11. Antecedentes .....	26
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>32</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>33</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>35</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
6.1. Cultivo celular .....	36
6.2. Inducción de la apoptosis con G418 .....	36
6.3. Análisis <i>in-silico</i> de grainina-2 y calpaína-like de <i>E. histolytica</i> .....	36
6.4. Generación de anticuerpos contra grainina-2 y calpaína-like .....	37
6.4.1. Diseño de los péptidos .....	37
6.4.2. Inmunización .....	37
6.5. Obtención de proteínas totales .....	38
6.6. Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	38
6.7. Western blot .....	39
6.8. Inmunofluorescencia y microscopia confocal .....	40
6.9. Obtención de RNA total .....	40
6.10. Electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes .....	41
6.11. qRT-PCR .....	42
6.11.1. Síntesis de cDNA .....	42
6.11.2. Amplificación .....	42
6.12. Silenciamiento por RNA interferente (siRNA) .....	43
6.13. Ensayos de marcaje de final dUTP (TUNEL) mediados por la desoxinucleotidiltransferasa terminal .....	44

6. 14. Citometría de Flujo .....	45
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>77</b>
<b>9. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>85</b>
<b>10. PRESPECTIVAS .....</b>	<b>86</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>87</b>
<b>12. ANEXOS .....</b>	<b>99</b>

## Lista de abreviaturas

<b>WHO</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ión calcio
<b>AIF</b>	Factor Inductor de Apoptosis
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribunucleico
<b>Gal</b>	Galactosa
<b>h</b>	Hora
<b>K<sup>+</sup></b>	Ión potasio
<b>M</b>	Molar
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>MALDI</b>	Desorción/ionización mediante láser inducida por matriz
<b>MCP</b>	Muerte Celular Programada
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µl</b>	Microlitro
<b>ml</b>	mililitro
<b>PBS</b>	Amortiguador de fosfatos
<b>PI</b>	Punto Isoeléctrico
<b>PM</b>	Peso Molecular
<b>PS</b>	Fosfatidil Serina

<b>TOF</b>	Tiempo de Vuelo
<b>NADP</b>	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
<b>G418</b>	Geneticina 418
<b>AFLP´S</b>	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>E-64</b>	Epóxido-64
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>WB</b>	Western Blot
<b>CaMKV</b>	Cinasa dependiente de la calmodulina

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> MCP en diferentes parásitos protozoarios.....	21
<b>Tabla 2.</b> Proteínas diferenciales obtenidas de los perfiles proteómicos de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> inducidos a MCP con G418, identificadas por MALDI TOF-TOF.....	28
<b>Tabla 3.</b> Porcentajes de homología e identidad de grainina 1 y 2 de <i>Entamoeba histolytica</i> contra calmodulina de <i>T. brucei</i> y <i>T. gondi</i> . Tomado de Sánchez in <i>Experimental Parasitology</i> , 2010.....	30
<b>Tabla 4.</b> Proteínas componentes del interactoma predicho de grainina-2 y calpaína-like de <i>E. histolytica</i> .....	74

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Proceso patogénico en <i>E. histolytica</i> .....	8
<b>Figura 2.</b> Dominios en la arquitectura de grainina-2 de <i>E. histolytica</i> .....	48
<b>Figura 3.</b> Dominios en la arquitectura de calpaína-like de <i>E. histolytica</i> .....	49
<b>Figura 4.</b> Estructuras 3D de la proteína grainina-2 de <i>E. histolytica</i> y PDCD6 de <i>L. major</i> .....	50
<b>Figura 5.</b> Estructuras 3D de la proteína calpaína-like de <i>E. histolytica</i> y calpaína-1 de humano.....	51
<b>Figura 6.</b> Expresión relativa del transcrito grainina-2 en trofozoítos incubados con G418.....	52
<b>Figura 7.</b> Expresión relativa del transcrito calpaína-like en trofozoítos incubados con G418.....	53
<b>Figura 8.</b> Expresión y localización de la proteína grainina-2 en trofozoítos.....	54
<b>Figura 9.</b> Expresión y localización de la proteína calpaína-like en trofozoítos.....	55
<b>Figura 10.</b> Expresión de la proteína grainina-2 durante la MCP inducida por G418.....	57
<b>Figura 11.</b> Localización celular y expresión de la proteína grainina-2 durante la MCP.....	58
<b>Figura 12.</b> Expresión de la proteína calpaína-like durante la MCP inducida por G418.....	59

<b>Figura 13.</b> Localización celular y expresión de la proteína calpaína-like durante la MCP.....	60
<b>Figura 14.</b> Silenciamiento de grainina-2.....	62
<b>Figura 15.</b> Silenciamiento de calpaína-like.....	64
<b>Figura 16.</b> Efecto del silenciamiento de grainina-2 en la MCP.....	67
<b>Figura 17.</b> Efecto del silenciamiento de grainina-2 sobre la viabilidad celular de <i>E. histolytica</i> incubada con G418.....	69
<b>Figura 18.</b> Efecto del silenciamiento de calpaína-like en la MCP.....	70
<b>Figura 19.</b> Efecto del silenciamiento de calpaína-like sobre la viabilidad celular de <i>E. histolytica</i> incubada con G418.....	71
<b>Figura 20.</b> Redes de interacción proteica predichas de grainina-2 y calpaína-like de <i>E. histolytica</i> .....	73

## RESUMEN

La MCP (Muerte Celular Programada) inducida por G418 se caracteriza por la liberación de calcio intracelular de los reservorios. Aunque el fenotipo MCP de los trofozoítos se reduce por el inhibidor de las cisteínas proteinasas E-64, no se han detectado caspasas típicas en el parásito. Estos resultados sugieren fuertemente que otras proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como la calpaína, podrían estar involucradas en la MCP. Por otro lado, un análisis proteómico permitió la identificación de 15 proteínas expresadas diferencialmente durante la MCP inducida por G418 en trofozoítos de *E. histolytica*; en particular, la grainina 2 se detectó en las primeras etapas de la MCP, pero desapareció después de 9 h de incubación con G418. Por lo tanto, calpaína y grainina 2 probablemente funcionan como factores pro-apoptóticos y anti-apoptóticos, respectivamente. Interesantemente, en otros sistemas, la calpaína y proteínas similares a la grainina 2 han sido involucradas en la apoptosis.

En este trabajo, se analizó la expresión a nivel de mRNA y de proteína de calpaína y grainina 2 durante la MCP inducida por G418. También se utilizaron siRNA's para evaluar el efecto de la caída en la expresión de ambos genes en la MCP. Los resultados mostraron que el gen de calpaína se sobreexpresó a las 1.5 h de la inducción de MCP, mientras que la proteína aumentó a las 9 h y se localizó principalmente alrededor del núcleo de las amibas. El silenciamiento de calpaína provocó una reducción significativa de la tasa de muerte celular, así como en la fragmentación del DNA a las 9 h de MCP. Por su parte, el gen de grainina 2 se sobreexpresó a los 30 min de inducción de la MCP, mientras que la proteína se sobreexpresó 3 h más tarde y disminuyó después de 6 h. La proteína se localizó en vesículas citoplásmicas y en la membrana plasmática. El silenciamiento de grainina 2 indujo un discreto aumento de células muertas y de la fragmentación del DNA a las 6 h. Los resultados sugieren que la calpaína podría estar involucrada en la fase ejecutora de la MCP. Mientras que el bajo efecto en el fenotipo de MCP al silenciar la grainina 2, sugiere que probablemente hay otras proteínas secuestradoras de calcio que pueden desempeñar funciones similares en la fase inicial de este evento.

## ABSTRACT

The programmed cell death (PCD) induced by G418 is characterized by the release of intracellular calcium from reservoirs. Although the PCD phenotype of trophozoites is reduced by the cysteine proteinases inhibitor E-64, no typical caspases have been detected in the parasite. These results strongly suggest that other  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent proteases, such as calpain, could be involved in the PCD. On the other hand, a proteomic analysis allowed the identification of 15 proteins differentially expressed during PCD induced by G418 in *E. histolytica* trophozoites; grainin 2 was detected in early stages of PCD, but it disappears after 9 h of incubation with G418. Thus, calpain-like and grainin 2 probably function as pro-apoptotic and anti-apoptotic factors, respectively. Interestingly, in other systems calpain and proteins related to grainin 2 have been involved in apoptosis.

In this work, the expression at the level of mRNA and protein of calpain and grainin 2 was analyzed during PCD induced by G418. siRNAs were also used to evaluate the effect of the fall in the expression of both genes in the PCD. The results showed that the calpain gene was overexpressed at 1.5 h of the PCD induction, while the protein increased at 9 h and was located mainly around the core of the amoebas. The silencing of calpain caused a significant reduction in the rate of cell death, as well as DNA fragmentation at 9 h of MCP. On the other hand, the grainin 2 gene was overexpressed 30 min after induction of the PCD, while the protein was overexpressed 3 h later and decreased after 6 h. The protein was located in cytoplasmic vesicles and in the plasma membrane. The silencing of grainin 2 induced a slight increase in dead cells and DNA fragmentation at 6 h.

The results suggest that calpain could be involved in the execution phase of the PCD. While the low effect on the PCD phenotype in silencing the grainin 2, suggests that there are probably other calcium-sequestering proteins that can perform similar functions in the initial phase of this event.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias son una de las causas de morbilidad más importantes a nivel mundial, las cuales reflejan deficiencias sanitarias características de áreas pobres donde priva el hacinamiento y el mal manejo de las aguas y de las excretas (Torgerson, et al., 2015). La amebiasis representa la tercera enfermedad parasitaria a nivel mundial y en México, al ser endémica, constituye un problema de salud pública muy importante (Conde-Bonfil 1992; WHO 1997).

*Entamoeba histolytica*, es el agente causal de la amebiasis. Este protozoo reside y se multiplica en el intestino grueso causando en la mayoría de los casos una infección asintomática en el lumen del intestino. Sin embargo, la infección con este microorganismo también puede ocasionar diferentes manifestaciones clínicas, que incluyen la diarrea y la disentería (Pineda y Perdomo, 2015). Ocasionalmente este parásito penetra la mucosa intestinal, y genera una colitis ulcerativa o bien se disemina hacia otros órganos como el pulmón y el cerebro aunque, el órgano principal, después del intestino, es el hígado, donde induce la formación de abscesos (Tillack 2007; Baxt 2008) .

### 1.1. Historia

*E. histolytica* fue descrito por Rösel Van Rosenhof desde el siglo XVII y XVIII, siendo Lösch quien describió la disentería amebiana en San Petersburgo, Rusia (Bernal-Redondo 2001). En 1875 Lösch descubrió en un campesino de 24 años que sufría de disentería, unos microorganismos móviles que poseían ecto y endoplasma y contenían glóbulos rojos. El investigador inoculó cuatro perros por vía rectal y oral con las heces del paciente y logró reproducir en uno de ellos la disentería, con ulceraciones en la mucosa intestinal y amibas en el exudado. El paciente enfermó y murió a los 7 meses y la necropsia demostró numerosas y extensas ulceraciones de la mucosa del colon, donde de nuevo observó los microorganismos. No obstante, estos hallazgos, el autor no consideró a la amiba como agente etiológico, sino como

un coadyuvante mecánico que impedía la curación de las lesiones originales por otro agente causal (Jackson, Gathiram, et al., 1995).

Koch en 1833, revisando necropsias en una epidemia de cólera, demostró la presencia de las amebas en la submucosa de la pared intestinal, en los capilares cercanos a la pared de los abscesos hepáticos y en el exudado de lesiones del hígado. Los hallazgos de Koch fueron confirmados por Karttulis (1885-1887), al demostrar la presencia de amibas en 150 necropsias de cosas de disentería. A este autor se le considera el primero en afirmar que la amiba era el agente etiológico de la disentería tropical y que el absceso del hígado era una secuela de la disentería experimental. Councilman y Lafleur (1891), consideraron la disentería como una entidad clínica caracterizada por lesiones asociadas a la amiba. Usaron por primera vez las expresiones disentería amibiana, absceso amibiano del hígado y propusieron para el agente causal el nombre de *Amoeba dysenteriae*. Heuber en 1903, hizo la descripción de los quistes de esta amiba y Schaudinn de los trofozoítos, este asignó el nombre de *Entamoeba histolytica* por su capacidad de lisis de tejido y producir úlceras intestinales (Bernal-Redondo 2001); este autor diferenció dos especies: *E. histolytica* o amiba patógena y *Entamoeba coli* o no patógena. Para mostrar esta diferencia de patogenicidad ingirió quistes y sufrió como consecuencia dos crisis disentéricas, lo que para muchos fue la causa de su temprana muerte. Posteriormente, se adoptó el nombre genérico *Entamoeba*, que había sido propuesto desde el siglo pasado.

Los trabajos definitivos sobre la patogenicidad de *E. histolytica*, fueron realizados en 1913 por Musgrave y Clegg y por Walker y Sellards, quienes suministraron quistes de *E. histolytica* y quistes de *E. coli* a voluntarios sanos y obtuvieron la disentería solo aquellos que ingirieron *E. histolytica*.

En 1914 se realizaron los trabajos inmunológicos por Izar quien preparó antígenos acuosos de *E. histolytica* a partir de materias fecales y obtuvo reacciones positivas de fijación del complemento. En 1924 Boeck y Drbohlav lograron cultivar con éxito *E. histolytica* en un medio artificial con base de huevo, que contenía la flora microbiana de las materias fecales. Con este tipo de cultivo Craig, en 1927, preparó un antígeno con fines diagnósticos para fijación del complemento.

En 1925 Brumpt, mediante experimentos en gatos y en humanos, diferenció una amiba patógena, *Entamoeba dysenteriae*, equivalente a *E. histolytica* (Pimenta, Diamond, et al., 2002) y una no patógena, *Entamoeba dispar*. Diamond en 1961 obtuvo por primera vez un cultivo axénico, es decir, libre de bacterias, el cual ha sido utilizado para preparar antígenos con alto grado de pureza para diversas reacciones serológicas. En 1993, Diamond y Clark, re-describieron la existencia de dos especies diferentes: *E. histolytica*, patógena y *E. dispar*, no patógena, morfológicamente iguales, pero con diferencias inmunológicas, bioquímicas y genéticas (Botero, 1994).

## **1.2. Ciclo Biológico**

El ciclo de vida de *E. histolytica* se desarrolla a través de una alternancia de crecimiento trofozoítico y de la formación periódica de quistes (Calzado, Verde et al. 2007). Esto comienza después de la ingestión de un quiste no móvil, por el huésped humano. La forma móvil del parásito o trofozoíto surge después de la digestión de la pared del quiste durante el paso a través del intestino delgado y coloniza el intestino grueso, donde prolifera, mientras se alimentan de la flora bacteriana residente. Para completar el ciclo de vida, los trofozoítos se desarrollan en quistes tetra-nucleados y pasan hacia el ambiente exterior con las heces del huésped. *E. histolytica* puede existir como un comensal en el intestino del ser humano, o causar disentería o abscesos extraintestinales. La proliferación de los trofozoítos en la luz del intestino se produce en un ambiente polixénico donde coexiste con diferentes especies de bacterias anaerobias y micro-aerófilas. En contraste, durante la invasión del epitelio intestinal o en las lesiones extraintestinales como abscesos hepáticos, las amibas proliferan en un ambiente libre de otros microorganismos (Mukherjee, Clark, et al., 2008).

## **1.3. Morfología**

La división metaquística en el ciclo de vida de *E. histolytica* forma un quiste maduro siendo una amiba metaquística, con cuatro núcleos quísticos. Cada amiba metaquística produce finalmente ocho amibas por una serie de divisiones nucleares y citoplasmáticas. Cada núcleo quístico se divide, resultando que ocho núcleos son producidos, que se separan y forman ocho amibas (Dutta, 1960).

### 1.3.1. Trofozoíto

El trofozoíto o forma móvil, es extraordinariamente pleomórfico. Se multiplica por fisión binaria y es muy sensible al jugo gástrico y a los agentes externos. Su hábitat comprende la luz y la pared del colon y específicamente el ciego y el recto (Pumarola 1991). Su tamaño es muy variable y oscila entre 10 y 60  $\mu\text{m}$ . Las formas más pequeñas corresponden a las no invasivas y se encuentran habitualmente en los casos asintomáticos (Tanyuksel, 2003). Los de mayor tamaño son las formas invasivas, que a diferencia de los anteriores no aparecen en la luz intestinal y poseen en el endoplasma restos celulares o hematíes (Tanyuksel, 2003).

El trofozoíto presenta una membrana citoplásmica dividida en dos porciones: una externa llamada ectoplasma y una porción interna denominada endoplasma (Petri, 1993). La parte periférica del trofozoíto, recibe el nombre de ectoplasma, es hialina, transparente, retráctil y casi sin granulaciones (Pumarola 1991). Los pseudópodos son prolongaciones del ectoplasma y proporcionan una movilidad al parásito de aproximadamente 50  $\mu\text{N/s}$  (Romero, 1993). El endoplasma tiene una estructura granular fina y en las formas mayores, abundantes vesículas y vacuolas, que contienen restos celulares y hematíes intactos o en vías de degradación, pero no bacterias (Pumarola, 1991).

El núcleo es esférico con un acumulo de cromatina pequeña y puntiforme en el centro, encerrados en una cápsula llamados cariosoma o endosoma (Petri 1993). También presenta cromatina adherida a la cara interna de la membrana nuclear, distribuida en forma más o menos homogénea (Romero, 1993).

El trofozoíto se nutre por fagocitosis a expensas de los tejidos disueltos y hematíes; y se ayuda de los pseudópodos. Al microscopio electrónico no se detecta aparato de golgi, microtúbulos, mitocondrias, ni retículo endoplásmico rugoso (Pumarola, 1991). Si las condiciones del medio ambiente no son propicias, el trofozoíto empieza a cambiar de forma, deja de emitir pseudópodos, el ectoplasma y el endoplasma ya no se diferencian, de manera que casi desaparece el primero, se pierde la forma irregular

y se hace esférico, al tiempo que aparece una pared gruesa llamada pared quística (Petri, 1993). También se expulsa al exterior todo el contenido de las vacuolas y empieza a formar material de reserva como vacuolas de glucógeno y barras cromatoidales. El cambio de trofozoíto concluye con la formación de un quíste (Romero, 1993).

### **1.3.2. Prequíste**

En el estado prequístico, el trofozoito tiene aproximadamente el mismo tamaño que el quíste. El citoplasma contiene inclusiones de restos celulares, pero usualmente contiene depósitos difusos de glucógeno y ocasionalmente cuerpos cromatoides. Los cuerpos cromatoides están compuestos de ribosomas; sin embargo, su papel funcional es incierto. La forma prequística es uninucleada y el núcleo es agrandado, el cual contiene un cariosoma (Pumarola, 1991).

### **1.3.3. Quíste**

El quiste o elemento infectante es redondo u oval y de 10-25  $\mu\text{m}$  de tamaño. Posee una pared lisa de 0.6  $\mu\text{m}$  y es resistente al jugo gástrico, factores ambientales externos y cifras habituales de cloro del agua (entre 0,5 y 0,2 mg/l) (Pumarola, 1991). Posee de 1 a 4 núcleos, según la fase de maduración. Los quistes jóvenes tienen 1 o 2 núcleos, algunos cuerpos cromáticos y vacuolas de glucógeno. Cuando el quiste madura, posee 4 núcleos y desaparecen los cuerpos cromáticos. Solo los quistes maduros son infecciosos. Los cuerpos cromáticos contienen principalmente ácidos nucleicos y fosfatos (Pumarola, 1991).

### **1.3.4. Metaquíste**

Durante el proceso de desenquistamiento, la amiba contiene 4 núcleos que son muy activos. La amiba tetra-nucleada escapa de la pared del quiste a través de un poro pequeño (Aguilar-Díaz, 2010). Afuera del quíste, los núcleos de la amiba tetra-

nucleada comienzan a separarse de alrededor del citoplasma y someterse a la división para formar ocho trofozoítos metaquísticos uninucleados (Luna-Nácar, et al., 2016). Los trofozoítos resultantes son siempre más pequeños que los trofozoítos presentes en el intestino de una persona infectada (Tanyuksel, 2003). Los trofozoítos metaquísticos siguen alimentándose y creciendo para colonizar el intestino (Bruckner, 1992).

#### **1.4. Epidemiología**

La Organización Mundial de la Salud reportó que *E. histolytica* causa aproximadamente 50 millones de casos y 100, 000 muertes (Gaucher, 2002) al año, principalmente en el centro y sur de América, África y la India, así como una considerable morbilidad manifestada como características clínicas intestinales o extraintestinales invasoras (Walsh, 1986).

La gran mayoría de las infecciones son adquiridas en países en desarrollo; por ejemplo, en un estudio realizado en un barrio pobre de la zona urbana de Dhaka, Bangladesh se observó que el 39% de los niños con amibiasis presentaban una nueva infección por *E. histolytica* durante un estudio de un año (Haque, 2006).

A nivel mundial, la amebiasis es la tercera causa más común de muerte debido a una infección parasitaria, después de la malaria y la esquistosomiasis. (Tanyuksel, 2003). Las infecciones por amebiasis son endémicas en la mayoría de las zonas con climas templados y tropicales en países en desarrollo (Sakata, et al., 2001). La prevalencia de la amebiasis varía en los distintos países dependiendo de las condiciones socioeconómicas (Tanyuksel, 2003). En los países industrializados, la amebiasis se produce en relaciones sexuales en hombres homosexuales, inmigrantes, turistas que viajan a zonas endémicas de infección y en individuos inmunodeficientes, VIH positivos (Watanabe, et al., 2011). La prevalencia global de la infección por *E. histolytica* en los países industrializados, como los Estados Unidos, se ha estimado alrededor de un 4% por año a pesar de la presencia de algunos grupos de alto riesgo (Gunther, et al., 2011). Los estudios epidemiológicos han demostrado que el bajo nivel

socioeconómico y las condiciones insalubres son factores significativos de riesgo (Tanyuksel, 2003). Además, las personas de edad temprana que viven en países en desarrollo tienen un mayor riesgo que aquellas que están en regiones desarrolladas (Fleming, et al., 2015). Por ejemplo, en México, 11% de la población estudiada de 5 a 9 años fueron positivos para la infección, siendo el porcentaje superior en las niñas (9,34%) (Caballero-Salcedo, et al., 1994). Investigaciones sero-epidemiológicas de la amebiasis en algunas zonas tropicales de México indican que, mientras que la prevalencia de anticuerpos anti-amebianos es relativamente baja en zonas donde la transmisión de la epidemia no se ha informado, durante las epidemias una tasa de incidencia del 50% es común, llegando a 80% en caso de epidemia (Choudhuri, 1991). En los países desarrollados como Italia, Japón, y Estados Unidos, la prevalencia de la infección por *Entamoeba* es entre el 4 y 21% en los hombres que practican sexo oral-anal con otros hombres, pero la mayoría de las infecciones se deben a la especie no invasiva, *E. dispar*, que no requiere tratamiento (Tanyuksel, 2003).

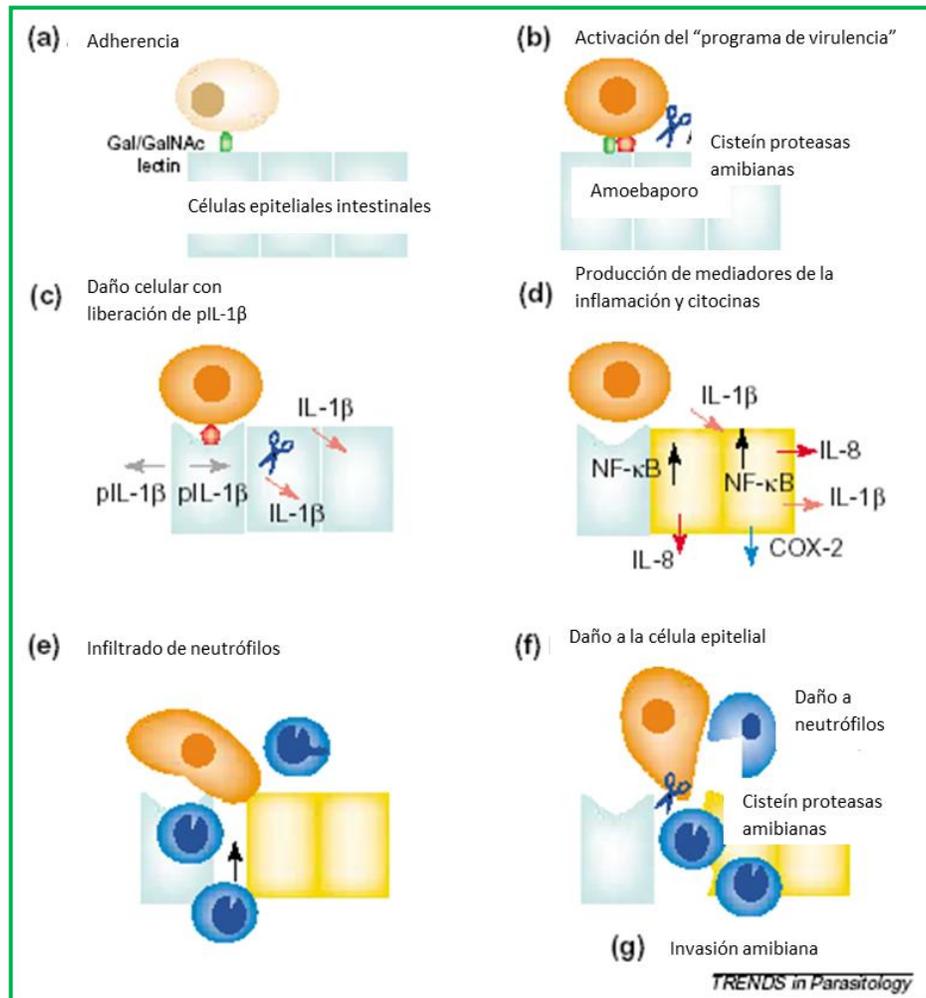
### **1.5. Mecanismos de patogenicidad y virulencia**

Mucho se ha avanzado en el conocimiento de la biología de *E. histolytica*, a partir de la aparición de los primeros medios sintéticos para su cultivo y su posterior perfeccionamiento, sin embargo, el papel de la respuesta inmune en el control de la enfermedad no está bien establecido, menos aún el singular comportamiento del parásito observado por décadas, que con frecuencia actúa, como comensal y más raramente como invasor. En general, la capacidad patogénica depende entre otras cosas, de las sustancias tóxicas que libera, ya sea enzimas o citotoxinas, de su asociación con otras bacterias, y del estado inmunológico y nutricional del huésped (Cornick y Chadee, 2017).

Aunque el término "patogénesis", definido como los mecanismos implicados en el inicio, evolución y resultado final de un proceso patológico, se refiere tanto a factores del huésped y del parásito, nos centraremos en los mecanismos parasitarios que pueden estar relacionados con la amebiasis invasiva.

## 1.6. Procesos involucrados en la patogénesis

En la actualidad se han identificado diferentes moléculas asociadas a la virulencia del parásito (Figura 1) como son las lectinas, las proteasas, las toxinas y las lipasas.



**Figura 1.** Proceso patogénico en *E. histolytica*. Extraído y adaptado de Hanley S. Trends in Parasitology 17:280, 2001.

### **1.6.1. Adhesión**

Para que ocurra la invasión intestinal por los trofozoítos de *E. histolytica* es necesario el contacto célula-célula y la adherencia a las células del huésped, mediante moléculas de superficie del parásito llamadas adhesinas (Canales-Trevino, 1986). Éstas se adhieren a las células epiteliales de la mucosa intestinal y a las células inflamatorias (Leroy, 2000). Durante este proceso se da una interacción entre las lectinas Gal / GalNAc del parásito con glicoproteínas (mucina) que se encuentran en el moco en la luz intestinal del hospedero, que son ligandos de alta afinidad para la lectina amibiana (Tanyuksel, 2003). Las lectinas son glicoproteínas, que reaccionan con los azúcares de las paredes celulares. La lectina Gal/GalNAc facilita la adherencia a la célula diana (Figura 1), la resistencia al complemento y la citotoxicidad (Haque, 2001).

Las cepas virulentas de *E. histolytica* contienen varias lectinas, de las cuales dos lectinas de superficie están fuertemente relacionadas con la virulencia del parásito. La lectina de 170 kDa está unida a la membrana y tiene una especificidad de para los oligosacáridos de N-acetil glucosamina (GlcNAc), mientras que la lectina de 220 kDa tiene afinidad por la galactosa y por la N-acetilgalactosamina (Gal / GalNAc). (Meza, Cazares et al., 1987).

### **1.6.2. Fagocitosis**

La fagocitosis se caracteriza por la ingestión de restos celulares, células vivas, fragmentos inertes y eritrofagocitosis. Existen mecanismos moleculares muy específicos donde intervienen proteínas de superficie (Arroyo, 1987), cisteína proteasas (CPs) (Ankri, 1998) y componentes del citoesqueleto (Nakada, et al., 2009). La fagocitosis es acompañada por la formación del fagolisosoma (Stuart, 2005) dirigido por GTPasas de la familia Rab, que actúan como moduladores en la regulación de la fusión vesicular con las membranas de la célula blanco (Kuldeep y Sunando, 2017).

El citoesqueleto de *E. histolytica* le permite realizar dos funciones importantes relacionadas con la patogénesis: la locomoción y la fagocitosis. Esto se logra mediante la polimerización de la actina, la cadena pesada de la miosina II y un conjunto de proteínas ligadoras de calcio, además de otros mecanismos de señalización intracelular (Meza, 2006). La lectina Gal / GalNac, a través de una serie de cinasas transmembranales relacionadas, induce cambios estructurales en el trofozoíto y en la célula blanco a través de mecanismos no identificados, para formar una placa de anclaje (Goldston, et al., 2012). Después, la miosina pesada tipo II y la actina interactúan “contrayendo” el trofozoíto, que de esta manera avanza. Durante el proceso de fagocitosis, el reconocimiento de la célula blanco depende nuevamente de la lectina (Ralston, 2015). Así, el trofozoíto penetra rápidamente por la mucosa y la submucosa, extendiendo la invasión a capas más profundas. Las cisteínas proteasas juegan un papel importante en esta etapa, dado que permiten degradar casi todos los componentes de la matriz extracelular y su actividad depende de la virulencia del trofozoíto (Que y Reed, 2000). Los principales componentes destruidos por las proteasas son laminina, colágeno tipo I y IV, y fibronectina (Perreault, et al., 1998). A medida que avanza la invasión, la úlcera se extiende profundamente en un área mayor de la submucosa, dado que el tejido subyacente al epitelio intergranular ofrece menor resistencia, lo que da lugar a las típicas úlceras en botón (Romero-Díaz, 2007). Para obtener el hierro necesario para su supervivencia, el trofozoíto procesa los eritrocitos fagocitados por medio de hemoglobinasas (Romero-Díaz, 2007).

### **1.6.3. Lisis**

La lisis de las células epiteliales ocurre a través de la acción del amebaporo y de la degradación de la matriz por acción de cisteína proteasas y otras enzimas líticas (Carrero, 2007). Varias proteínas que forman el poro amebiano (30, 14 y 5 kDa) se han descrito. Una proteína amebiana de 30 kD se purificó y se demostró que participa en la lisis de los eritrocitos insertándose en la bicapa lipídica y creando poros (Leippe, et al., 1991). Otra proteína de 14 kDa que forma poros fue descrita como la proteína

que forma el canal iónico (Leippe, et al., 1991). De éstos, la proteína de 5 kDa, es la más importante y principal formadora del amebaporo (Leippe, et al., 1991). Esta proteína está compuesta por 77 aminoácidos, incluyendo 6 residuos de cisteína. Al igual que otros polipéptidos que penetran la membrana, también tiene una conformación helicoidal (Leippe, et al., 1992).

Las cisteína proteasas (CPs) se sabe que son importantes para la patogénesis de *E. histolytica* al degradar proteínas extracelulares (Singh, et al., 2004). Se han identificado aproximadamente 20 genes, que codifican para CPs (Bruchhaus, et al., 2003) y se ha demostrado que la expresión diferencial de estos 20 genes varía entre *E. histolytica* y *E. dispar*, explicando al menos un mecanismo que permite a *E. histolytica* invadir al huésped (Stauffer, et al., 2003).

#### **1.6.4. Invasión**

Después de la adherencia a la célula huésped a través de la lectina Gal /GalNAc prosigue un proceso de invasión (Figura 1). Se entiende que la invasividad es la capacidad de destruir localmente los tejidos colonizados, en este caso depende de la liberación de CPs, del amebaporo, de las colagenasas, de las fosfatasa acidas y de otras enzimas hidrolíticas (Espinosa-Cantellano, 2000); (Ackers, 2006).

La invasión es seguida por un proceso de inflamación agudo que recluta neutrófilos, células plasmáticas, eosinófilos, macrófagos y linfocitos, los cuales contribuyen al daño tisular por liberación descontrolada de sus productos tóxicos (Olivos-Garcia, 2004).

La mucosa es destruida y el parásito se propaga en el tejido, formando una típica úlcera, asociada con diarrea conteniendo moco y sangre (Hughes 2000). Posteriormente, puede producirse la diseminación de los trofozoítos a diferentes órganos y tejidos (Espinosa-Cantellano, 2000).

## 1.7. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune

Durante el curso de la invasión en el colon o la dispersión hacia el hígado, los trofozoítos de *E. histolytica* están en continua exposición con el sistema del complemento. Los trofozoítos activan la vía clásica y alterna del complemento en la ausencia de anticuerpos anti-amibianos a través de una CP de 56 kDa (Reed, 1990). Esta CP degrada a las fracciones C3, C4, C5 y C9, evitando así efectos fisiológicos de anafilatoxinas C3a, C5a, así como el incremento de la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso; de igual manera generan la supresión de la proliferación de las células T, además de limitar la quimiotaxis de los neutrófilos (Reed, 1989).

Por otra parte, se ha descrito que la lectina Gal/GalNac inhibe también el ensamblaje de C8 y C9 del complemento de ataque a la membrana C5b-9, lo que impide la lisis del parásito mediada por el complemento (Braga, 1992).

Otro mecanismo de evasión de la respuesta inmune usado por *E. histolytica*, es la digestión proteolítica de anticuerpos IgA e IgG por proteasas (Kelsall, 1993). Los anticuerpos IgA se desarrollan durante el episodio de infección intestinal, previo y/o concomitante con el episodio hepático, es decir invasivo, donde se sintetizan anticuerpos IgG. Sin embargo, el problema básico que el paciente tiene es que aunque la cantidad de anticuerpos específicos IgA e IgG contra la amiba aumentan, estos son por un lado degradados por las proteasas amibianas y por otro removidos de su superficie. Lo anterior sucede a través del recambio membranal del trofozoíto, mediante la formación del casquete, se deshace de los anticuerpos unidos a su membrana, evitando así su acción (Calderon, 1980).

*In vitro* e *in vivo*, algunos parásitos internalizan los complejos inmunes de la membrana y recuperan su forma y movilidad al cabo de dos horas y ya no se inmovilizan al ser re-expuestos al suero inmune (Biagi, 1966) (Cole, 1953); (Neal, 1971).

Por otro lado, varios estudios han documentado que la amiba interfiere en la actividad anti-amibiana de los neutrófilos, interrumpiendo las actividades de la NADPH oxidasa,

y resistiendo a través de la peroxirredoxina de 29 kDa (Guerrant, 1981) (Arbo, 1990). También se ha demostrado *in vitro* que *E. histolytica* también puede inducir la apoptosis de los neutrófilos, siendo este mecanismo un importante evento en la resolución de la inflamación y por lo tanto de la sobrevivencia del parásito (Sim, et al 2005). Sim y colaboradores en el 2005, investigaron los aspectos ultraestructurales de la muerte de neutrófilos provocada por *E. histolytica*, al incubar neutrófilos humanos de sangre periférica, en ausencia o presencia de trofozoítos de *E. histolytica*. Las evidencias de microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostraron que los neutrófilos incubados con *E. histolytica* se observaron con características de apoptosis, tales como la compactación de la cromatina y condensación de la envoltura nuclear. Por el contrario, los neutrófilos incubados en ausencia de la amiba tenían protuberancias en la superficie celular y heterocromatina nuclear irregular. Estos datos sugieren que la apoptosis de neutrófilos inducida por *E. histolytica* contribuye a prevenir la inflamación de los tejidos, limitando los daños en las lesiones donde la amiba invade (Sim, 2005).

### **1.8. Muerte celular programada (MCP) o "suicidio celular".**

Los eventos como la división (mitosis), especialización (diferenciación) o la muerte celular son tres opciones para cualquier célula. Para retener una armonía funcional en la cantidad de células, el equilibrio entre estos procesos es necesario. La muerte celular se puede realizar por diferentes fenómenos, como la necrosis y la muerte celular programada (MCP).

La destrucción celular es un proceso habitualmente considerado como terminal, ligado a la enfermedad y a la muerte del organismo, y descrito generalmente como muerte por necrosis (Elmore, 2007). Sin embargo, desde hace más de 40 años se conoce que durante el periodo del desarrollo ontogénico, muchas células mueren en beneficio del propio desarrollo del organismo y que las características morfológicas y bioquímicas de este proceso difieren de las de la necrosis. Este diferente mecanismo de muerte "altruista" está determinado genéticamente, y se le conoce como muerte celular

programada o apoptosis (del griego, "el caer de las hojas de un árbol") (Van Furth, 1998).

Diversas patologías, como cáncer, autoinmunidad, neurodegeneración y las lesiones pueden ser el resultado de demasiada o muy poca muerte celular (Elmore, 2007). Las formas morfológicas diversificadas de muerte celular pueden ser atribuido, en parte, a distintas características mecánicas / inmunológicas, bioquímicas y eventos moleculares (Suzanne y Steller, 2013).

Por otro lado, la MCP sirve como una parte integral de las interacciones huésped-patógeno desde microorganismos; por ejemplo, el parásito puede secuestrar el suicidio celular controlando genéticamente el de sus células anfitrionas, desencadenándolo, retrasándolo o incluso previniéndolo (Saeed, et al., 2017). Claramente, entender cómo los parásitos y las células anfitrionas se ocupan de la muerte celular, podría permitirnos manipular profiláctica y terapéuticamente ellos en el proceso infeccioso (Saeed, et al., 2017).

Las características principales de la apoptosis son la formación de protuberancias en la membrana plasmática, redondeo y contracción celular, condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo, liberación de citocromo c de la mitocondria en el citosol y dentro de los cambios bioquímicos están la acidificación del pH intracelular, la exposición de fosfatidil-serina en la superficie celular (señal de inicio) para desencadenar fagocitosis y una respuesta anti-inflamatoria, además de la escisión proteolítica de varios sustratos intracelulares (He, et al., 2009). Estas características son el resultado de la operación de un complejo de vías que implican diferentes tipos de proteínas (Hengartner y Bryant, 2000).

Hay diferentes tipos de señales generales que inician la MCP, incluidas: a) las señales de estrés intracelular que resultan en permeabilización de la membrana mitocondrial; y b) la presencia de ligandos extracelulares que se integran a los receptores de muerte, como la estimulación del receptor Fas o el receptor del TNF (TNFR) con estímulos apoptóticos, tales como perforina y granzimas (Ewen, et al., 2012). Hay un entrecruzamiento de las vías mitocondriales y las del receptor de muerte; por ejemplo, mediante la escisión de caspasa-8 de la proteína Bid y el regulador de la muerte

celular Smac / DIABLO (activador de caspasas derivado de mitocondria secundaria / proteína de unión IAP directa con bajo PI) (Barras, et al., 2011). Durante la apoptosis, Smac / DIABLO mitocondrial bloquea a los inhibidores de las proteínas de apoptosis (IAP), rompiendo así el freno de la MCP y activándola (Barras, et al., 2011). En general, hay dos vías por las cuales las proteasas de la familia caspasa puede ser activadas: una es la muerte inducida por la señal, mediada por el receptor de muerte, y la otra es la inducida por el estrés, mediada por mitocondria (es decir, vía dependiente de la caspasa 9) (Ting-Jun FAN, 2005):

### **1.8.1. Estimuladores externos de muerte, "Vía del receptor de muerte"**

Los ligandos extracelulares, como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), la linfotoxina (TNF- $\beta$ ) o el ligando Fas (FasL) interaccionan proteínas de membrana: receptores TNF y Fas (CD95) respectivamente. Las proteínas adaptadoras, dominio de muerte asociado a Fas (FADD) y dominio de muerte asociado a TNFR1 (TRADD) involucran a las caspasas-8 y -10 a construir el complejo de señalización inductor de muerte (DISC) en el receptor. De este modo, la activación río abajo de la caspasa-3, la cual acelera la fragmentación del DNA a través de una cascada de reacciones (Petter y Krammer, 2003).

### **1.8.2. Estimuladores internos de muerte, "Vía mitocondrial"**

El término "especies reactivas de oxígeno" (ROS) tiende a ser utilizado para referirse al reactivo molecular derivado de moléculas de oxígeno y radicales libres, incluyendo superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo e ion hidroxilo, mientras que las especies reactivas de nitrógeno incluyen al óxido nítrico. Las proteínas Bak y Bax, miembros de la familia Bcl-2, juegan un papel crucial en el exterior mitocondrial y en la permeabilización de la membrana (MOMP) (Dewson y Kluck, 2009). Se ha demostrado que las ROS mitocondriales (mROS) desempeñan un papel en procesos celulares, incluyendo diferenciación, autofagia, adaptación metabólica y activación de células inmunes, en respuesta a diversos estímulos; por ejemplo, el ligando de

inmuno-receptores, estimulación de citocinas e hipoxia (Sena y Chandel, 2012). Los mROS causan daño interno y el citocromo C (cyto C) mitocondrial se libera al citosol y se une al factor de activación de proteasa apoptótica-1 (Apaf-1) para formar apoptosoma, que moviliza las caspasas iniciadoras, como pro-caspasa-9 (forma inactiva) a caspasa-9 (forma activa) resultando en la activación proteolítica de las caspasas ejecutoras, como caspasa-3 (Kaushansky, et al., 2013). El resultado final es la degradación del inhibidor de la DNasa (I-CAD) activada por caspasa-3, que a su vez conduce a la degradación del DNA nuclear por la DNasa activada por caspasa (Kaushansky, et al., 2013). Estos eventos contribuyen a los cambios característicos de las células apoptóticas, incluyendo la externalización del residuo de fosfatidilserina (PS) (Begum, et al., 2015).

## **1.9. Moléculas implicadas en el proceso de apoptosis: efectores intracelulares**

La apoptosis es un mecanismo evolutivamente conservado (Shi Y, 2002). Se ha demostrado que los mecanismos moleculares de la apoptosis dependen primordialmente de una familia de proteasas que tienen la característica de tener en su secuencia una cisteína en el sitio activo, la cual va a romper los enlaces peptídicos de los residuos de ácido aspártico en las moléculas diana (Hawkins, et al., 2000). Por eso, las proteínas que inician la apoptosis se denominan caspasas (cisteinil-asparato proteasas).

### **1.9.1. Familia de proteínas Bcl-2**

La familia de proteínas Bcl-2 incluye tanto miembros inductores como inhibidores de apoptosis (Antonsson B, 2001). Los miembros de esta familia se caracterizan por poseer dominios homólogos a Bcl-2 conocidos como dominios BH, los cuales se enumeran del 1 al 4. Según la presencia de estos dominios, estas proteínas se dividen en tres subfamilias: una con miembros de función anti-apoptótica denominada subfamilia Bcl-2 que incluye a los miembros Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1 y A1, todos con los cuatro dominios BH, y dos subfamilias de miembros pro-apoptóticos: la subfamilia

Bax que incluyen a Bax, Bok y Bak con tres dominios BH y la subfamilia BH3 que incluye a Bim, Bid, Bmf, Bad, Hrk, PUMA y NOXA que como su nombre lo indica sólo poseen un dominio BH3 (Becerra, 2009).

### **1.9.2. La familia de las caspasas**

Las caspasas son una familia muy regulada y bien conservada de cisteína proteasas intracelulares. Las caspasas implicadas en la apoptosis se dividen generalmente en dos categorías: las caspasas iniciadoras, que incluyen a la caspasa-2, 8, 9 y 10, y las caspasas efectoras, que incluyen a la caspasa-3, 6 y 7. La tercera subfamilia de caspasas es la de las caspasas procesadoras de citocinas, las cuales son caspasa-1, 4, 5, 12, 13, 14 (Earnshaw W.C, et al., 1999). Una vez que se activa la caspasa iniciadora, los procesos de caspasas efectoras, río abajo son responsables de la apoptosis (Shi Y, 2002). Dado que la señalización de apoptosis mediada por caspasas es irreversible, la activación de procaspasas y caspasas deben ser reguladas en forma precisa para prevenir la muerte no deseada de la célula (Lu, 2008).

Se ha descrito que la caspasa-1, que se activa por la ausencia de factores de crecimiento, hidroliza *in vitro* a la caspasa-3 y promueve el procesamiento y activación de la interleucina-1b (IL-1b), sustancia implicada en la muerte neuronal (Li, M 2000). En cuanto a la caspasa-2, se sabe que se activa tras su unión a una molécula adaptadora que a su vez se une a una parte del complejo de señalización del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF). La caspasa activa puede procesar su propio precursor (Fuentes-Prior, 2004).

La caspasa-9, que en situación fisiológica se encuentra en su forma inactiva en el citosol, se activa tras la salida de citocromo c desde la mitocondria (Liu, X 1996; Zou H, 1997). Ante un determinado daño se produce una alteración en la membrana mitocondrial que desencadena la salida de citocromo c al citosol. El citocromo c forma entonces un complejo con el factor activador de proteasa (Apaf-1), dATP y procaspasa-9, lo que conduce a la activación de la caspasa. Una vez activa, la caspasa-9 puede activar otras caspasas (Rodriguez y Lazebnik, 1999).

Las caspasas-3, 6 y 7 son las principales responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas (Earnshaw W.C, et al., 1999). Entre sus sustratos se encuentran un factor responsable de la fragmentación del DNA (Martinvalet, et al., 2005). Además, las caspasas rompen a la poli ADP-ribosa polimerasa (PARP), molécula implicada en la maquinaria celular que repara el daño en el DNA, activan la vía que conduce a la condensación de la cromatina y participan en la destrucción de la lámina nuclear y de las proteínas del citoesqueleto (Ravichandran K.S, 2007).

Si bien la importancia de las caspasas en la apoptosis se ha establecido claramente, no son el único grupo de proteínas celulares involucrado en la regulación y ejecución de la MCP, los estudios han indicado que varios otros tipos de proteasas también pueden desempeñar un papel en la ejecución de la apoptosis (Sarastea y Pulkic, 2000). Las proteasas no caspasa más estrechamente relacionadas con la apoptosis son las calpaínas (Altnauer, et al.,2004; Wu, J, et al.,2006), catepsinas, granzimas (Darmon, et al 1995) y el proteasoma (Low, 2006).

### **1.9.3. Calpaína y MCP**

Las calpaínas son un grupo de cisteína proteasas no lisosómicas dependientes de  $Ca^{2+}$  que se han identificado en casi todos los eucariotas y bacterias, pero no en las arqueobacterias (Masoumeh, et al., 2018). Entre los 15 miembros de la familia de las calpains encontrados en humanos, las calpaínas ubicuas 1 y 2 son las más intensamente estudiadas (Goll, et al., 2003). Las calpaínas han sido involucradas en diversos procesos fisiológicos, como proliferación celular, progresión del ciclo celular (Glading et al., 2002), transducción de señales (Carafoli et al., 1998), migración celular, remodelación citoesquelética (Zhang et al., 2011) y en la regulación de la muerte celular (Squier MK et al., 1994; Tagliarino et al., 2001; Harwood et al., 2005). De hecho, la calpaína fue la primera proteasa identificada en el inicio de la apoptosis (Squier MK et al., 1994). Varios estudios han destacado notablemente la estrecha relación entre estas proteasas y las caspasas. Las calpaínas 1 y 2 escinden varios miembros de la familia de las caspasas, activando las caspasas-3, -7 y -12 e

inactivando las caspasas-8 y -9 (Chua BT et al., 2000; Nakagawa T y Yuan J, 2000). Al regular las caspasas, las calpaínas pueden controlar indirectamente la apoptosis. Además, en situaciones de afluencia masiva de calcio, transección de membrana o lesión por isquemia / reperfusión, las calpaínas ubicuas se activan y a su vez desencadenan la activación de la caspasa-3 (Wang, 2000).

Además de los eventos morfológicos típicos relacionados con los cambios nucleares y de membrana, la apoptosis acompaña a una reorganización dramática del citoesqueleto debido a la proteólisis selectiva de sustratos celulares vitales (Kerr et al., 1972). Por lo tanto, la proteólisis regulada por calpaínas es necesaria para el control de procesos celulares fundamentales que incluyen la remodelación del citoesqueleto y la activación de cascadas proteolíticas que conducen a la apoptosis (Saido et al., 1994).

Las calpaínas son proteínas heterodiméricas que constan de dos subunidades de 80 y 28 kDa (Croall y Ersfeld, 2007). La subunidad grande en calpains clásicas consta de cuatro dominios conservados: una hélice de anclaje N-terminal (Nter), un dominio central de proteasa catalítica (CysPc) con los dos subdominios PC1 y PC2, un dominio de tipo C2 (C2L) y un dominio de penta EF-hands (PEF).

Las calpaínas atípicas o no convencionales se describen como proteínas de tipo calpaína que solo contienen la firma consenso CysPc con variaciones en la tríada catalítica y no está presente ningún dominio PEF, también pueden contener dominios adicionales en combinación con CysPc (Sorimachi et al. 2010).

Las proteínas de tipo calpaína no clásica se han encontrado principalmente en invertebrados y eucariotas inferiores. En *Trypanosoma* sp. y *Blastocystis hominis*, las proteínas tipo calpaína se han involucrado en el ciclo de vida, el proceso de diferenciación y la regulación de la MCP (Hertz-Fowler et al., 2001; Yin et al., 2010; Giese et al., 2008).

### **1.10. MCP en parásitos protozoarios**

Se ha acumulado una creciente evidencia experimental que sugiere que procesos similares a la MCP también parecen existir en muchos organismos parásitos unicelulares, como *Plasmodium* sp. (Al- Olayan et al., 2002; Chang et al., 2010), *Toxoplasma gondii* (Peng et al., 2003), *Trichomonas vaginalis* (Chose et al., 2002), *Giardia lamblia* (Ghosh et al., 2009) y *E. histolytica* (Villalba et al., 2007). La MCP es un factor importante para la selección clonal, para la evasión de la respuesta inmune y para controlar la población tamaño de los microorganismos, todos estos procesos de importancia en el contexto de la patogenia de una enfermedad (Bruchhaus et al., 2007).

En protozoarios, el patrón de eventos de la MCP es similar al observado en las células de metazoarios, ya que se comparten eventos como la destrucción de la organización estructural normal del núcleo debido al colapso de la cromatina en masas electrodensas y, en muchos casos, la ruptura del DNA nuclear en fragmentos oligonucleosomales (Tabla 1). Se considera que la falta de regulación en la homeostasis del calcio conlleva a importantes eventos de muerte celular en los parásitos, ya que la mayoría muere en presencia de concentraciones altas de calcio más que en ausencia de este ión (Fernández-Presas, 2000).

**Tabla 1.** MCP en diferentes parásitos protozoarios.

<b>PARÁSITOS PROTOZOARIOS</b>	<b>SEÑAL DE LA MCP</b>
<b><i>PLASMODIUM SPP.</i></b>	Fragmentación de DNA Exposición de fosfatidilserina Desintegración parasitaria
<b><i>LEISHMANIA SPP.</i></b>	Condensación de la cromatina Fragmentación del DNA Liberación de citocromo C Exposición de fosfatidilserina Activación de proteasas
<b><i>TRYPANOSOMA CRUZI</i></b>	Fragmentación del DNA Condensación de la cromatina Pérdida del potencial transmembranal mitocondrial Activación de proteasas
<b><i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i></b>	Condensación de la cromatina Fragmentación del DNA Cuerpos apoptóticos
<b><i>GIARDIA LAMBIA</i></b>	Condensación de la cromatina Fragmentación del DNA Cuerpos apoptóticos Vacuolización citoplasmática
<b><i>BLASTOCYSTIS HOMINIS</i></b>	Vacuolización citoplásmica Fragmentación del DNA Contracción celular
<b><i>DYCTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i></b>	Vacuolización Condensación de la cromatina Condensación citoplásmica Degradación del DNA Exposición de fosfatidilserina Condensación de la cromatina

## **E. HISTOLYTICA**

Fragmentación del DNA

Incremento de  $Ca^{2+}$  citosólico

Disminución de  $K^{+}$  intracelular

A continuación, se describen evidencias de la MCP en algunos parásitos:

### **1.10.1. MCP en *Leishmania* sp.**

*Leishmania* sp. son parásitos protozoarios miembros del orden *Kinetoplastida*. Son los agentes causantes de parasitosis en humanos que pueden conducir, de acuerdo a la especie, desde lesiones mucocutáneas hasta infección visceral generalizada (de Morais, et al., 2015). La forma promastigote del parásito, flagelado y extracelular, reside en el intestino medio del insecto vector, la hembra de flebótomo (*Phlebotomus*). Se diferencia de una proliferación procíclica no infecciosa a promastigotes metacíclicos infecciosos que no se dividen. Después de la picadura por el mosquito, el parásito infecta a los macrófagos del huésped mamífero y se diferencia en amastigotes que pueden sobrevivir y dividirse en los fagolisosomas de los macrófagos (Zangger, et al., 2002).

La carencia de nutrientes es uno de los factores que activan la MCP de *Leishmania* sp. (Lee, et al., 2002). Los cultivos estacionarios de promastigotes (en el intestino del insecto) y amastigotes (en los vertebrados) de diferentes especies de *Leishmania* mostraron un patrón de fragmentación del DNA en múltiples tamaños oligonucleosomales, siendo esta consistentemente más fuerte en los promastigotes de *L. donovani* que los amastigotes, sugiriendo que los promastigotes son más susceptibles a la fragmentación del DNA que los amastigotes, resultado de la falta de nutrientes (Lee, et al., 2002).

Además, hay estudios que evidencian la MCP en respuesta a las drogas. Lee y colaboradores (2002), demostraron que durante la MCP de *L. donovani* inducida con pentostam o anfotericina B, se presentó la fragmentación del DNA en el núcleo, la

externalización de fosfatidilserina, la disminución del potencial de membrana, así como la probable activación de caspasas. Como ya se ha mencionado, la fosfatidilserina (PS) es una proteína que se localiza en la superficie de las células apoptóticas, éstas, son reconocidas por fagocitos vecinos participando en eliminación de la inflamación (Fadok, et al., 2001). Una característica ventajosa del proceso y que resulta un concepto interesante es que la apoptosis puede funcionar sin la muerte (Elmore, 2007). *Leishmania spp.* es capaz de evadir la actividad de los fagocitos y ellos mismos establecerse como parásitos intracelulares obligados mediante la exposición de PS y la inhibición de la actividad de los macrófagos, es decir, la exposición de PS participa en la internalización de amastigotes. El reconocimiento de PS por los macrófagos induce la secreción del Factor de crecimiento (TGF- $\beta$ ), la síntesis de interleucina 10 (IL-10), inhibe la producción de NO y aumenta la susceptibilidad del crecimiento intracelular de *Leishmania* (Freitas, et al., 2001).

Estudios realizados por Moreira (1995) han demostrado que la muerte de promastigotes de *L. amazonensis* se encuentra modulada por iones de calcio, ya que en los promastigotes sometidos a choque térmico se induce un incremento de tres a cuatro veces los niveles de calcio. Se ha encontrado, en cerca de 20% de estos parásitos, un patrón de rompimiento de DNA internucleosomal típico y características morfológicas sugerentes de MCP (Jiménez-Ruiz, et al., 2010; Basmacıyan, et al. 2018). Las lesiones tipo apoptóticas observadas en *Leishmania sp.* son claramente de origen nuclear y escasamente se observan en los organelos citoplásmicos, incluyendo el mitocondrion (Moreira, et al., 1995). En la MPC inducida por choque térmico también se ha observado una separación extensa entre el cuerpo y la membrana flagelar, patrón distinto al observado en promastigotes, que mueren por necrosis (Menna-Barreto, et al., 2015). Finalmente, se ha señalado que las endonucleasas dependientes de  $Ca^{2+}$  responsables de la apoptosis actúan exclusivamente en el núcleo, lo cual concuerda con el hallazgo de que el mitocondrion se encuentra intacto cuando las alteraciones nucleares ya son detectadas (Moreira, et al., 1995).

Una de las ventajas evolutivas conferidas por la MCP podría incluir la selección constante de los parásitos más aptos, y la estricta regulación del ciclo celular y la diferenciación celular en respuesta a los cambios ambientales (Chandrima, 2006).

### **1.10.2. MCP en *Trypanosoma sp.***

Se ha observado que *Trypanosoma cruzi* tiene la capacidad de autorregular su crecimiento. Los epimastigotes de *T. Cruzi* proliferantes en cultivo, sufren la MCP masiva durante la diferenciación de las fases G0/G1, deteniendo a los parásitos en la fase de tripomastigotes (fase estacionaria de crecimiento) (Debrabant, et al., 2003). La muerte puede ser prevenida o acelerada mediante la modificación de las condiciones de cultivo, sugiriendo que los tripanosomas reciben señales extracelulares para la regulación de su sobrevivencia y/o diferenciación (Ameisen, 1995). La falta de renovación del medio de cultivo en parásitos crecidos en medio monofásico puede propiciar que una porción de epimastigotes se diferencie en tripomastigotes metacíclicos infectivos, mientras que un número significativo de epimastigotes muere (Ameisen, et al., 1995). Los parásitos muertos aparecen como células esféricas con un largo flagelo y muestran patrones citoplásmicos y nucleares que sugieren apoptosis, como la fragmentación del DNA en escalera (Billaut-Mulot, 1994).

La inducción de la MCP por drogas ha sido estudiada en *T. cruzi*, Deolindo y colaboradores (2005) determinaron el tipo de muerte inducida a epimastigotes de *T. cruzi* por el veneno de *Bothrops jararacá*, que es una serpiente de la familia Viperidae (Bochner y Struchiner 2003). El crecimiento del parásito fue inhibido después del tratamiento con el veneno, observándose que el 50% del crecimiento fue inhibido con 10 mg/ml. Ultraestructuralmente se observó la desorganización del cinetoplasto y del mitocondrion, además de la condensación citoplásmica y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Al aumentar el tiempo de incubación, la fosfatidilserina se expuso en la parte externa de la membrana plasmática, seguido de la activación de caspasas, y la fragmentación del DNA. Estos resultados indican que el estrés inducido

en los epimastigotes por el veneno, activa un proceso de MCP, similar a la apoptosis de los metazoos, lo que conduce a los parásitos a la muerte (Deolindo, et al., 2005).

Por otro lado, el tratamiento de *T. cruzi* con el antibiótico geneticina (G418) indujo la muerte celular de epimastigotes mostrando una localización selectiva del factor de alargamiento 1- $\alpha$  en el núcleo de los parásitos muertos (Billaut-Mulot, et al., 1996), sugiriendo la participación de este factor en la regulación genética de la MCP.

### **1.10.3. Regulación de la MCP en parásitos.**

Aunque algunos genes que podrían estar involucrados en el proceso de MCP han sido identificados, las vías operativas en estos microorganismos unicelulares no están disponibles a detalle y están saliendo lentamente a la luz a través del estudio de varios modelos que usan diferentes agentes apoptogénicos.

Una caspasa 3-like ha sido identificada en *B. hominis* (Nasirudeen y Tan, 2004) y en *Plasmodium berghei*, *P. falciparum*, *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* han sido identificadas algunas metacaspasas, cisteína proteasas estructuralmente relacionadas a las caspasas (Le Chat et al., 2007; Meslin et al., 2007; Helms et al., 2006; Kosec et al., 2006). En *L. major* y *T. brucei* una endonucleasa G, que es similar a la de eucariotas superiores, se libera de las mitocondrias cuando se desencadena la muerte celular, lo que sugiere un función pro-apoptótica (Gannavaram et al., 2008). La sobreexpresión del factor de alargamiento 1-alfa, encontrado en *T. cruzi*, ha sido sugerido que participa en la regulación de los genes involucrados en el control de la muerte celular (Billaut et al., 1996; Ouassi, 2003). Por otra parte, homólogos a prohibitina y a RACK han sido encontrados en *T. brucei* e identificadas como reguladores tardíos de la apoptosis (Welburn y Murphy, 1998). Por otro lado, la sobreexpresión de la superóxido dismutasa de hierro en *T. cruzi* (Piacenza et al., 2007), la peroxirredoxina y la centrina en *L. donovani* (Harder et al., 2006; Selvapandiyam et al., 2004), así como sir-2 en varias especies de *Leishmania*, ha sugerido esas proteínas tienen actividades anti-apoptóticas (Vergnes et al., 2002, 2005).

Interesantemente, en *Trypanosoma* sp. y *Blastocystis hominis*, las proteínas tipo calpaína están involucradas en el ciclo de vida, en el proceso de diferenciación y en la regulación de la MCP (Hertz-Fowler et al., 2001; Yin et al., 2010; Giese et al., 2008).

### 1.11. ANTECEDENTES

Un fenómeno importante en el proceso de fisiopatogénesis de *E. histolytica* es la inducción de la MCP a una variedad de células del huésped (Stauffer, 2003), incluyendo los leucocitos (Berninghausen 1997), los macrófagos y las células hepáticas (Seydel 1998). La MPC de las células blanco está mediada por mecanismos dependientes de contacto a través de la interacción de la lectina Gal/GalNac del parásito y del receptor presente en la superficie de las células del huésped (Bruchhaus, et al., 2007), permitiendo el establecimiento del patógeno y la infección, así como la evasión a la respuesta inmune.

Reportes de nuestro grupo y de otros autores, demostraron que la MCP en *E. histolytica* es inducida *in vitro* por el aminoglucósido G418, por especies reactivas de óxido nítrico, por peróxido de hidrógeno (Villalba et al., 2007; Ramos et al., 2007; Ghosh et al., 2010) y por resveratrol (Pais-Morales et al., 2016).

La inducción de la MCP por G418 se caracteriza morfológicamente por la reducción del tamaño del trofozoíto, la contracción del citoplasma, la condensación y fragmentación de cromatina, mientras que la membrana celular se mantiene integra (Villalba, 2007). Estas perturbaciones son concomitantes con cambios bioquímicos específicos, como la sobreproducción de ROS, un aumento de calcio citosólico, una disminución de la concentración intracelular de potasio y una reducción del pH intracelular (Villalba, 2007).

Posteriormente, nuestro grupo demostró que la MCP de *E. histolytica* es un proceso que involucra la expresión de genes anti-apoptóticos en fases tempranas de la inducción del fenómeno, seguido por la expresión de genes pro-apoptóticos en fases intermediarias, que dan lugar a proteínas efectoras y/o proteínas específicas de la

fase de ejecución que modulan los cambios bioquímicos, morfológicos y ultraestructurales que marcan y promueven la MCP anteriormente mencionados (Sánchez, et al., 2010)

Mediante cDNA-AFLP se buscaron genes putativos que podrían ser expresados diferencialmente durante la fase inicial de la MCP inducida por G418, usando RT Q-PCR se evaluaron los patrones de expresión de los genes encontrados (Sánchez et al., 2010). En ese estudio las graininas, mostraron un patrón de regulación positiva al comienzo de MCP (Sánchez et al., 2010). Teniendo en cuenta resultados anteriores en los que se caracteriza el fenómeno por un aumento temprano de calcio citosólico (Villalba et al., 2007), el hecho de que la expresión de graininas aumentara a los 30 minutos sugiere fuertemente que los trofozoítos están activando mecanismos moleculares que intentan recapturar el calcio citosólico libre.

Recientemente, en un modelo experimental *in vivo* se analizó la expresión diferencial global de genes implicados en la MCP de *E. histolytica* mediante microarreglos de expresión. Bajo estas condiciones, la expresión de 39 genes de *E. histolytica* disminuyó a partir de los 30 min de interacción con las células inflamatorias y aún más a los 90 min (Pérez et al., 2019). Algunos de estos genes se relacionan con mecanismos anti-apoptóticos, como las graininas, comprobando los resultados del trabajo de Sánchez et al (2010).

Por otro lado, el análisis proteómico de la MCP en *E. histolytica in vitro*, nos permitió elucidar y conocer la expresión de algunas proteínas diferenciales en las distintas fases de la MCP inducida por G418.

**Tabla 2.** Proteínas diferenciales obtenidas de los perfiles proteómicos de trofozoítos de *E. histolytica* inducidos a MCP con G418, identificadas por MALDI TOF-TOF.

ID	PROTEÍNA IDENTIFICADA
XP_001914456	Alcohol deshidrogenasa
XP_001913546	Malato deshidrogenasa
XP_649500	Adenilato cinasa
XP_650357	Grainina 2
XP_650356	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
AAA29085	Actina
XP_648054	Actina
AAA29086	Actina
P31018	Factor de elongación 1-alpha
XP_654419	Coronina
XP_655596	Aminoacil-histidina dipeptidasa
XP_652300	Alcohol deshidrogenasa
AAB49653	Piruvato: ferredoxina oxidoreductasa

En esos ensayos se observaron 12 puntos diferenciales que fueron analizados por huella peptídica y MADi TOF-TOF con la finalidad de identificar las proteínas que están participando en el proceso de apoptosis. Dentro de estas proteínas identificadas

encontramos enzimas importantes en la vía metabólica de la amiba, como el alcohol deshidrogenasa (Tabla 2).

Por otro lado, una de las consecuencias de la activación del proceso de muerte celular consiste en la fragmentación y debilitamiento de las principales estructuras celulares, como componentes del citoesqueleto (Elmore, 2007). La proteólisis de estos constituyentes probablemente contribuye al redondeamiento y retracción de la célula que es observado en los estados tempranos de la apoptosis (Taylor, et al., 2008). Este mismo fenómeno fue observado en la morfología de la amiba al entrar en apoptosis a partir de las 6 h de incubación con G418, siendo este evento muy evidente a las 12 h (Villalba et al., 2007). Proteínas del citoesqueleto como actina y coronina fueron identificadas como proteínas de expresión diferencial en el análisis proteómico realizado por nosotros, lo que confirma su papel fundamental en la motilidad de los trofozoítos (Tabla 2).

De manera muy interesante, en ese trabajo se identificó a grainina 2 como una proteína que aparece notablemente desde las primeras fases hasta las 6 h de inducción a MCP, mientras que a las 9 h de apoptosis dejó de expresarse (Tabla 2). Recordemos que grainina 2 también fue detectada con expresión diferencial durante la MCP mediante RT-PCR (Sánchez, 2010). En dicho trabajo el análisis de expresión global detectó la sobreexpresión de las graininas 1 y 2. Con estos resultados se tiene evidencia de la inducción del gen y podemos mencionar que dicha inducción claramente conduce a la síntesis de la proteína grainina 2. Por su patrón de expresión, esta proteína participa en el fenómeno de MCP de trofozoítos de *E. histolytica* durante tiempos tempranos, hasta las 6 h de apoptosis, correlacionando con el fenotipo bioquímico de la MCP, producto de la liberación del calcio intracelular (Villalba, 2007) y el fenotipo morfológico, ya que mediante microscopia electrónica se observó algunas características de apoptosis, como despolarización de la membrana, formación de vacuolas y agregados de glicógeno a partir de las 9 h (Villalba, 2007). Dichos hallazgos sugieren fuertemente que la proteína grainina 2 participa como factor anti-apoptótico en la MCP. Análisis tipo Blast y alineamientos con otras proteínas demuestran homología de grainina 2 con las calmodulinas (CaM) de otros protozoarios como *T. brucei* y *T. gondii* (Sánchez, 2010) (Tabla 3). Esas calmodulinas juegan un papel

importante en la MCP, activando mecanismos moleculares que disparan la recapturación de calcio citosólico, es decir, una respuesta compensatoria para disminuir el calcio intracelular libre (Sánchez, et al., 2010).

**Tabla 3.** Porcentajes de homología e identidad de grainina 1 y 2 de *Entamoeba histolytica* contra calmodulina de *T. brucei* y *T. gondii*. Tomado de Sánchez in Experimental Parasitology, 2010.

<b>Protein</b>	<b>Accesion number</b>	<b>Protein</b>	<b>Accesion number</b>	<b>e-value</b>	<b>H(%)</b>	<b>I (%)</b>
Grainin-1 <i>E.histolytica</i>	EHI_167300	CaM <i>T. brucei</i>	X56511	3e-08	43	26
Grainin-2 <i>E.histolytica</i>	EHI_167310	CaM <i>T. brucei</i>	X56511	3e-08	41	25
Grainin-1 <i>E.histolytica</i>	EHI_167300	CaM <i>T. gondii</i>	Y08373	2e-06	42	25
Grainin-2 <i>E.histolytica</i>	EHI_167310	CaM <i>T. gondii</i>	Y08373	4e-08	41	24

Por otra parte, las caspasas o metacaspasas no se han identificado en *E. histolytica*, aunque este parásito contiene una gran cantidad de cisteína proteasas que pueden asumir la función de las caspasas, ya que el uso de E-64, el cual es un inhibidor específico de cisteína proteasas, disminuyó drásticamente la MCP (Villalba et al., 2007). En ameba, varios tipos de cisteína proteasas se han identificado, las cuales pueden ser activadas por ligando, metales o iones (Marumo et al., 2014; Tillak et al., 2007; Clark et al., 2007). Considerando que después de la inducción de la MCP, la liberación de calcio es concomitante con la síntesis específica de proteínas *de novo* (Sánchez et al., 2010), se investigó la participación proteasas tipo calpaína en la MCP.

Como se mencionó anteriormente, las calpaínas atípicas o no convencionales se describen como proteínas que contienen solo una firma de consenso CysPc con variaciones en la tríada catalítica (Sorimachi et al., 2010). La investigación por homología dentro del genoma de *E. histolytica* reveló la presencia en este parásito de proteína de tipo calpaína atípica (calpaína-like) que contiene el dominio consenso CysPc y un dominio LIM adicional (Loftus et al., 2005; Zhao et al., 2012). El dominio CysPc presenta la tríada catalítica con los aminoácidos cisteína, histidina y asparagina, además de dos sitios de unión a calcio, lo cual define un mecanismo ancestral de activación por calcio para la mayoría de las isoformas de calpaína, incluyendo los que carecen de los dominios EF-hands (Moldoveanu et al., 2002). El dominio LIM es un dominio vinculante de zinc que mediar la interacción proteína-proteína (Michelsen, et al., 1993).

Para determinar la relevancia de esta calpaína-like en la MCP inducida por G418 en *E. histolytica* se evaluó la expresión de esta proteasa mediante RT-PCR y Western blot en trofozoítos tratados con este fármaco. En estos experimentos se observó un aumento en la expresión de calpaína desde las 3 h de incubación con G418, iniciando el marcaje de la amiba hacia la apoptosis. Además, se observó mediante ensayos de TUNEL una disminución de la fragmentación del DNA al utilizar el inhibidor de calpaína *Z-Leu-Leu-Leu-al* (Sánchez et al., 2015).

En resumen, hemos mencionado a dos proteínas que pudieran participar en el mecanismo de la MCP en *E. histolytica*; conocer el papel de ellas dentro de este evento sería una aportación importante para entender mejor la fisiopatogénesis de la amebiasis y para entender cómo se activan los mecanismos moleculares de dicho fenómeno.

## 2. JUSTIFICACIÓN

En conjunto, nuestros antecedentes sugieren fuertemente que las proteínas grainina-2 y calpaína-like podrían estar involucradas en el fenómeno de la MCP en *E. histolytica*.

Por lo tanto, conocer el papel de estas proteínas en la apoptosis podría ser importante para determinar los mecanismos moleculares en este proceso en la amiba. Lo anterior aportaría una ventaja en el desarrollo de estrategias que contribuirían a generar fármacos o terapias efectivas basadas en la activación de la muerte celular programada de *E. histolytica*.

### 3. HIPÓTESIS

Se ha demostrado que se enciende un programa genético al aumentar las concentraciones de calcio citosólico tras haber inducido la MCP con G418 en *E. histolytica*. Por lo tanto, el gen *grainina-2* se expresaría en tiempos tempranos, mientras que el gen *calpaína-like* incrementaría su expresión en fases tardías de la MCP.

Al silenciar el gen *grainina-2* se acelerará el proceso de MCP y el parásito mostrará un fenotipo más evidente de apoptosis; por otro lado, al silenciar el gen *calpaína-like* los cambios fenotípicos asociados al proceso de apoptosis disminuirán o se abatirán y el progreso de la apoptosis se alentará. De esta manera, *grainina-2* y *calpaína* actuarían como proteínas anti-apoptótica y pro-apoptótica, respectivamente.

## 4. OBJETIVOS

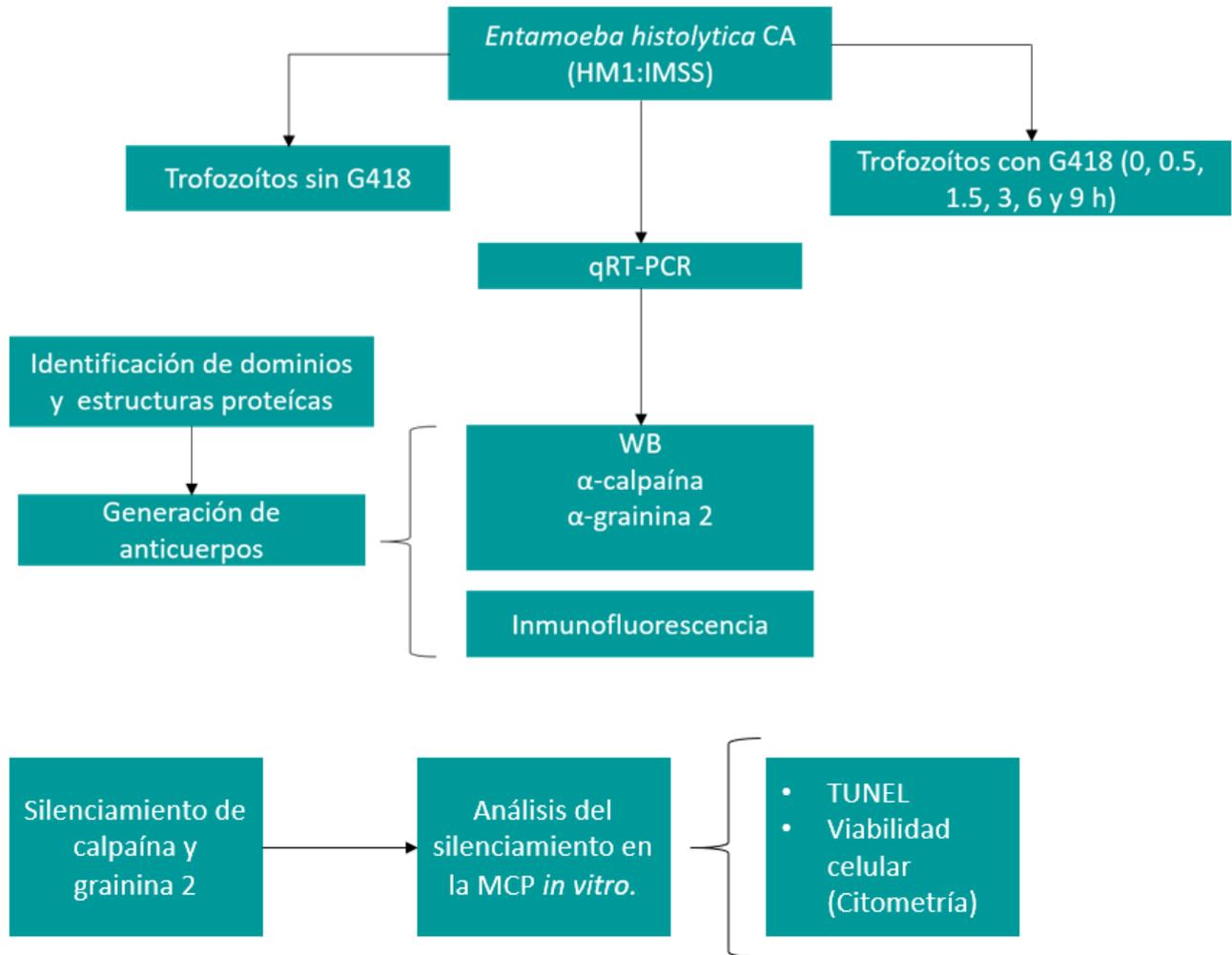
- **Objetivo General**

- Determinar el papel de grainina 2 y calpaína en la vía de MCP *in vitro*, inducida por G418 en *E. histolytica*.

- **Objetivos Específicos**

- Identificar *in silico* los dominios conservados y estructuras 3D de grainina-2 y calpaína-like.
- Analizar los cambios en la expresión de los genes y proteínas de grainina-2 y calpaína-like en la MCP *in vitro* inducida con G418.
- Localizar subcelularmente las proteínas durante la MCP inducida con G418.
- Analizar el efecto del silenciamiento de grainina-2 y calpaína-like en la MCP en *E. histolytica*.

## 5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Cultivo celular

Trofozoítos de *E. histolytica* de la clona A (Orozco, Guarneros et al. 1983), que es una clona virulenta de la cepa HM1-IMSS, se cultivaron axénicamente a 37 °C en medio TYI-33 (Diamond, Harlow et al. 1978) suplementado con 15% de suero bovino inactivado por calentamiento a 56 °C durante 30 min, 3% de una mezcla de vitaminas de Diamon (KC Biologica, USA.), 40 µl de penicilina/ml (Lakeside) y 57 µl/ml de estreptomicina (Lakeside). Una vez cultivados, los parásitos se cosecharán al alcanzar la fase logarítmica de crecimiento.

### 6.2. Inducción de la apoptosis con G418

Una vez observados los cultivos confluentes, se indujo a MCP con G418 (10 µg/ml) a diferentes tiempos de exposición con el antibiótico: 0.5, 1.5, 3, 6 y 9 h. Posteriormente, los trofozoítos se cosecharon para los diferentes experimentos.

### 6.3. Análisis *in silico* de grainina-2 y calpaína-like de *E. histolytica*

La secuencia de las proteínas grainina-2 y calpaína-like de *E. histolytica* (XP\_650357.1 y XP\_657312.1, respectivamente) se obtuvieron de la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se analizaron en la base de datos SMART ([smart.embl-heidelberg.de/](http://smart.embl-heidelberg.de/)), en el cual se predicen dominios y residuos funcionales en la arquitectura de la proteína, esto se analiza por homología con otras proteínas, Por otro lado, las estructuras 3D hipotéticas fueron predicha por el programa I-TASSER (predicción de estructura de proteínas y funciones) (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). El programa UCSF CHIMERA (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) se usó para comparar la estructura terciaria de graininia-2 con la estructura terciaria de PCDP6 de *L. major*, mientras que la estructura de calpaína-like fue comparada con la estructura terciaria de calpaina-1 de *H. sapiens* (AAH08751) y las herramientas de software PyMOL (<https://pymol.org/>) utilizado para visualizar los dominios conservados de grainina-2 tanto como de calpaína-like

(Sánchez et al., 2015). La similitud de las proteínas incluidas en nuestro estudio se comparó con los homólogos de proteínas disponibles con bases de datos no redundantes como el programa BLASTP de NCBI.

#### **6.4. Generación de anticuerpos contra grainina-2 y calpaína-like**

##### **6.4.1. Diseño de los péptidos**

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas grainina-2 y calpaína-like se analizaron mediante el programa ([http:// www.imtech.res.in /raghava /abcpred /ABC\\_submission. html](http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html)) para la predicción de epítomos en secuencias de antígenos. Se eligieron las secuencias de aminoácidos de mayor antigenicidad, posteriormente se usó el programa Protein Hydrophobicity Plots (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydrophobicity/>) con el fin de caracterizar su carácter hidrofóbico, el cual es útil en la predicción de dominios que abarcan la membrana, los posibles sitios antigénicos y regiones que probablemente están expuestas en la superficie de la proteína. Las secuencias elegidas fueron probadas mediante BLAST en el genoma de la ameba para ver la especificidad. El polipéptido KREEIDNAEFDKFNL de grainina-2 situado en las posiciones 192-207 y el polipéptido de calpaína-like CCEWKGKWRDDDDPAWT ubicado en las posiciones 230-246, se sintetizaron acoplados a la etiqueta KLH (hemocianina de lapa de ojo de cerradura) para aumentar su inmunogenicidad (GL Biochem).

##### **6.4.2. Inmunización.**

Para la inmunización se utilizaron ratones BALB/c, la inoculación de los péptidos fue por vía subcutánea e intramuscular utilizando 50 µg del polipéptido emulsionado en adyuvante Titer-Max Gold (1: 1) (Sigma). Luego, los animales se inmunizaron con dos dosis más de 100 µg del polipéptido suspendido en el mismo adyuvante a intervalos de 15 días, seguido de sangrado para obtener el suero. El suero preinmune se obtuvo antes de la primera inmunización.

Los sueros anti-grainina-2 y anti-calpaína-like se obtuvieron por punción cardíaca 10 días después de la última inmunización. Para obtener el suero la sangre se dejó media hora a 37 °C posteriormente se centrifugó a 300 xg por 5 min, después de esto, el suero final se repartió en alícuotas que se almacenaron a -20 °C hasta su uso. La alícuota en empleo se guardó a 4 °C.

El protocolo experimental fue aprobado por el comité institucional para el cuidado de animales, siguiendo la norma mexicana para el cuidado y uso de animales (NOM-062-ZOO-1999).

### **6.5. Obtención de proteínas totales**

Para la obtención de proteínas totales, los trofozoítos ( $2 \times 10^7$ ) sin tratamiento o tratados con 10 µg / ml de G418 durante 0,5, 1,5, 3, 6 y 9 h se cosecharon y se lavaron dos veces con PBS (137 mM NaCl, 2.7 KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a pH 6.8 frío y se centrifugaron a 500 xg durante 5 min a 4°C. Posteriormente, para la extracción de proteínas totales, a la pastilla se le agregaron 300 µl de amortiguador de lisis RIPA 1X (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% desoxicolato de sodio, 1% NP-40), más un coctel de inhibidores de proteasas (IP-1X) (Tris-HCl pH 7.4, 1X Complete Protease inhibitors (Roche), 1mM PMSF, 10 µM leupeptina, 25 mM N-etilmaleimida, 2.5 mM PHMB, 5 µM E-64, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM NaF, 5 mM iodacetamida), las células se lisaron de manera hipotónica durante 20 minutos a 4 ° y se agitaron utilizando vórtex durante 10 seg cada 5 minutos. Finalmente, los extractos amibianos se guardaron a -70 °C hasta su uso.

### **6.6. Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). 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, glicina 1.9 M y 0.1% de SDS. La electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 80 V por 2 h. Después de la separación de las proteínas en los geles de poliacrilamida, éstos 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, se incubaron en agitación, en una solución de metanol al 5% y ácido acético al 7% 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 con un poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore). El gel y la membrana de nitrocelulosa se equilibraron por 15 min en la solución amortiguadora de transferencia (0.25 M Tris-HCl, 1.9 M glicina 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 un cojinete de fibra "Scotch Brite" y después una capa 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 (hacia el ánodo). Posteriormente, se colocó otro pedazo de papel filtro y encima otro cojinete de fibra. Por último, la unidad se cerró y se instaló en la cámara de transferencia (BioRad), la cual contenía la solución amortiguadora de transferencia. La transferencia se realizará a 250 mA durante 2 h y cuando terminó, el gel se tiñó con azul de Coomassie para verificar la eficiencia de la transferencia, mientras que la membrana de nitrocelulosa se incubó a 37 °C en agitación por 2 h con PBS-Tween 20 al 0.5 % (Sigma) con leche descremada al 5 % (BioRad) (PBS-Tween-leche), o toda la noche para bloquear las uniones inespecíficas. Después, las membranas se incubaron a 4 °C en agitación durante toda la noche con el primer anticuerpo ( $\alpha$ -grainina-2 y/o  $\alpha$ -calpaína-like) y como control de carga, las mismas membranas se incubaron con el anticuerpo  $\alpha$ -GAPDH. Posteriormente, el exceso de anticuerpo se eliminó lavando las membranas cinco veces con PBS-Tween por 10 min a temperatura ambiente. Después, la membrana de nitrocelulosa se incubó

por 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios ( $\alpha$ -IgG de conejo,  $\alpha$ -IgG de ratón acoplados a peroxidasa) en la dilución recomendada por el proveedor en PBS-Tween al 0.05%. Posteriormente, las membranas se lavaron cinco veces por 10 min a temperatura ambiente con PBS-Tween al 0.05%. Finalmente, el reconocimiento del complejo antígeno-anticuerpo se reveló por quimioluminiscencia (ECL Plus, Amersham), de acuerdo al protocolo del fabricante.

### **6.8. Inmunofluorescencia y microscopia confocal**

Después de los tratamientos con G418, los trofozoitos ( $1 \times 10^6$ ) se colocaron en portaobjetos durante aproximadamente 20 min a 37 °C, se fijaron y se permeabilizaron con metanol al 100% durante 5 min. Los sitios de unión no específicos se bloquearon con suero de caballo al 1% durante 1 h a 37 °C. Los portaobjetos con los trofozoitos previamente bloqueados se incubaron durante la noche a 4 °C con los anticuerpos  $\alpha$ -grainina-2 o  $\alpha$ -calpaína-like (1:40), se enjuagaron con PBS tres veces, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa 488 (1: 400) durante 1 h a temperatura ambiente, y se enjuagó nuevamente tres veces con PBS. Los núcleos se tiñeron con 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (0.1  $\mu$ g/ml), y se observaron muestras en un microscopio confocal (Carl Zeiss LSM 700) utilizando el software ZEN 2009. Se eligieron aproximadamente 10 amebas al azar de cada muestra, la fluorescencia de cada ameba se representó como el valor medio de intensidad de 25 secciones ópticas desde la parte superior a la inferior de cada celda. Las imágenes fueron representativas de tres experimentos independientes.

### **6.9. Obtención de RNA total**

Para medir la expresión del mRNA, primero se extrajo el RNA total de los trofozoitos sin tratamiento y los trofozoitos expuestos a diferentes tiempos (anteriormente mencionados) con G418. Para ello,  $4 \times 10^6$  trofozoitos se empastillaron centrifugando a 700 x g durante 10 min. Inmediatamente después, las células se lisaron añadiendo 1 ml de Trizol (Invitrogen) mezclando cuidadosamente. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se realizó la extracción de RNA agregando

200  $\mu$ l de cloroformo por cada ml de Trizol. La mezcla se agitó vigorosamente por inversión durante 30 s y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min: Entonces, se centrifugó a 18 000 x g durante 15 min a 4°C, se recuperó la fase superior, la cual se transfirió a un tubo nuevo. A esta mezcla se le adicionó 0.5 ml de isopropanol frío por ml de Trizol, se agitó suavemente por inversión y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Enseguida se centrifugó a 1 500 x g durante 10 min a 4°C, obteniendo una pastilla gelatinosa, la cual se lavó una vez con etanol 75%, preparado con agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC). La muestra se centrifugó a 7 000 x g durante 5 min a 4°C y la pastilla de RNA se secó a temperatura ambiente. Finalmente, el RNA de la pastilla se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua tratada con DEPC (agua DEPC).

#### **6.10. Electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes**

El análisis de la integridad y pureza del RNA obtenido se realizó mediante electroforesis de geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes, debido a que la molécula de RNA está sujeta a formar extensas estructuras secundarias, lo cual afecta a su migración en los geles. Así, se prepararon geles desnaturalizantes al 1.5% en 25 ml, para esto, 0.375 g de agarosa se disolvió en 18.5 ml de agua DEPC, la mezcla se fundió por ebullición y se dejó enfriar hasta 40°C. En ese momento se le adicionaron 2.5 ml de MOPS 10X (0.2 M MOPS, 50 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA- $\text{Na}_2$  pH 7.0) y 4.4 ml de formaldehído al 38%. Enseguida la mezcla se vertió en el molde para geles. Por otra parte, a la muestra de RNA (50 ng) se le agregaron 5  $\mu$ l de amortiguador de desnaturalización (12.5  $\mu$ l de formamida, 2.5  $\mu$ l de MOPS 10X, 8  $\mu$ l de formaldehído) y se incubó a 65°C por 10 min. Inmediatamente, se colocó la muestra en hielo durante 2 min, luego se adicionaron 2  $\mu$ l de amortiguador de carga (30% glicerol, 0.25% azul de bromofenol) y se colocaron las muestras en el gel. La electroforesis se llevó a cabo a 50 V por 30 min. Finalmente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 $\mu$ g/mL) y se analizaron en un transiluminador con luz ultravioleta.

## 6.11. qRT-PCR

### 6.11.1. Síntesis de cDNA

RNA total (5 µg) se incubó con 10 U (1 µl) de DNasa libre de RNasa (Roche) aforando a 7 µl con agua DEPC. La reacción se incubó a 37°C por 15 min, enseguida se adicionó 1 µl de 25 mM EDTA y se incubó a 65°C por 10 min. Posteriormente, se realizó la síntesis de cDNA agregando 1 µl de oligo dT (Invitrogen), la reacción se aforó a 12 µl con agua DEPC y se incubó a 70°C durante 10 min e inmediatamente la muestra se colocó en hielo. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 10,000 x g por 1 min, se añadieron 4 µl de “First buffer” (Invitrogen), 2 µl de DTT, 1 µl de dNTPs 10 mM, y se incubó a 42°C por 4 min. A continuación, se añadió 1 µl de la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen) y se incubó a 42°C por 60 min. Al término de este tiempo, las muestras se centrifugaron por 1 min a 10,000 x g y luego se incubaron a 70°C durante 15 min. Finalmente, el cDNA se trató con 2 µl de RNasa libre de DNasa (10 mg/ml, Invitrogen) y se incubó a 37°C durante 20 min.

### 6.11.2. Amplificación

Para la amplificación se utilizaron 50 ng de cDNA; 10 µl de cada uno de los oligonucleótidos sentido y antisentido; 10 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 50 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1.25 U de la enzima *taq* polimerasa recombinante (Invitrogen) y agua bidestilada para completar un volumen final 50 µl. La amplificación se realizó utilizando el termociclador SelectCycler (SelectBioproducts). Finalmente, los amplicones se analizaron en geles de agarosa al 2% en TBE 1X (90 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA).

Para los ensayos de qRT-PCR, los cebadores específicos para los genes de *grainina-2* (XM\_645265.2) y *calpaína-like* (XM\_652220.1) fueron diseñados por Primer Express Software para Real-Time PCR versión 3.0 (Applied Biosystems), (para *grainina-2*: cebador sentido: 5'- GAAAGCTAAATTCCCAGGAGGAAT-3'; antisentido: 5'- CAAAGAATCCAATTGATCCTGACATAT-3'; para *calpaína-like*: cebador sentido: 5'-

GTTTCAATATATATATACACACACACTACGTG-3'; antisentido: 5'-AAAGTCTCTCCAGAATCACCTCCA-3'). Como control interno, utilizamos cebadores específicos para el gen *GAPDH* (XM\_651327.2, XM\_645264.2 y XM\_649267.2) (sentido 5'-CCGTCCACAGACAATTCGAA-3'; antisentido: 5'-TTGAGCTGGATCTCTTTTCAGCTT-3'). Las reacciones se realizaron en el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) mediante el monitoreo del aumento en tiempo real de la fluorescencia utilizando la mezcla maestra de PCR SYBR green (Applied Biosystems). La cuantificación relativa se calculó utilizando el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Se analizaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de genes entre trofozoitos no inducidos e inducidos por MCP mediante comparaciones de las medias de tres réplicas biológicas independientes por triplicado utilizando la prueba de Tukey con el software estadístico GraphPad Prism versión 6.0.

## 6.12. Silenciamiento por RNA interferente (siRNA)

El silenciamiento de *grainina-2* y *calpaína* se realizó mediante el uso de secuencias de doble cadena de RNA pequeños que actúan como RNA interferente (siRNA). Los siRNA se incorporaron a los trofozoitos por el método de "soaking" (Ocadiz-Ruiz *et al*, 2013). Para ello, mediante el análisis *in silico* de las secuencias del RNAm de *grainina-2* y *calpaína-like* mediante el programa en línea Target Finder (<https://www.genscript.com/tools/sirna-target-finder>) se obtuvieron candidatos potenciales de RNA de interferencia (siRNA) para cada gen considerando los siguientes criterios:

1) secuencias de 21 a 25 nucleótidos complementarias al RNA blanco; 2) secuencias con aproximadamente 50% de G/C; y 3) al extremo 3' del siRNA de le añadieron dos residuos de uridinas. La especificidad de las secuencias se analizó mediante BLAST de nucleótidos en NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

La secuencia de siRNA específica del RNAm de *grainina-2* corresponde a los nucleótidos 83-108 (sentido: 5'- AUCCAAAUCUCAAGUCCAAUGGUG -3'; antisentido: 5'- CCAUUGGAACUUGAGAUUUGGAUdTdT -3'), mientras que para

*calpaína-like* corresponde a los nucleótidos 6-31 (sentido: 5'-UACUGACGAUGAAUUUCCAGCUGAA -3'; antisentido: 5'-UUCAGCUGGAAAUUCAUCGUCAGUA -3'), estas secuencias fueron sintetizadas (Ambión). Como control se utilizó un RNA de doble cadena conteniendo una secuencia no relacionada (NRS, sentido: 5'-CAAGCUGACCCUGAAGUUCdTdT-3'; antisentido: 5'-GAACUUCAGGGUCAGCUUGdTdT-3'), la cual corresponde a la proteína verde fluorescente y que no presenta homología con ninguna secuencia codificante de *E. histolytica*.

La internalización de las secuencias siRNA por trofozoítos se llevó a cabo mediante el método de “soaking” como se describió anteriormente (Ocadiz-Ruiz et al., 2013). Brevemente, los trofozoítos ( $1 \times 10^6$ ) recolectados de cultivos confluentes al 90% se inocularon en matraces de plástico de cultivo de 25 ml (Corning) que contenían medio TYI-S-33 y se incubaron a 37 ° C durante 24 h. Luego, se agregaron a los cultivos los siRNA (50 nM) y se incubaron a 37 ° C durante 24 h. Para analizar la disminución en la expresión de los genes y proteínas de *grainina-2* y *calpaína-like*, llevamos a cabo ensayos de qRT-PCR y Western blot (descritas anteriormente), respectivamente.

### **6.13. Ensayos de marcaje de dUTP mediado por la desoxinucleotidiltransferasa terminal (TUNEL)**

Los trofozoítos inducidos a la MCP se fijaron con formaldehído al 4% durante 2 horas a 4 ° C. Después de lavar las muestras dos veces con PBS pH 6.8 las muestras se permeabilizaron con 0.1% de Tritón X-100 y 0.1% de citrato de sodio por 1 h, luego se agregaron 50 µl de la mezcla de reacción TUNEL (Roche) y se incubaron durante 60 min a 37 ° C en una atmósfera humidificada en la oscuridad. Luego, las muestras se enjuagaron cuatro veces con PBS. Los núcleos se contrastaron con DAPI y las preparaciones se montaron con VECTASHIELD (Laboratorios Vector). Las muestras se observaron a través de un microscopio confocal (Carl Zeiss LSM 700) utilizando el software ZEN 2009. Como control positivo, los trofozoítos se trataron con 20 mg / ml de DNasa I (Invitrogen) durante 30 min y los trofozoítos no tratados se utilizaron como control negativo.

#### **6.14. Citometeía de Flujo**

Para determinar el efecto del silenciamiento génico de grainina-2 y calpaína-like sobre la viabilidad de los trofozoitos sometidos a MCP con G418, las células se tiñeron con yoduro de propidio (PI) y se analizaron mediante citometría de flujo. Brevemente, después de 24 h de tratamiento con los siRNAs, los trofozoitos se incubaron durante 9 y 6 h con G418; luego, las células se suspendieron en 1 ml de PBS y se incubaron durante 5 minutos en hielo en la oscuridad con 1 mg / ml de PI (Invitrogen). Finalmente, se examinó la fluorescencia en un analizador de células BD LSRFortessa (BD Biosciences).

## 7. RESULTADOS

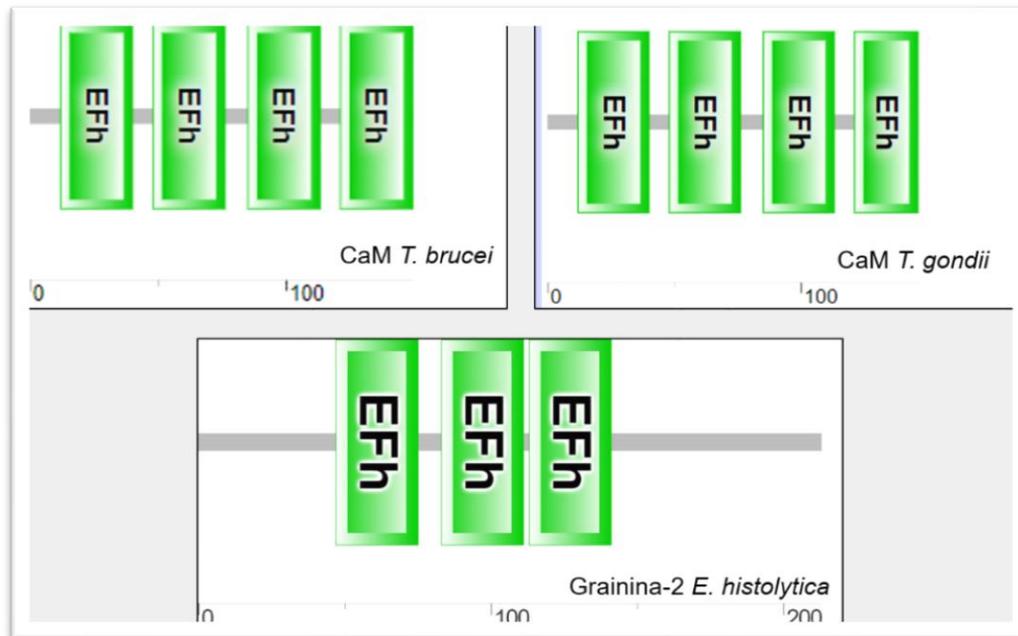
Mucho se ha avanzado en el conocimiento de la biología de *E. histolytica*, sin embargo, el papel de la respuesta inmune en el control de la enfermedad no está bien establecido, menos aún el singular comportamiento del parásito que con frecuencia actúa, como comensal y más raramente como invasor.

Durante el desarrollo fisiopatogénico de la amibiasis se ha demostrado que la MCP juega un papel importante. *In vivo*, nuestro grupo de investigación demostró en un modelo de hámster chino que la interacción entre el hospedero y el parásito se induce la apoptosis tanto de los neutrófilos como de los trofozoítos (Villalba, et al., 2011), lo que sugiere que durante el proceso fisiopatogénico se desarrolla una respuesta del huésped contra el parásito, con la consecuente activación de mecanismos de defensa del mismo. Posteriormente, también demostramos mediante cDNA-AFLPs y RT-PCR en tiempo real que la MCP inducida por fármacos representa un mecanismo activo que involucra la expresión de genes específicos, incluyendo: la glutaminil-tRNA sintetasa, las subunidades ribosomales 40S y 18S, Sir-2, las graininas 1-2 y la saponina-like, que en otros sistemas se ha visto que están implicados en la regulación de rutas pro- y anti-apoptóticas (Sánchez, et al., 2010). En la investigación de maestría, mediante análisis proteómicos diferenciales se indentificó a grainina-2 como una proteína con posible papel durante la MCP inducida con G418, debido a que su expresión se mantenía durante los tiempos 0 h a 6 h, pero a las 9 h de incubación con G418 desapareció (Domínguez, 2012). Posiblemente la degradación de grainina-2 durante la MCP se debe a la acción de proteínas con un papel en la fase ejecutora de la apoptosis como la calpaína, la cual es otra proteína que juega un papel importante en este mecanismo, ya que al usar un inhibidor de esta proteasa (Z-Leu-Leu-Leu-al) se disminuye la fragmentación del DNA (Sánchez et al., 2015). En este trabajo analizamos el papel de grainina-2 y calpaína-like durante la MPC de *E. histolytica in vitro* inducida por G418.

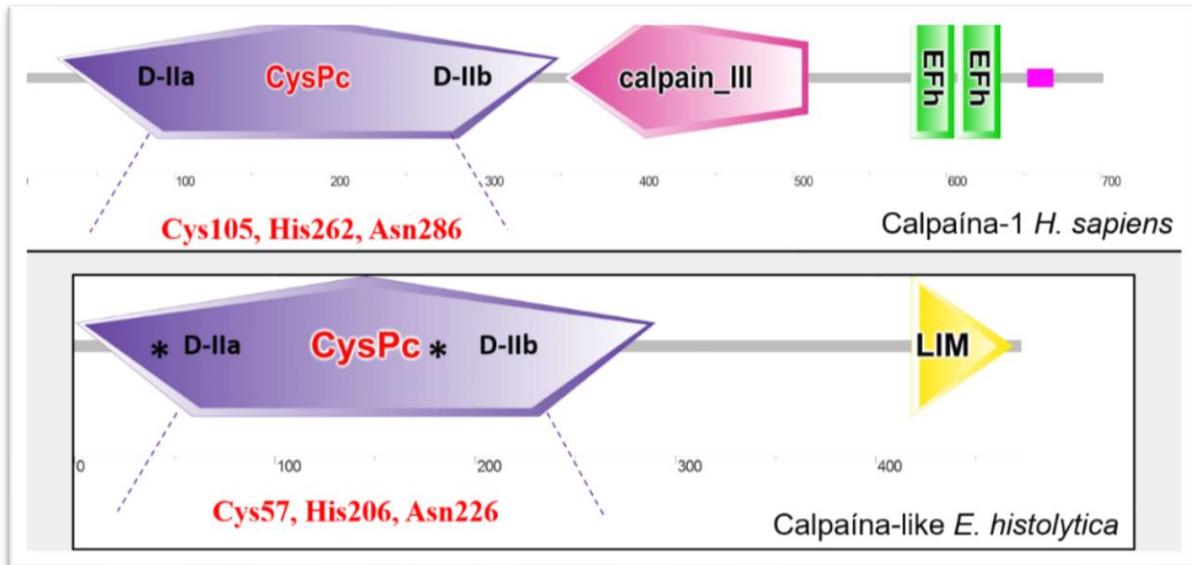
## **Identificación de dominios conservados en la arquitectura de proteínas.**

Las secuencias de aminoácidos de grainina 2 y calpaína-like se analizaron en la base de datos SMART, donde se predicen dominios y residuos funcionales en la arquitectura de las proteínas. Mediante este análisis se encontraron los dominios importantes para grainina-2 (Figura 2) y calpaína-like (Figura 3).

Debido a que Sánchez (2010) reportó que al hacer un alineamiento mediante BLAST de grainina-2 de *E. histolytica* con *T. gondii* y *T. brucei* existe una homología del 41% con calmodulinas, se decidió analizar por SMART a esas calmodulinas y a la grainina-2. El resultado de dicho análisis mostró que las proteínas están compuestas prácticamente de dominios EF-hands, que son sitios de unión a  $Ca^{2+}$ . Grainina-2 tiene 3 dominios EF-hands mientras que las calmodulinas de *T. gondii* y *T. brucei* tienen 4 (Figura 2). Por otro lado, calpaína-like de *E. histolytica* es una calpaína atípica debido a que carece de los sitios EF-hands en comparación con los dominios conservados de calpaina-1 de humano (Figura 3). La calpaína-like de *E. histolytica* conserva sólo el dominio 2, donde se encuentran los aa que conforman la tríada catalítica, y además presenta un dominio LIM, que en otras proteínas está involucrado en interacciones proteína-proteína (Tran, et al., 2016).



**Figura 2. Dominios en la arquitectura de grainina-2 de *E. histolytica*.** El diagrama representa los dominios de unión a calcio denominados EF-hands los cuales componen a grainina 2 (panel inferior) al igual que las proteínas descritas como calmodulina en *T. brucei* y *T. gondii* (paneles superiores).

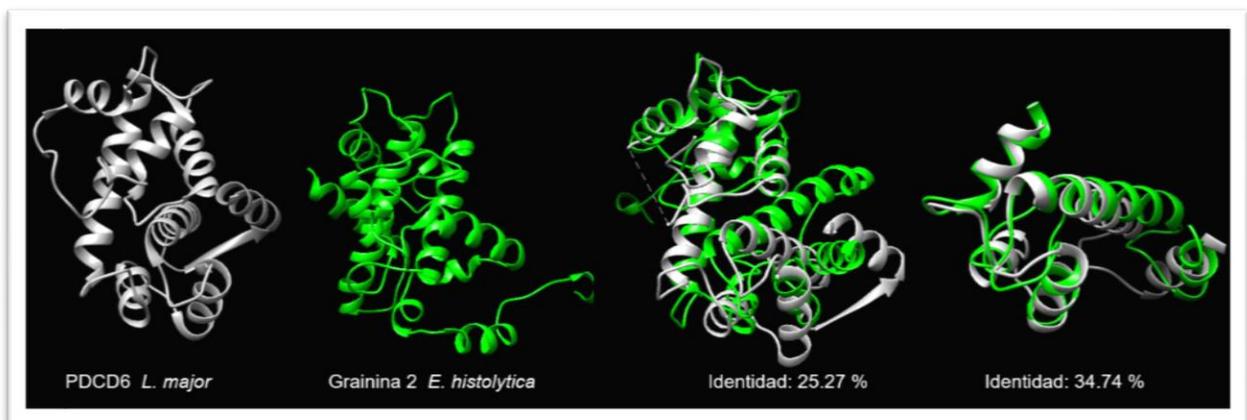


**Figura 3. Dominios en la arquitectura de calpaína-like de *E. histolytica*.** El diagrama representa los dominios Ila y IIb característicos de calpaínas donde se encuentra los aminoácidos que conforman la tríada catalítica, señalado en letras rojas tanto en calpaína-like de *E. histolytica* (panel inferior) y calpaína-1 de humano (panel superior), a su vez se resalta con asteriscos dentro el dominio II los sitios de unión a calcio conservados evolutivamente en calpaína-like y los sitios EF-hands representados en verde dentro de calpaína-1. El sitio LIM que puede mediar la interacción proteína-proteína en calpaína-like de *E. histolytica* se representa en amarillo.

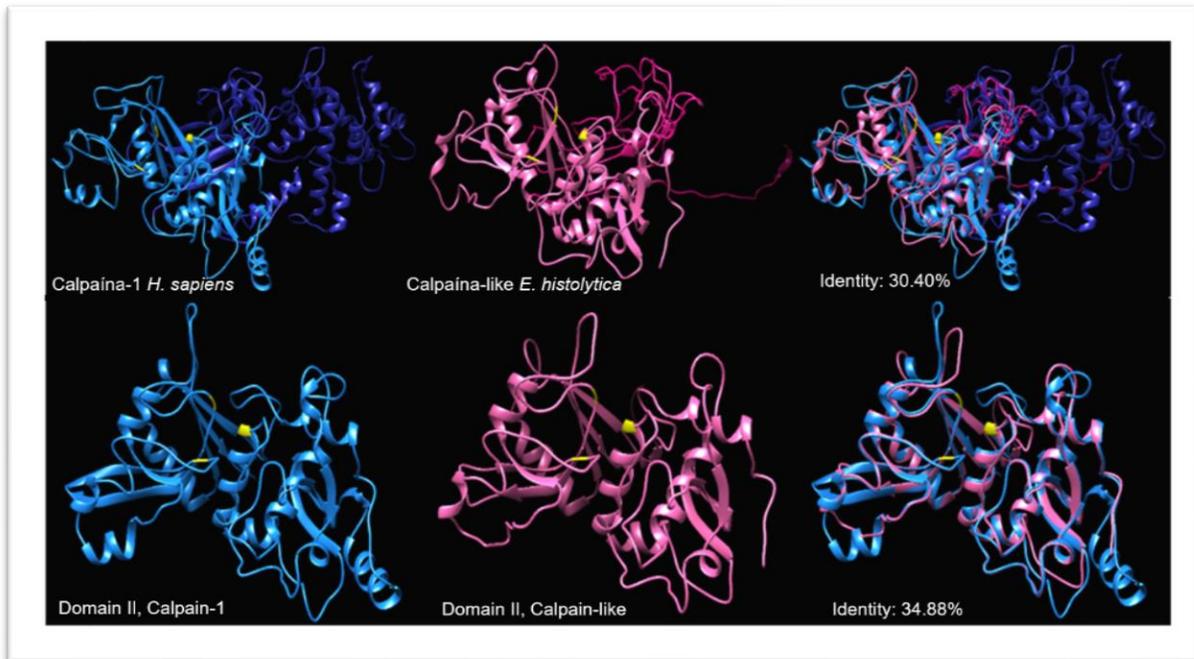
### Estructuras 3D hipotéticas de grainina-2 y calpaína-like

La base de datos del programa I-TASSER se usó para predecir la estructura tridimensional de grainina-2 (XP\_650357.1) y calpaína-like (XP\_657312.1). I-TASSER es un método bioinformático para predecir el modelo de estructura tridimensional de moléculas de proteínas a partir de secuencias de aminoácidos, el cual detecta plantillas de estructura del Protein Data Bank mediante una técnica llamada fold recognition. Al predecir la estructura de grainina-2, I-TASSER utilizó como platilla molde un homólogo de PCDC6 de *L. major* (1X1Y), esta estructura 3D se comparó

con grainina-2 de *E. histolytica* usando el programa CHIMERA UCSF y se obtuvo una identidad del 25.27%, este porcentaje aumentó cuando se decidió sólo analizar los sitios EF-hands de PCDC6 y grainina-2 obteniendo un 34.74% de identidad (Figura 4). Por otro lado I-TASSER usó el cristal 2ARY previamente reportado en esa base de datos para construir la estructura 3D de calpain-like de *E. histolytica* (estructura rosa de la Figura 5), cabe mencionar que este cristal o molde es solo del dominio II de calpaína-1 de humano (estructura azul de la Figura 5), el cual también fue utilizado para construir la proteína completa de calpaína-1, al hacer la comparación de ambas proteínas con CHIMERA UCSF se obtuvo una identidad del 30.40%, esta aumentó al analizar solo el dominio donde se encuentra la triada catalítica, obteniendo un 34.88% (Figura 5).



**Figura 4. Estructuras 3D de la proteína grainina-2 de *E. histolytica* y PDCD6 de *L. major*.** El diagrama representa las estructuras 3D de PDCD6 de *L. major* (gris) y la proteína grainina-2 de *E. histolytica* (verde), a continuación, se muestran la superposición de los modelos 3D de las proteínas completas, seguido de una superposición de sólo los aminoácidos que conforman los sitios EF-hands de ambas proteínas. Los números indican el porcentaje de identidad.

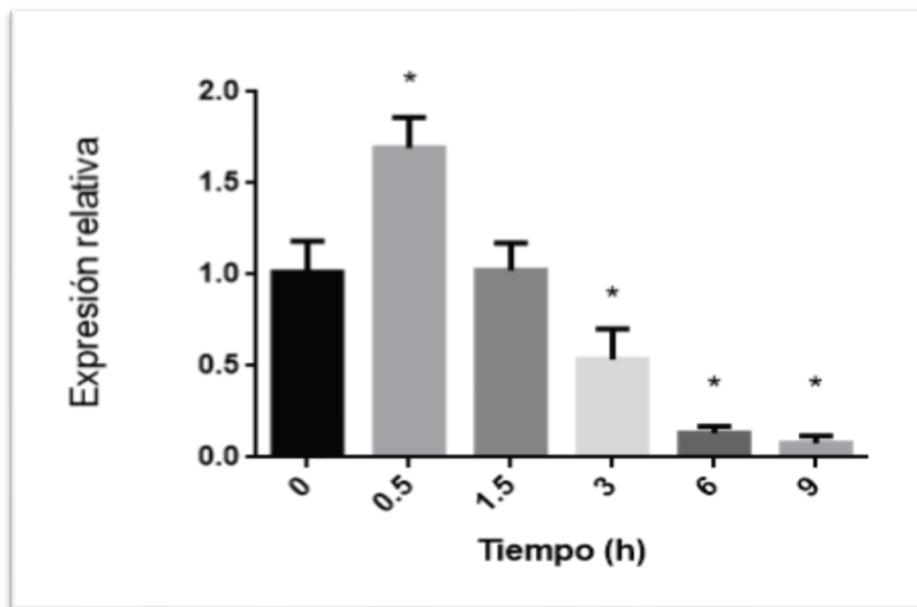


**Figura 5. Estructuras 3D de la proteína calpaína-like de *E. histolytica* y calpaína-1 de humano.** El diagrama representa las estructuras 3D de calpaína 1 humana (azul) y la proteína calpaína-like de *E. histolytica* (rosa). Los paneles superiores muestran los modelos 3D de las calpaínas completas. Los paneles inferiores muestran las estructuras 3D sólo del dominio II de ambas calpaínas. El panel derecho muestra la superposición en las estructuras de calpaína 3D. Los números indican el porcentaje de identidad. Los aminoácidos que forman la tríada catalítica de la calpaína están representados en amarillo.

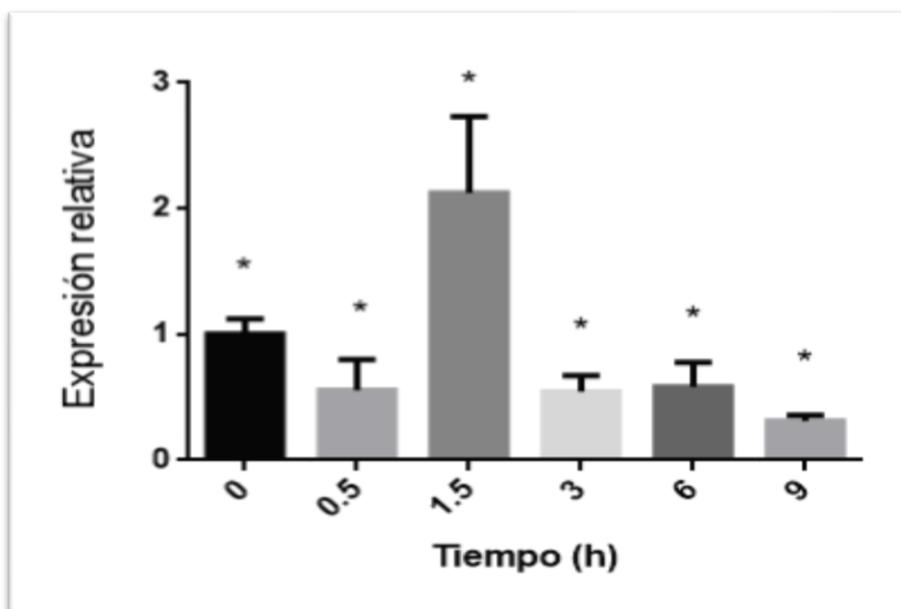
### **Expresión relativa del transcrito grainina-2 y calpaína-like en trofozoítos tratados y no con G418**

Una vez que se analizaron los dominios conservados en la arquitectura de las proteínas de interés y se predijo la estructura 3D, se procedió a evaluar la expresión de los genes y proteínas de grainina-2 y calpaína-like durante la MCP inducida por G418. Los niveles de expresión de los genes grainina-2 y calpaína-like durante la MCP fueron evaluados por RT-qPCR. Los resultados mostraron que durante este evento hay variación en la expresión de ambos genes, en el caso de grainina-2 se encontró

una sobreexpresión, con respecto a los parásitos control, a las 0.5 h. La expresión disminuyó paulatinamente en los tiempos subsecuentes, siendo más evidente a las 6 y 9 h (Figura 6). En el caso del gen de calpaína-like se observó una sobreexpresión, con respecto a los trofozoítos control, a las 1.5 h, posteriormente se detectó una disminución drástica a partir de las 3 h (Figura 7).



**Figura 6. Expresión relativa del transcrito grainina-2 en trofozoítos incubados con G418.** La gráfica muestra la expresión relativa del gen *grainina-2* en trofozoítos incubados sin G418 (tiempo 0) o con 10  $\mu\text{g} / \text{ml}$  de G418 durante diferentes períodos de tiempo (0.5, 1.5, 3, 6 y 9 h). \* Indica una expresión relativa con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tiempo 0. Se utilizó como gen normalizador a *gapdh*.

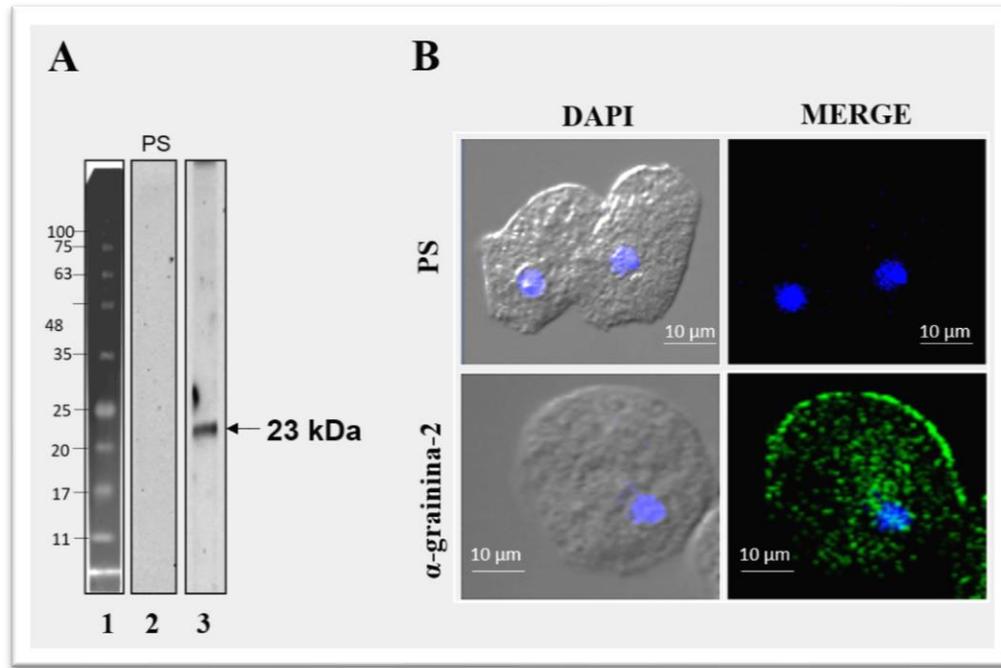


**Figura 7. Expresión relativa del transcrito calpaína-like en trofozoítos incubados con G418.** La gráfica muestra la expresión relativa del gen *calpaína-like* en trofozoítos incubados sin G418 (tiempo 0) y con 10 ug / ml de G418 durante diferentes períodos de tiempo (0.5, 1.5, 3, 6 y 9 h). \* Indica una expresión relativa con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tiempo 0. Se utilizó como gen normalizador a *gapdh*.

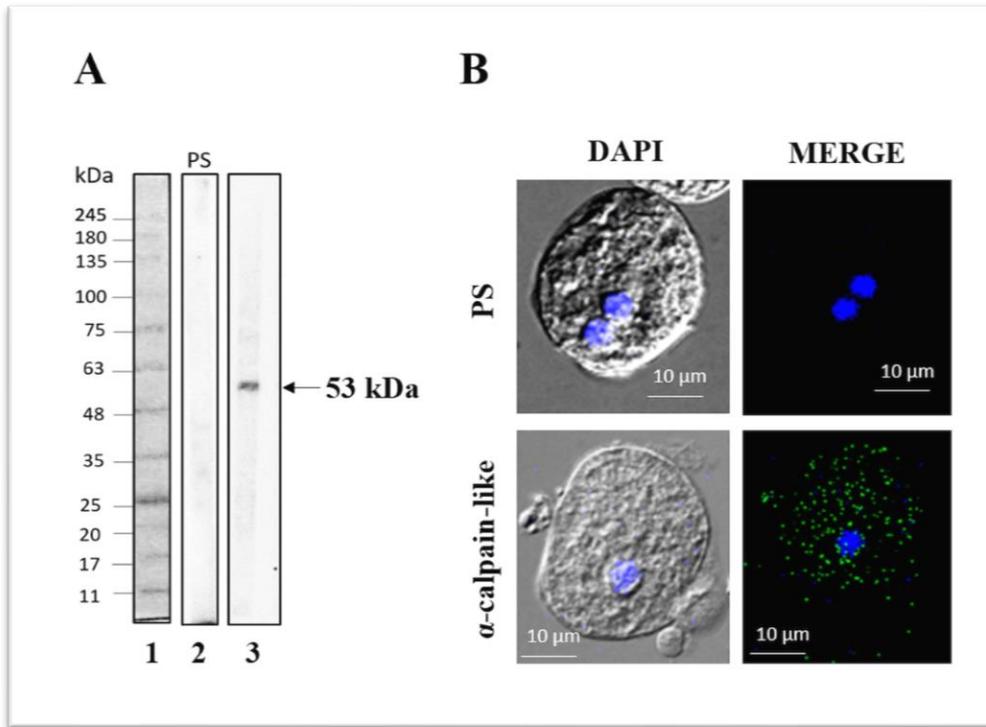
### **Expresión y localización celular de las proteínas grainina-2 y calpaína-like en los trofozoítos de *E. histolytica* icubados con G418**

Para analizar la expresión de las proteínas grainina-2 y calpaína-like, primero se obtuvieron anticuerpos específicos contra ellas. Mediante WB sobre extractos totales de trofozoítos, los anticuerpos contra grainina-2 detecta una sola banda de 23 kDa (Figura 8A), mientras que los anticuerpos contra calpaína-like identificaron una única banda de 53 kDa (Figura 9A). Esos pesos moleculares corresponden a los esperados para ambas proteínas. Por otro lado, para conocer la localización celular en los trofozoítos de *E. histolytica* crecidos bajo condiciones normales se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando los mismos anticuerpos. La proteína grainina-2 se

localizó en la membrana plasmática y en el citoplasma (Figura 8B), mientras que calpaína-like sólo se encontró a nivel citoplasmático (Figura 9B).



**Figura 8. Expresión y localización de la proteína grainina-2 en trofozoítos. (A)** Los extractos totales de *E. histolytica* se separaron mediante SDS-PAGE al 10% y se analizaron mediante ensayos de WB utilizando suero preinmune (PS, carril 2) o anticuerpos  $\alpha$ -grainina-2 (carril 3). En el carril 1 se muestran los marcadores de peso molecular (FPL-007, compañía Gel). **(B)** Imagen representativa de la localización de grainina-2 ( $\alpha$ -grainina-2) mediante microscopía láser confocal de trofozoítos fijados con metanol. PS, ensayos usando el suero pre-inmune.



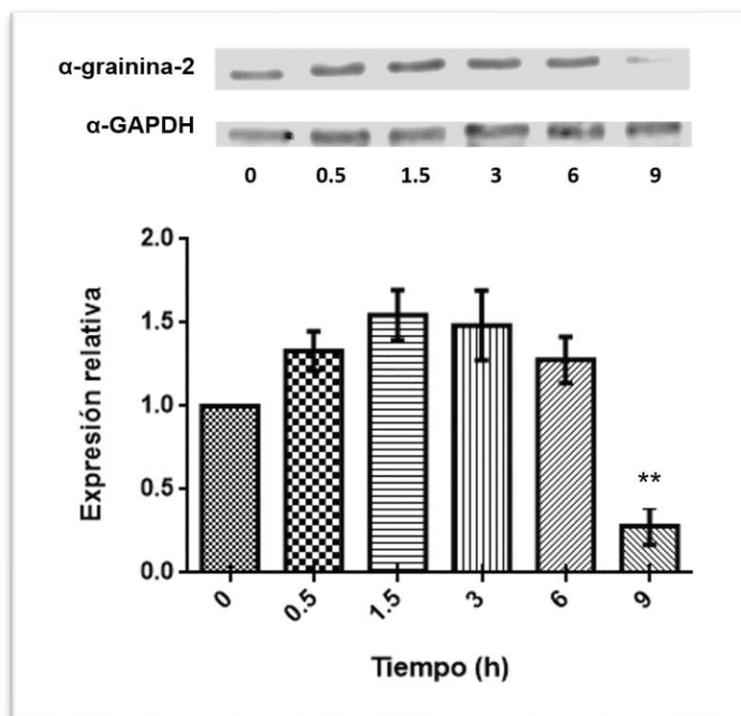
**Figura 9. Expresión y localización de la proteína calpaína-like en trofozoítos. (A)** Los extractos totales de *E. histolytica* se separaron mediante SDS-PAGE al 10% y se analizaron mediante ensayos de WB utilizando suero preinmune (PS, carril 2) o anticuerpos  $\alpha$ -calpaína-like (carril 3). En el carril 1 se muestran los marcadores de peso molecular (FPL-007, compañía Gel). **(B)** Imagen representativa de la localización de calpaína-like ( $\alpha$ -calpaína-like) mediante microscopía láser confocal de trofozoítos fijados con metanol. PS, ensayos usando el suero pre-inmune.

### Expresión y localización celular de las proteínas grainina-2 y calpaína-like durante MCP inducida con G418

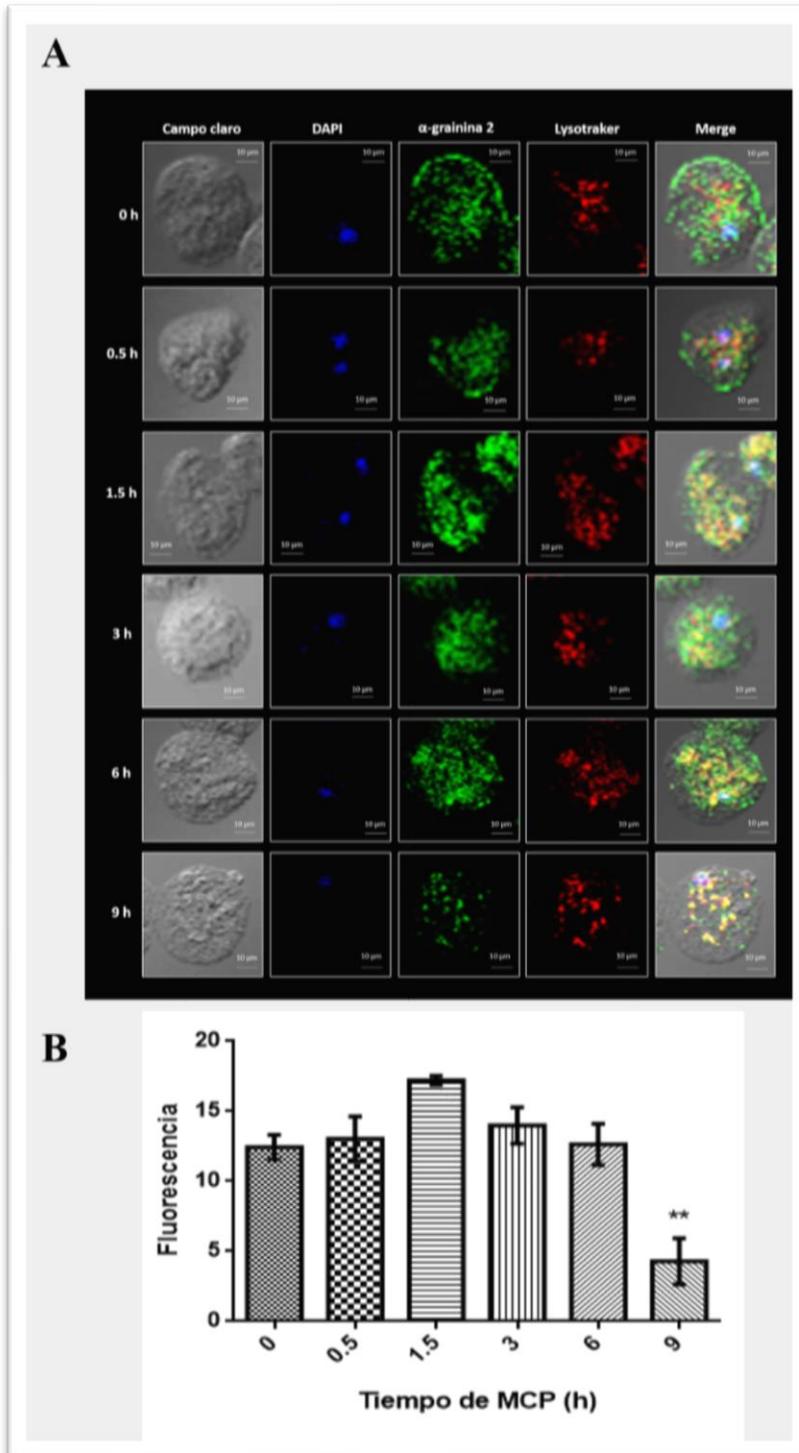
La expresión de grainina-2 durante MCP se mantuvo de 0 h a 6 h, posteriormente se observó una disminución drástica a las 9 h de exposición con G418 (Figura 10). Al analizar la inmunolocalización de esta proteína durante la MCP se observó una expresión similar de 0 a 6 h de incubación con G418 y una disminución a las 9 h (Figura 11A, B). Además, a partir de las 0.5 h la grainina-2 desaparece de la

membrana plasmática y se localiza solamente en el citoplasma en forma de agregados o cúmulos, los cuales son muy evidentes a las 9 h (Figura 11A). Al utilizar Lisotracker detectamos la co-localización de grainina-2 con este marcador de lisosomas (Figura 11A), por lo que podemos sugerir que grainina-2 es enviado a estos compartimentos celulares para su degradación.

Por otro lado, la expresión de calpaína-like incrementó de una manera tiempo dependiente, fué a las 9 h de incubación con G418 donde se observó la máxima expresión (aproximadamente 3.5 veces más, en comparación con el control) (Figura 12). Además, en los ensayos de inmunolocalización también se detectó un aumento de la fluorescencia a las 9 h de tratamiento con G418 (Figura 13A, B). Curiosamente, a las 6 y 9 h, la proteína calpaína-like se detectó también en la periferia del núcleo (Figura 13A).

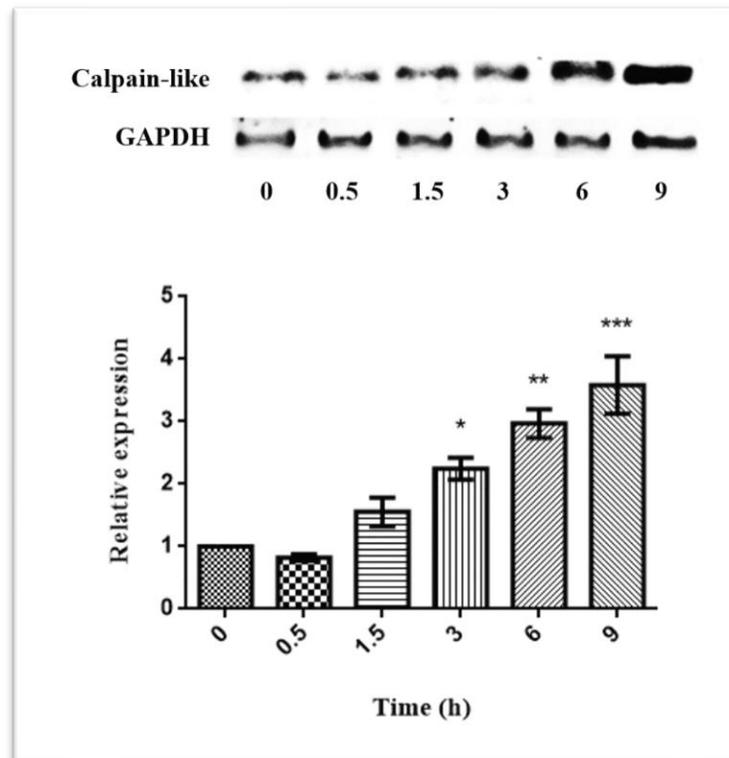


**Figura 10. Expresión de la proteína grainina-2 durante la MCP inducida por G418.** Expresión de calpaína-like en trofozoítos no tratados (0 h) y tratados con 10  $\mu$ g / ml de G418 durante 0.5, 1.5, 3, 6 y 9 h. El gráfico muestra el análisis de densitometría de los niveles de expresión de grainina-2. El anticuerpo  $\alpha$ -GAPDH se utilizó como control interno para la normalización de los experimentos. \*\* Indica los tiempos en que la expresión relativa de grainina-2 mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ).

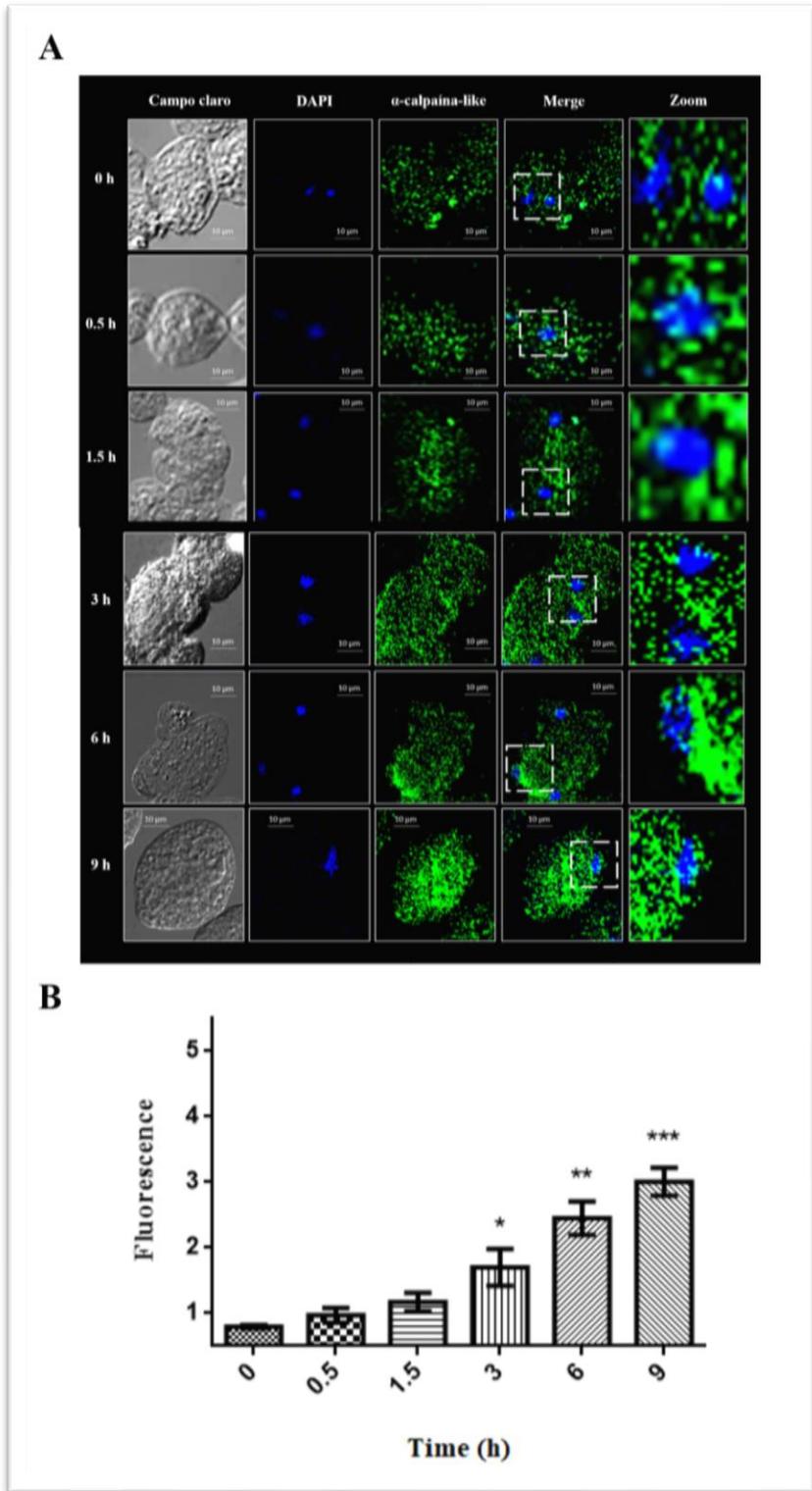


**Figura 11. Localización celular y expresión de la proteína grainina-2 durante la MCP. (A)** Los trofozoítos se incubaron con G418 a 37 ° C durante los tiempos indicados. Luego, se incubaron con anticuerpo  $\alpha$ -grainina-2 el anticuerpo secundario y se analizaron por microscopía confocal. DAPI: tinción de núcleos, Merge: co-

localización de DAPI y grainina-2. **(B)** El gráfico muestra el análisis densitométrico de la fluorescencia de grainina-2. \*\* Indica los tiempos en que la fluorescencia de calpaína-like mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ).



**Figura 12. Expresión de la proteína calpaína-like durante la MCP inducida por G418.** Expresión de calpaína-like en trofozoitos no tratados (0 h) y tratados con 10  $\mu\text{g} / \text{ml}$  de G418 durante 0.5, 1.5, 3, 6 y 9 h. El gráfico muestra el análisis de densitometría de los niveles de expresión de calpaína-like. El anticuerpo  $\alpha$ -GAPDH se utilizó como control interno y para la normalización de los experimentos. \* Indica los tiempos en que la expresión relativa de calpaína-like mostró una diferencia estadísticamente significativa (\*, \*\*, \*\*\* valor de  $P < 0.05$ , 0.01 y 0.001, respectivamente).

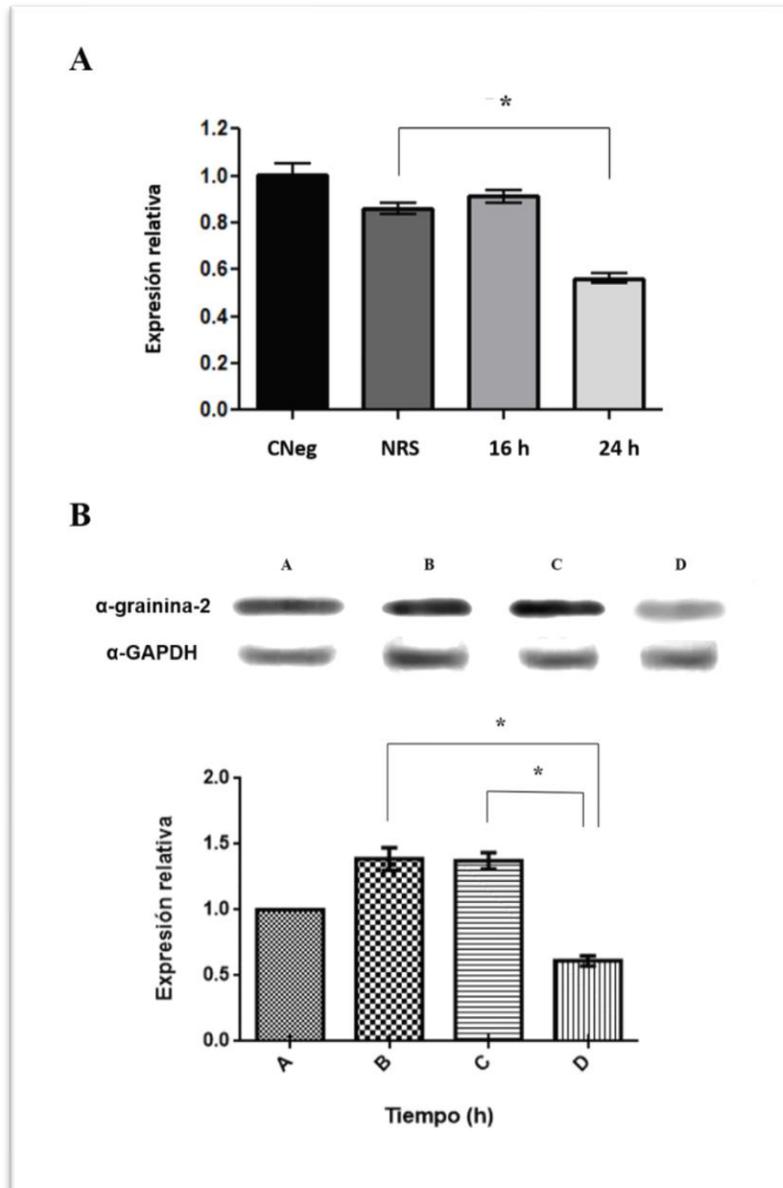


**Figura 13. Localización celular y expresión de la proteína calpaína-like durante la MCP. (A)** Los trofozoítos se incubaron con G418 a 37 ° C durante los tiempos

indicados. Luego, se incubaron con anticuerpo  $\alpha$ -calpaína-like y el anticuerpo secundario y se analizaron por microscopía confocal. DAPI: Tinción de núcleos, Merge: co-localización entre DAPI y calpaína-like. **(B)** El gráfico muestra el análisis densitométrico de la fluorescencia de calpaína-like. \* Indica los tiempos en que la expresión relativa de calpaína-like mostró una diferencia estadísticamente significativa (\*, \*\*, \*\*\* valor de  $P < 0.05$ ,  $0.01$  y  $0.001$ , respectivamente).

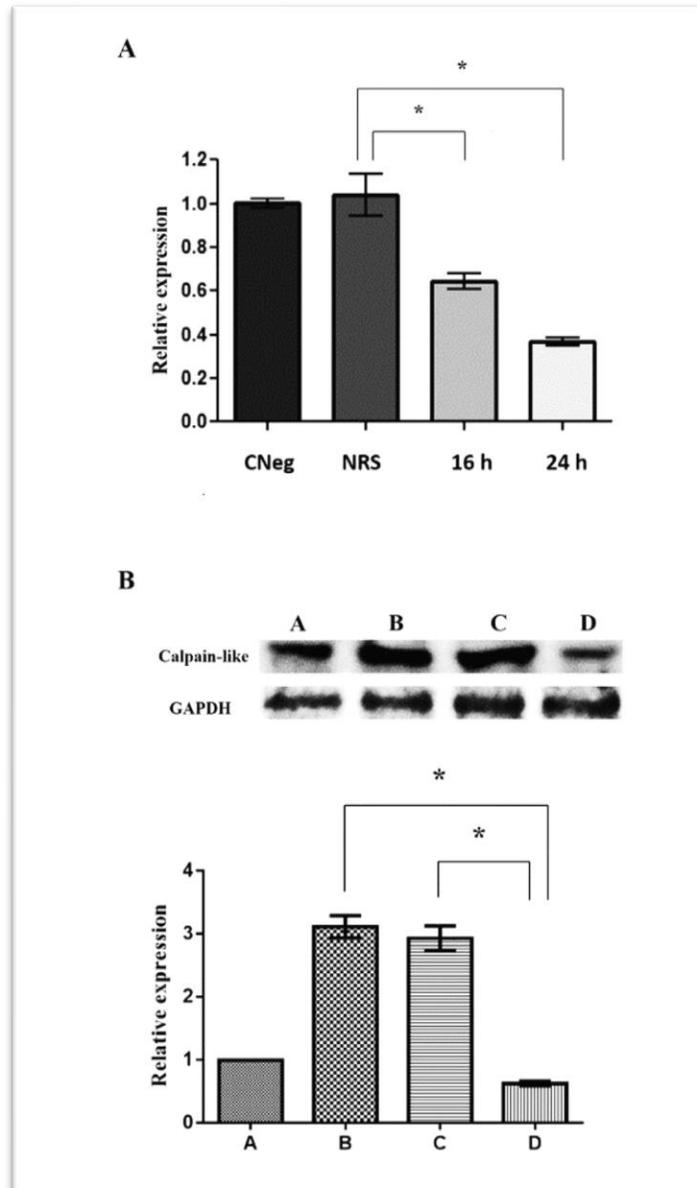
### **Silenciamiento del gen de grainina-2 y calpaína-like**

Para evaluar el papel de ambas proteínas durante la MCP primeramente se realizó el silenciamiento de las proteínas calpaína-like y grainina-2, para después analizar el efecto del silenciamiento en el evento de MCP. El silenciamiento de la expresión génica se realizó a través de siRNAs. Para ello los trofozoítos se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con  $50\text{ nM}$  / ml de siRNA para cada gen durante 16 h y 24 h. Para evaluar el silenciamiento, primero se realizaron ensayos de qRT-PCR. Los resultados mostraron una disminución estadísticamente significativa del 36% a las 24 h en el caso de grainina-2 (Figura 14A), mientras que el silenciamiento de calpaína-like mostró un 37% y 67% después de 16 y 24 h de incubación con el siRNA, respectivamente (Figura 15A). Como se esperaba, la incubación con la secuencia no relacionada (NRS) durante 24 h no afectó la expresión de los genes de grainina-2 o calpaína-like (Figuras 14A y 15A). Por Western blot observamos que la expresión de grainina-2 aumentó 0.5 veces más en trofozoítos control inducidos a MCP por 3 h o en trofozoítos tratados con la NRS más 3 h de incubación con G418, en comparación con la expresión basal de los trofozoítos control. Los trofozoítos inducidos a MCP previamente tratados con la secuencia siRNA de grainina-2, mostraron una disminución significativa (53%) en la expresión de la proteína grainina-2 después de 3 h de incubación con G418 (Figura 14B). Por otro lado, los resultados del Western blot del silenciamiento de calpaína-like e incubación por 9 h con G418 mostraron una disminución significativa del 80% en la expresión de la proteína calpaína-like, en comparación con los trofozoítos inducidos a MCP mediante la incubación con G418 por 9 h ó en trofozoítos tratados con la secuencia siRNA NRS más la inducción a MCP por 9 h (Figura 15B).



**Figura 14. Silenciamiento de grainina-2.** (A) qRT-PCR de la expresión del gen *grainina-2* a partir de trofozoítos incubados con 50  $\mu$ g / ml de la secuencia siRNA para *grainina-2* de *E. histolytica* durante 16 y 24 h. Como control, los trofozoítos se incubaron con una secuencia no relacionada (NRS). El control negativo representa trofozoítos sin incubación con secuencias de siRNA. (B) Expresión de la proteína grainina-2 durante la MCP mediante Western blot. A. Control negativo, trofozoítos no tratados; B. Trofozoítos incubados 6 h con 10  $\mu$ g / ml de G418; C, D. Trofozoítos pre-incubados durante 24 h con la secuencia de siRNA de NRS (C) o para grainina-2 (D) e incubadas posteriormente por 6 h con 10  $\mu$ g / ml de G418. El gráfico muestra el

análisis de densitometría de los niveles de expresión de grainina-2. \* Indica la diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).



**Figura 15. Silenciamiento de calpaína-like.** (A) qRT-PCR de la expresión del gen *calpaína-like* a partir de trofozoítos incubados con 50  $\mu\text{g} / \text{ml}$  de la secuencia siRNA para *calpaína-like* de *E. histolytica* durante 16 y 24 h. Como control, los trofozoítos se incubaron con una secuencia no relacionada (NRS). El control negativo representa trofozoítos sin incubación con secuencias siRNA. (B) WB de la proteína calpaína-like. A. Control negativo, trofozoítos no tratados; B. Trofozoítos incubados 9 h con 10  $\mu\text{g} / \text{ml}$  de G418; C, D. Trofozoítos pre-incubados durante 24 h con la secuencia de siRNA de NRS (C) o para calpaína-like (D) e incubadas posteriormente por 9 h con 10  $\mu\text{g} /$

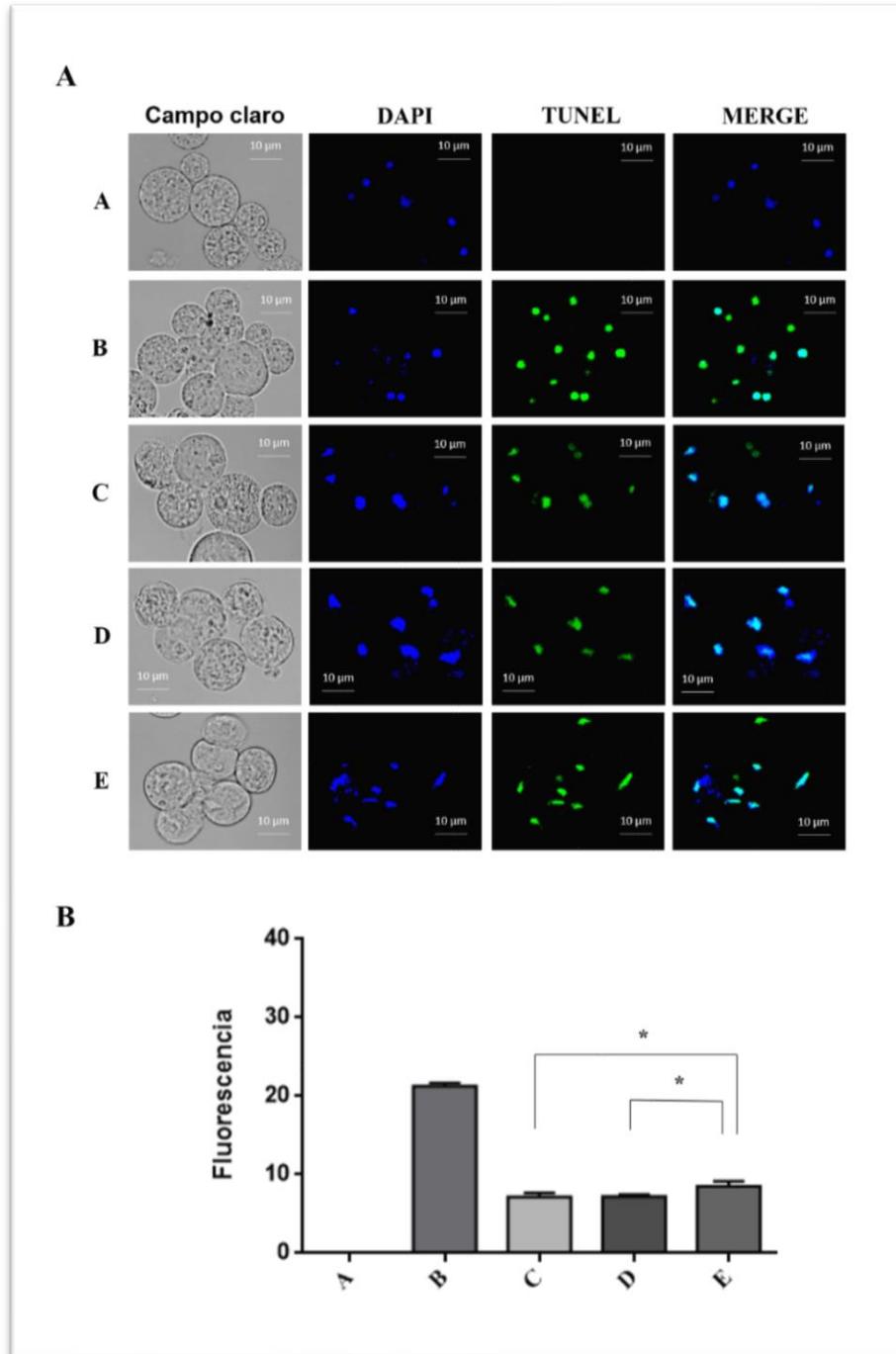
ml de G418. El gráfico muestra el análisis de densitometría de los niveles de expresión de calpaína-like. \* Indica la diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

### **Efecto del silenciamiento de *grainina-2* y calpaína-like en la MCP**

Los trofozoítos incubados con siRNA de *grainina-2* por 24 h y subsecuentemente con G418 por 6 h fueron analizados mediante ensayos de TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, AP). Los resultados mostraron que el silenciamiento del gen de *grainina-2* causó un aumento en la fluorescencia para TUNEL comparado con los trofozoítos control o tratados con siRNA NRS (Figura 16A). Los análisis densitométricos de tres experimentos independientes mostraron que el silenciamiento de *grainina-2* disparó un aumento de la fluorescencia de aproximadamente 18% en comparación con los trofozoítos control o tratados con la NRS (Figura 16B). Consistentemente, el silenciamiento del gen de *grainina-2* aumentó el número de trofozoítos muertos al tratarlos con G418 (Figura 17). En los parásitos control (sin siRNA) incubados por 3 y 6 h con G418, la viabilidad celular disminuyó al 75% y 73%, respectivamente, en comparación con trofozoítos sin G418 (Figura 17B). Los trofozoítos incubados con la NRS e inducidos a MCP por 3 y 6 h mostraron porcentajes de viabilidad celular similares a los trofozoítos control, mientras que los trofozoítos incubados con el siRNA de *grainina-2* e inducidos a MCP por 3 h tuvieron una ligera disminución en su viabilidad (70%) (Figura 17B). Esta disminución en la viabilidad celular fue estadísticamente significativa a las 6h de tratamiento con G418 (62%) (Figura 17B). El tratamiento de los trofozoítos con el siRNA para *grainina-2* a 100 nM/ml no mostró un efecto mayor en la viabilidad celular (Anexo 1).

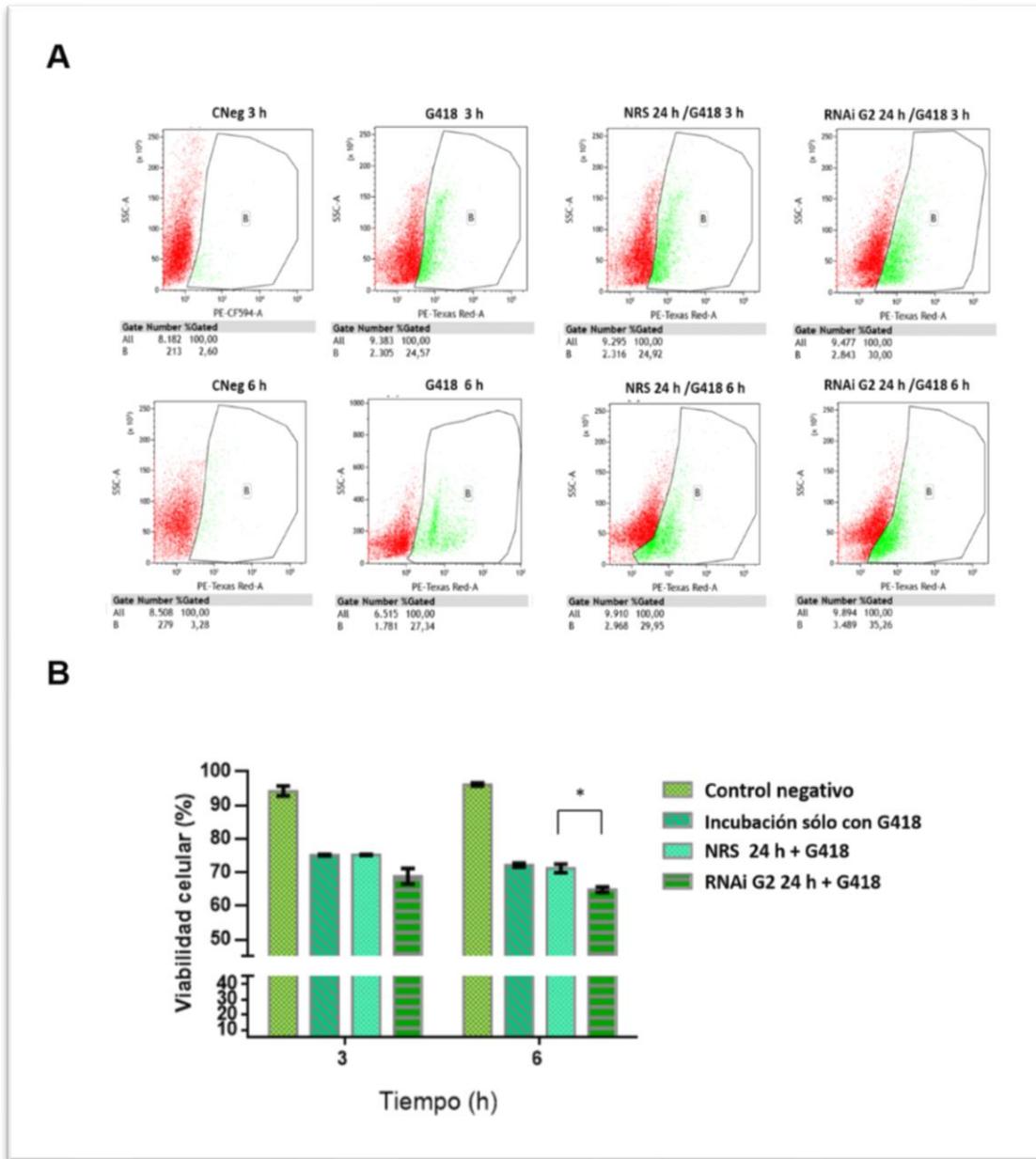
Por otro lado, el silenciamiento del gen de *calpaína-like* causó una considerable disminución en la señal positiva para el ensayo de TUNEL, comparada con el tratamiento de sólo G418 por 9 h ó el tratamiento con NRS por 24 h seguida de la inducción de MCP por 9 h (Figura 18A). El análisis densitométrico muestra que el silenciamiento de *calpaína-like* conllevó a una reducción significativa de la fluorescencia (aproximadamente un 70% en comparación con los trofozoítos control) (figura 18B). Concordantemente, el silenciamiento de *calpaína-like* disminuyó el

número de células muertas por el tratamiento con G418 (Figura 19). El análisis estadístico indica que la viabilidad celular fue de aproximadamente 88% después de que los trofozoítos se incubaron con el siRNA de *calpaína-like* y posteriormente inducidos a MCP por 9 h con G418, mientras que los trofozoítos tratados sólo con G418 por 9 h o con NRS seguido de 9 h de incubación con G418 la viabilidad celular fue de aproximadamente 67% (Figura 19B).

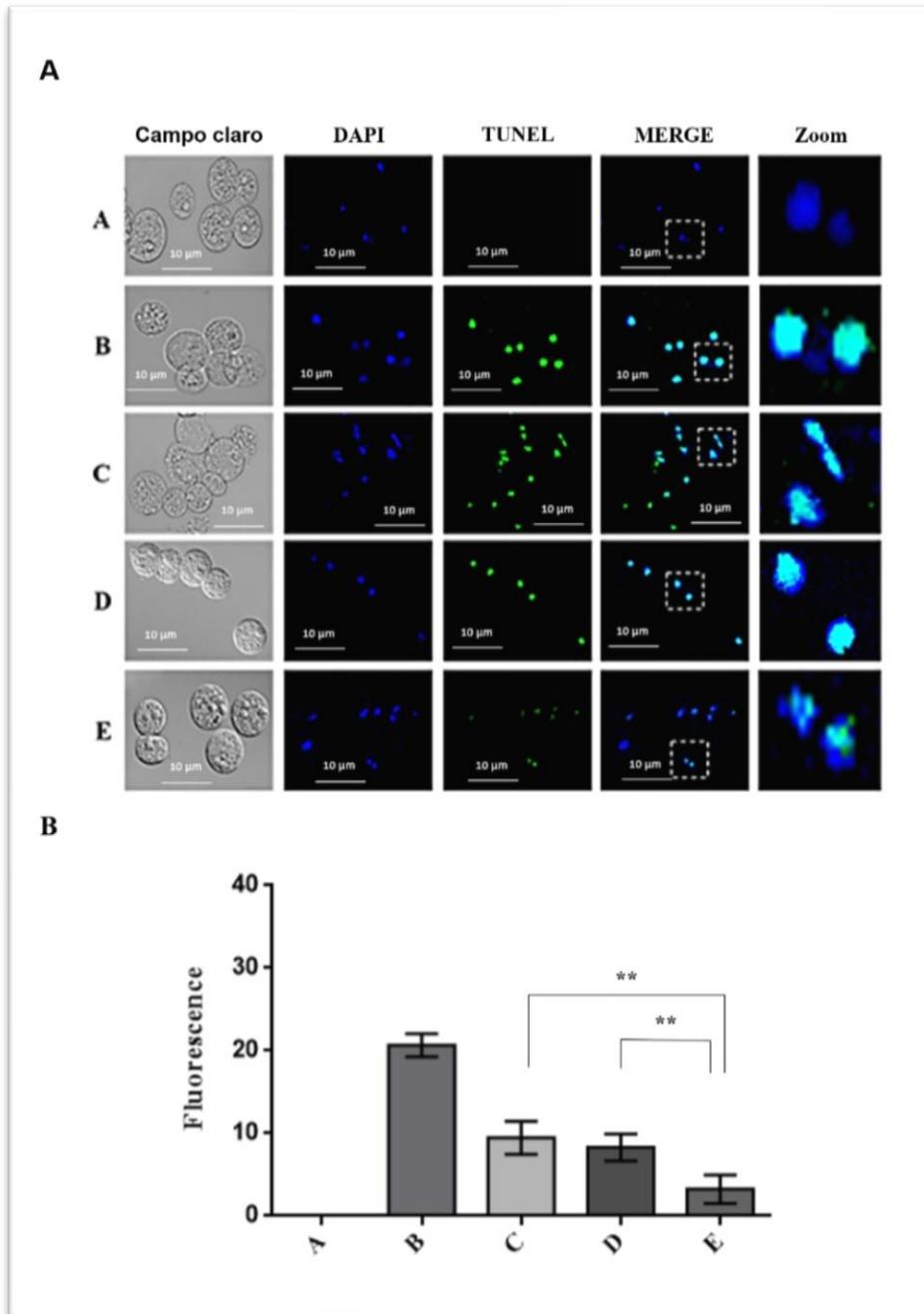


**Figura 16. Efecto del silenciamiento de grainina-2 en la MCP. (A)** Fragmentación del DNA en trofozoítos tratados con la secuencia siRNA para grainina-2 después de la inducción a MCP por G418. Análisis de microscopía confocal de trofozoítos que mostraron la tinción de TUNEL, las muestras se co-tiñeron con DAPI. A. Control negativo, trofozoítos no tratados; B. Control positivo, trofozoítos tratados con 20  $\mu$ g de

DNasa I durante 30 minutos; C. Trofozoitos después de una incubación de 6 h con 10  $\mu\text{g} / \text{ml}$  de G418; D, E. Trofozoitos pre-incubados durante 24 h con secuencias siRNA de NRS (D) o para grainina-2 (E) y luego de 6 h con 10  $\mu\text{g} / \text{ml}$  de G418; **(B)** Análisis densitométrico de (A). \* Indica diferencia estadísticamente significativa:  $p < 0,05$ .



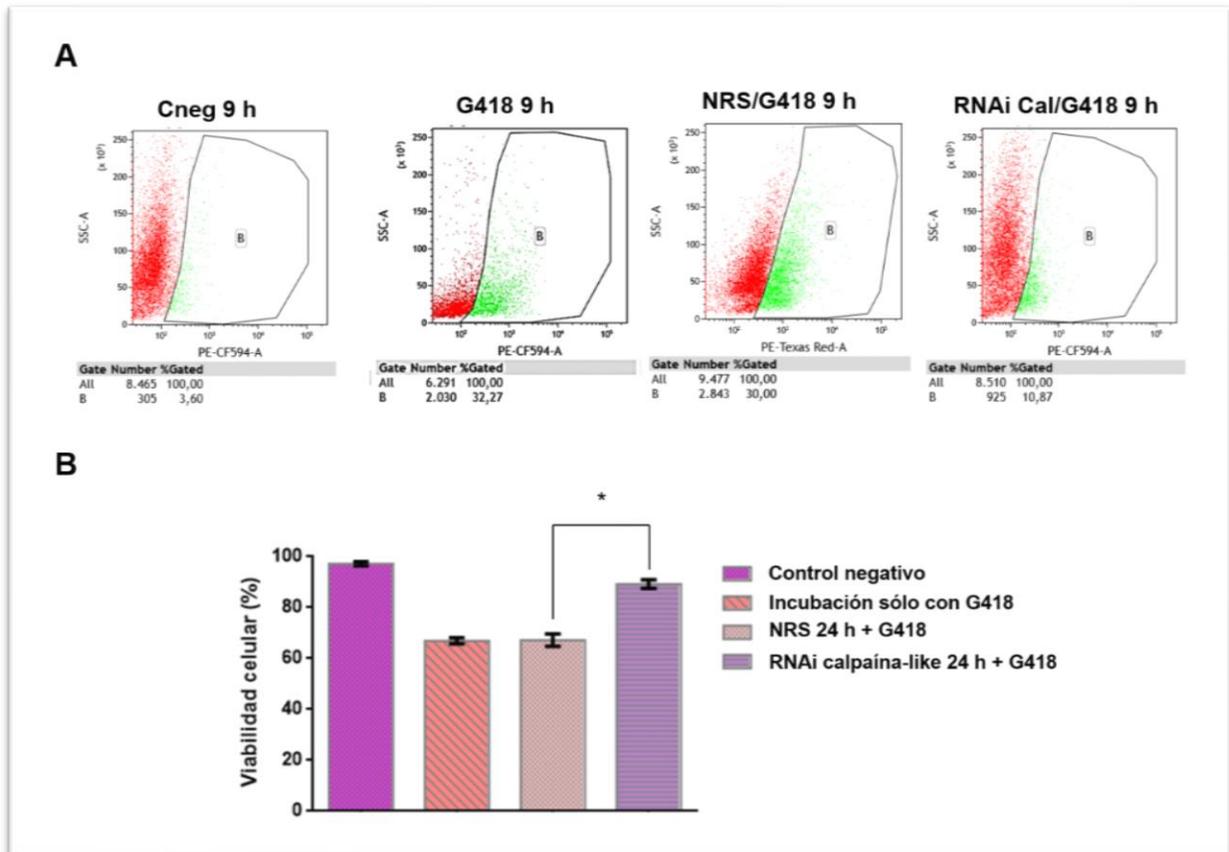
**Figura 17. Efecto del silenciamiento de grainina-2 sobre la viabilidad celular de *E. histolytica* incubada con G418. (A)** Citometría de flujo celular. Control negativo, trofozoítos no tratados; trofozoítos después de una incubación de 3 h y 6 h con 10  $\mu$ g / ml de G418; trofozoítos pre-incubados durante 24 h con secuencias siRNA de NRS o para grainina-2 luego de 3 h y 6 h con 10  $\mu$ g / ml de G418. **(B)** Análisis estadístico de (A). \* Indica diferencia estadísticamente significativa:  $p < 0,05$ .



**Figura 18. Efecto del silenciamiento de calpaína-like en la MCP.**

**(A)** Fragmentación del DNA en trofozoítos tratados con la secuencia siRNA para calpaína-like después de la inducción a MCP por G418. Análisis de microscopía confocal de trofozoítos que muestran la tinción de TUNEL, las muestras se co-tiñeron con DAPI. A. Control negativo, trofozoitos no tratados; B. Control positivo, trofozoitos tratados con 20 µg de DNasa I durante 30 minutos; C. Trofozoitos después de una

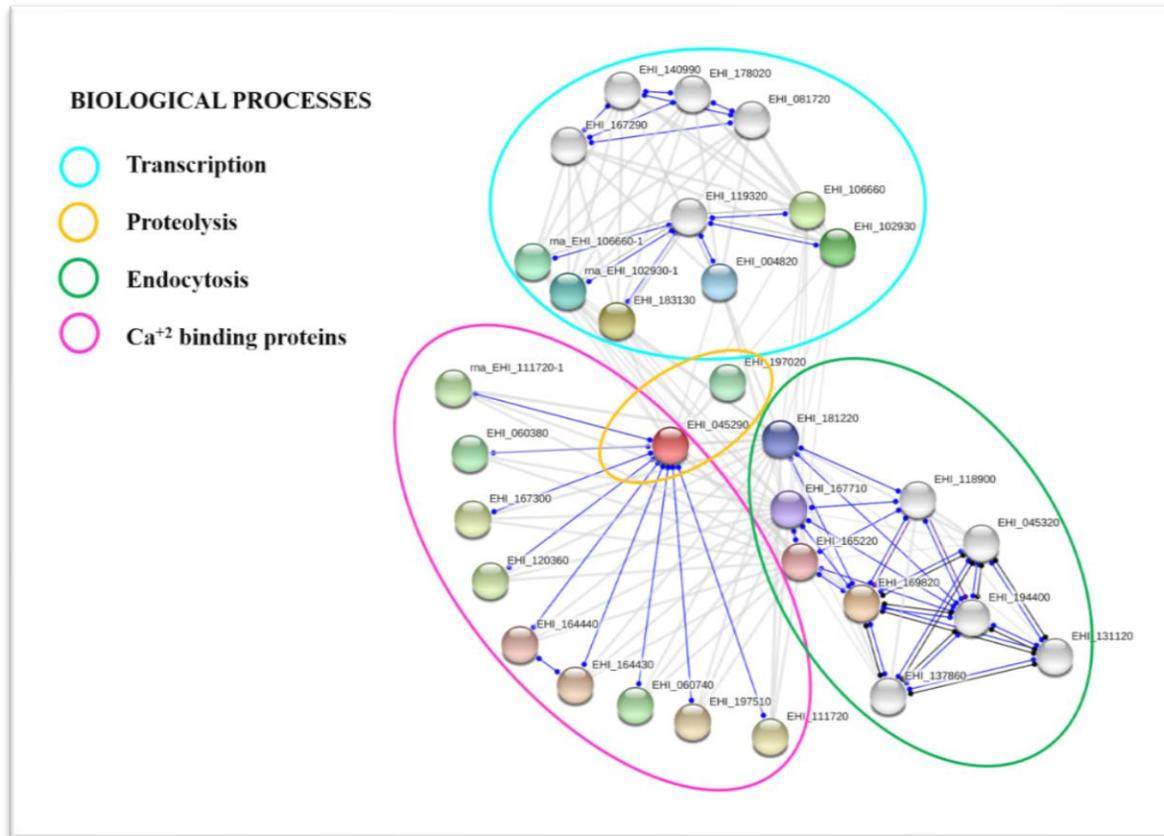
incubación de 9 h con 10 µg / ml de G418; D, E. Trofozoitos pre-incubados durante 24 h con secuencias siRNA de NRS (D) o para calpaína-like (E) y luego de 9 h con 10 µg / ml de G418; **(B)** Análisis densitométrico de (A). \*\* Indica diferencia estadísticamente significativa: p <0,01.



**Figura 19. Efecto del silenciamiento de calpaína-like sobre la viabilidad celular de *E. histolytica* incubada con G418. (A)** Citometría de flujo celular. Control negativo, trofozoítos no tratados; trofozoítos después de una incubación de 9 h con 10 µg / ml de G418; trofozoítos pre-incubados durante 24 h con secuencias siRNA de NRS o para calpaína-like luego de 9 h con 10 µg / ml de G418. **(B)** Análisis estadístico de (A). \* Indica diferencia estadísticamente significativa: p <0,05.

### **Interacciones hipotéticas de grainina-2 y calpaína-like.**

Se hizo una búsqueda de redes de interacción proteica de grainina-2 y calpaína-like. Para ello, se analizaron las proteínas en la base de datos STRING 10.5 para crear una red putativa de proteínas que interactúan con estas proteínas. Para hacer la predicción, seleccionamos el interactoma en función de literatura, experimentos, bases de datos, co-expresión, vecindad, fusión de genes y coexistencia. Los resultados sugirieron que 20 proteínas podrían tener varias interacciones posibles entre ellas con un valor de p de  $1.23e-07$  (Figura 20). Este interactoma contiene proteínas relacionadas con la endocitosis, como las proteínas de tráfico vesicular, proteínas relacionadas con el transporte vacuolar, proteínas con dominios de dedos de zinc relacionados con la unión al DNA y proteínas con dominios de unión a calcio con dominios EF-hand, como las graininas-1 y -2 (Tabla 4). Debido a este resultado, grainina-2 con ID: EHI\_111720 y calpaína-like con ID: EHI\_045290 pudieran estar interaccionando.



**Figura 20. Redes de interacción proteica predichas de grainina-2 y calpaína-like de *E. histolytica*.** El programa de interacción proteína-proteína STRING 10.5 (<https://string-db.org>) se usó para predecir los procesos biológicos, así como las redes interactivas en las que podría estar involucrada las proteínas grainina-2 y calpaína-like de *E. histolytica*.

**Tabla 4.** Proteínas componentes del interactoma predicho de grainina-2 y calpaína-like de *E. histolytica*.

ID	NOMBRE	FUNCIÓN
<b>TRANSCRIPCIÓN</b>		
EHI_140990	Repetidos ricos en leucina / proteína que contiene el dominio 2C de fosfatasa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión a iones metálicos</li> <li>• Actividad de fosfatasa de fosfoproteína</li> </ul>
EHI_167290	Repetidos ricos en leucina / proteína que contiene el dominio 2C de fosfatasa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión a iones metálicos</li> <li>• Actividad de fosfatasa de fosfoproteína</li> </ul>
EHI_081720	Repetidos ricos en leucina / proteína que contiene el dominio 2C de fosfatasa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mantenimiento de células epiteliales de polaridad apical / basal.</li> <li>• Actividad catalítica</li> <li>• Transducción de señales</li> </ul>
EHI_178020	Repetidos ricos en leucina / proteína que contiene el dominio 2C de fosfatasa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actividad catalítica</li> </ul>
EHI_106660	Proteína putativa no caracterizada	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión a ácido nucleico</li> </ul>
EHI_102930	Proteína putativa no caracterizada	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión a ácido nucleico</li> </ul>
EHI_119320	Histona desacetilasa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrólisis de un residuo de acetil-lisina N6 de una histona para producir una histona desacetilada.</li> </ul>
EHI_004820	Proteína putativa no caracterizada	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión a ácido nucleico</li> </ul>
EHI_183130	Proteína putativa no caracterizada	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión a ácido nucleico</li> </ul>

RNA_EHI_102930-1	Proteína putativa no caracterizada	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión a ácido nucleico</li> </ul>
RNA_EHI_106660-1	Proteína putativa no caracterizada	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión a ácido nucleico</li> </ul>

## PROTEÓLISIS

EHI_197020	Señal peptidasa, putativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Escisión de secuencias hidrófobas, de señal N-terminal o de secuencias líder de proteínas secretadas y periplásmicas.</li> <li>• Procesamiento del péptido señal.</li> </ul>
EHI_045290	Calpaína, familia cisteína proteasa putativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actividad de endopeptidasa tipo cisteína dependiente del calcio.</li> <li>• Unión de iones metálicos</li> </ul>

## PROTEÍNAS DE UNIÓN A CA<sup>+2</sup>

RNA_EHI_111720-1	Grainina-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión de iones calcio</li> </ul>
EHI_060380	Grainina, putativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión de iones calcio</li> </ul>
EHI_167300	Grainina-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión de iones calcio</li> </ul>
EHI_120360	Grainina, putativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión de iones calcio</li> </ul>
EHI_164440	Actinina-like, putativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión de iones calcio</li> </ul>
EHI_164430	Actinina-like, putativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión de iones calcio</li> </ul>
EHI_060740	Proteína que contiene dominio de unión al calcio EF-hand	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión de iones calcio</li> <li>• Unión de iones metálicos</li> </ul>
EHI_197510	Proteína que contiene dominio de unión al calcio EF-hand	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión de iones calcio</li> </ul>
EHI_111720	Grainina-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión de iones calcio</li> </ul>

## ENDOCITOSIS

EHI_181220	Adhesina; Adhesina 112 (EhADH112)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ruta de transporte endosomal por vía cuerpos multivesiculares</li> </ul>
EHI_167710	Proteína no caracterizada putativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proteína no caracterizada</li> </ul>
EHI_165220	Proteína no caracterizada putativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proteína no caracterizada</li> </ul>
EHI_118900	Proteína de transporte vacuolar VPS4, putativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>Unión a ATP</li> </ul>
EHI_045320	Proteína de transporte vacuolar 36, putativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>Unión a ubiquitina</li> <li>Transporte de proteínas a la vacuola involucrado en el proceso catabólico dependiente de la ubiquitina a través de la vía de transporte de cuerpos multivesiculares.</li> </ul>
EHI_169820	Proteína de la familia SNF7	<ul style="list-style-type: none"> <li>Transporte vacuolar</li> </ul>
EHI_194400	Proteína de la familia SNF7	<ul style="list-style-type: none"> <li>Transporte vacuolar</li> </ul>
EHI_137860	Proteína no caracterizada putativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>Actividad de homodimerización de proteínas</li> <li>Transporte de proteínas a la vacuola involucrado en el proceso catabólico dependiente de la ubiquitina a través de la vía de transporte de cuerpos multivesiculares.</li> </ul>
EHI_131120	Subunidad EAP30 complejo ELL, putativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>Transporte de proteínas a la vacuola involucrado en el proceso catabólico dependiente de la ubiquitina a través de la vía de transporte de cuerpos multivesiculares.</li> </ul>

## 8. DISCUSIÓN

La muerte celular programada involucra una cascada compleja de eventos caracterizados por distintos cambios morfológicos y bioquímicos desencadenados por un grupo de cisteína proteasas (Samali et al., 1999). En los eucariotas, la expresión y activación de las cisteína proteasas, como las caspasas, las metacaspasas o la calpaína, se producen cuando aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Elmore, 2007). Las calpaínas, enzimas que pertenecen a la familia de las cisteína proteasas dependientes de calcio, también se han implicado en las vías pro-apoptóticas por la escisión de proteínas asociadas a la apoptosis, como las caspasas 7 (Gafni et al., 2009), Bax, Bcl-2 (Gao y Dou, 2000), Jun y Fos (Hirai et al., 1991), caspasa 12 y Jnk (Tan et al., 2006). Varios hallazgos en eucariotas superiores han sugerido un papel de las calpaínas en la fase de ejecución de PCD. Por ejemplo, se ha descrito que un inhibidor de las calpaínas previene la apoptosis de las células gliales inducida por la silibinina, un flavonoide polifenólico natural (Jeong et al., 2011). Además, se ha demostrado que la calpaína-2 desempeña un papel crucial en la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno en las células AR42J pancreáticas (Hiemer et al., 2017).

*E. histolytica* no tiene caspasas canónicas. Sin embargo, la MCP es inhibida por E-64, un inhibidor específico de la cisteína proteasas (Villalba et al., 2007), y la actividad de calpaína aumenta cuando las especies de óxido nítrico inducen a los trofozoítos a la MCP (Nandi et al., 2010).

El ión calcio también desempeña un papel crucial en numerosas funciones celulares, en la ameba (Bhattacharya, et al., 2006). Las amebas matan a una variedad de células huésped en una reacción citolítica rápida y dependiente del contacto en la que se considera que transfieren moléculas citolíticas a la membrana de la célula diana tras la exocitosis de gránulos (Nickel, et al., 2000). Por lo tanto, las vesículas granulares se han visto como equivalentes funcionales de los lisosomas y las vesículas citotóxicas de las células eucariotas superiores (Nickel, et al., 2000). En el interior de los gránulos amebianos hay potentes factores hidrolíticos como lisozimas, colagenasas, fosfolipasas, cisteína proteinasas, los amebapores formadoras de poros y graininas (Jacobs y Leippe , 1995; Serrano, et al ., 1994; Vargas-Villarreal, et al.,

1998; Nickel, et al., 2000), estas últimas proteínas se desconoce exactamente su papel, sin embargo, se ha visto modificada su expresión cuando la MCP es inducida por G418 en *E. histolytica* (Sánchez, et al., 2010), posiblemente como el aumento del calcio citosólico que activa a las proteínas de unión al calcio. El ión calcio también se ha visto involucrado en la agregación, la adhesión, la secreción de proteínas, la dinámica de la membrana en la endocitosis y la apoptosis (Clapham, 1995).

Por lo tanto, grainina-2 y calpaína-like, proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  o activadas por este ión, pueden desempeñar un papel crucial en este proceso de MCP. Al analizar las secuencias y dominios conservados en la arquitectura de las proteínas de interés, se encontró que grainina-2 prácticamente está compuesta por dominios de unión a calcio denominados EF-hands. Tomando en cuenta el reporte de Sánchez et al (2010), donde al hacer un alineamiento mediante BLAST de grainina-2 se encontró que existe una homología del 41 % entre grainina-2 y las calmodulinas de *T. gondii* y *T. brucei*, se decidió analizar a las calmodulinas mediante SMART y se observó que las tres proteínas comparten fundamentalmente los dominios dominios EF-hands de ahí su homología previamente reportada, además se conoce que calmodulina está relacionada en la recaptura de calcio citosólico en eventos de apoptosis (Sánchez, 2010). Por otro lado, en nuestro grupo de trabajo al hacer una búsqueda de calpaína por homología dentro del genoma de la amiba se detectó que existe una proteína que contiene los aminos que conforman el dominio 2 de calpaína, en el cual están presentes los residuos cisteína, histidina y asparagina altamente conservados en la triada catalítica, característica importante que nos hace sugerir que calpaína podría desempeñar funciones similares a las caspasas como enzimas proteolíticas. Las caspasas rompen a la poli ADP-ribosa polimerasa (PARP), molécula implicada en la maquinaria celular que repara el daño en el DNA, activan la vía que conduce a la condensación de la cromatina y participan en la destrucción de la lámina nuclear y de las proteínas del citoesqueleto, se conoce que la apoptosis acompaña a una reorganización dramática del citoesqueleto debido a la proteólisis selectiva de sustratos celulares vitales (Kerr et al., 1972). Por lo tanto, la proteólisis regulada por calpaínas es necesaria para el control de procesos celulares fundamentales que

incluyen la remodelación del citoesqueleto y la activación de cascadas proteolíticas que conducen a la apoptosis (Saïdo et al., 1994).

Por otro lado, contiene un dominio LIM de unión a zinc, que puede mediar interacciones proteína-proteína. Sin embargo, esta proteína no contiene el dominio 4 o los sitios EF-hands, considerándose como una calpaína-like (Sánchez, 2015), a pesar de esto, se encontró que dentro del dominio II de calpaína-like de *E. histolytica* hay dos sitios de unión a calcio ancestralmente conservados (Sánchez, 2015) debido a que es una proteína dependiente de calcio. Las calpaínas presentes en los tejidos de los vertebrados se han denominado según la cantidad de  $Ca^{+2}$  que necesitan para su máxima actividad en  $\mu$ -calpaína (3-50  $\mu$ M), la m-calpaína (40-800  $\mu$ M) (Goll et al., 1992).

En este trabajo con la finalidad de poder construir modelos tridimensionales procedimos a usar el programa I-TASSER, se tomaron las secuencias proteicas de grainina-2 y calpaína-like de *E. histolytica* de manera independiente para ser comparada con un cluster de moldes, los cuales son cristales de proteínas reportadas en la base de datos. Dentro del análisis de grainina-2, el programa I-TASSER utilizó el molde de PDCD6 de *L. major*, la cual se ha visto que es una proteína multifuncional, incluyendo su participación en la MCP, teniendo un papel anti-apoptótico (Su D, et al., 2012), que más adelante se describe. Al hacer el empalme mediante el programa CHIMERA de PDCD6 y grainina-2 se obtuvo una homología de 25.27%, dicho porcentaje aumentó al comparar solo los dominios EF-hands de ambas estructuras 3D resultando un 34.74% de identidad, sugiriendo también una posible identidad funcional. En el caso de calpaína-like de *E. histolytica*, el modelo generado por I-TASSER fue comparado con el dominio-II de calpaína-1 de *Homo sapiens*. Dentro de la estructura 3D señalamos al dominio II que contiene los residuos de la tríada catalítica (Cys57, His206 y Asn226) y a pesar de estar filogenéticamente distante de la calpaína-1 típica, el dominio II de calpaína-like de *E. histolytica* mostró una identidad del 34,88% con el mismo dominio de la calpaína-1 humana. Existen varios hallazgos donde calpaínas de eucariotes superiores ha sido implicada en la regulación de vías de apoptosis, por ejemplo calpaína-1 de humano, la cual es una calpaína típica (Smith y Schnellmann, 2012).

El análisis de la expresión de los genes *grainina-2* y *calpaína-like* se monitoreo mediante qRT-PCR y se observó que hay una sobreexpresión del gen *grainina-2* a los 30 min en comparación con el tiempo 0, como previamente lo reporto Sánchez et al. (2011). Esto concuerda con un incremento de calcio citosólico de las amibas expuestas a G418 desde los 20 min (Villalba, 2007). Este aumento de calcio pudiera estar activando genes que codifiquen para proteínas de unión a calcio, como por ejemplo *grainina-2*, como un mecanismo de captura de calcio libre y, por lo tanto, un papel compensatorio a tiempos tempranos de la MCP. Sin embargo, al paso del tiempo de exposición a G418 que genera la MCP, *grainina-2* disminuye significativamente a partir de las 3 h y hasta las 9 h. Este resultado correlaciona con lo encontrado en los análisis proteómicos realizados en los trabajos de maestría (2013), donde *grainina-2* fue una proteína diferencial detectada en perfiles de geles bi-dimensionales y fue detectada desde tiempos 0 h hasta las 6 h de exposición con G418 y es hasta las 9 h cuando la proteína aparentemente desaparece. Podríamos considerar que la capacidad de sobrevivencia de la amiba disminuye debido a un daño irreversible generado por la inducción de G418 a MCP, ya que como se ha reportado a las 9 h la amiba ya presenta condensación de la cromatina entre otras características que definen al evento de MCP (Villalba, 2007).

Por otra parte, el transcrito de *calpaína-like* disminuye su expresión a los 30 min de exposición a G418, mientras que a 1.5 h hay una sobreexpresión del gen *calpaína-like* que pudiera también estar relacionada con la activación de genes que codifican para proteínas de unión a calcio, debido al incremento de calcio citosólico hasta los 140 min (Villalba, 2007). Sin embargo, a las 3, 6 y 9 h la expresión de *calpaína* decae, sugiriendo que la misma sobreexpresión del transcrito a 1.5 h pudiera estar generando una sobreexpresión de la proteína con actividad pro-apoptotica en la fase media y ejecutora de la MCP, en concordancia con la actividad enzimática, la cual muestra una alta actividad a tiempos largos de inducción a MCP, relacionada con la fragmentación del DNA y la muerte de la amiba (Sánchez et al., 2015). Además, al colocar un inhibidor específico de *calpaína*, la fragmentación del DNA disminuye considerablemente (Sánchez, 2015).

Posteriormente, usando anticuerpos específicos, grainina-2 se localizó aparentemente cerca de la membrana celular y distribuída en el citoplasma específicamente en gránulos. Nickel et al (2000) a partir de gránulos de *E. histolytica* purificaron a grainina-1 y -2, por lo que nuestros resultados concuerdan al haber localizado mediante microscopía confocal a grainina-2 en gránulos citoplasmáticos. Mientras que, calpaína-like se localizó en el citoplasma, similar a las células de neuroblastomas donde se ha reportado que calpaína se localiza en el citoplasma (Matthew et al, 2006). Sin embargo, al inducir la MCP se observó una expresión tiempo dependiente, donde a las 9 h aparentemente es relocalizada cercana al núcleo. La regulación de la proteólisis por calpaína es requerida para el control de procesos celulares fundamentales incluyendo la remodelación del citoesqueleto, fusión de membrana, proliferación y diferenciación celular, y la activación de cascadas proteolíticas que dirigen hacia la apoptosis (Saido et al., 1994). Este hecho es concordante con el resultado aquí reportado ya que calpaína es encontrada en el citoplasma con una expresión basal, por otro lado, cuando los trofozoítos son expuestos a G418, calpaína-like aumenta probablemente debido a su papel en el rearrreglo del citoesqueleto durante la apoptosis. Una vez activadas, las calpaínas degradan sustratos membranales, citoplásmicos y nucleares, que dirigen hacia el rompimiento de la arquitectura celular (Momeni et al., 2011).

Para comprobar el papel de grainina-2 y calpaína-like de *E. histolytica* en la MPC, su expresión fue silenciada mediante secuencias de siRNA. Una disminución del 36% de la expresión de grainina-2 provocó un aumento en la fragmentación del DNA (aproximadamente un 18%) a las 6 h de inducción a la MCP. De acuerdo con lo anterior, la viabilidad celular durante esa condición fue de 62%, mientras que en el control negativo fue de 73%, es decir, que el silenciamiento de grainina-2 incrementó en 11% la MPC a las 6 h de incubación con G418. Debido a que no se observó en los trofozoítos silenciados para grainina-2 una gran diferencia en el porcentaje de fragmentación del DNA y en la viabilidad celular con respecto a los controles, sugerimos que posiblemente existen otras proteínas amebianas de unión a  $Ca^{2+}$  que juegan un papel similar a grainina-2 en la fase inicial de la MCP.

Por otra parte, en eucariotes superiores, las calpaínas han sido involucradas en la fragmentación del DNA via activación de endonucleasas (Squier and Cohen, 1997; Villa et al., 1998), y como proteasas efectoras que escinden proteínas celulares involucradas en la reparación del DNA. Por ejemplo, tras la activación, la  $\mu$ -calpaína humana se traslada al núcleo, donde corta a PARP y a p53 (Tagliarino et al., 2001). Por otro lado, calpaína es ubicada en el núcleo de *Plasmodium falciparum*, la cual se ha asociado con la progresión del ciclo celular (Russo et al., 2009). Por lo tanto, la observación de la localización de calpaína-like en el área perinuclear de los trofozoitos a las 9 h después de la inducción de MCP sugiere que esta proteasa puede participar en la activación posterior de proteínas relacionadas con la fragmentación del DNA. Esta hipótesis está respaldada por un aumento en la viabilidad de los trofozoitos y por el bloqueo de la fragmentación del DNA en parásitos inducidos a MCP y tratados con el inhibidor de calpaína Z-Leu-Leu-Leu-al (Sánchez et al., 2015). En este trabajo, el silenciamiento de calpaína-like causó una disminución considerable en la señal positiva para TUNEL (aproximadamente un 70% comparada con los controles) a las 9 h de inducción a la MCP por G418. Similarmente, la viabilidad celular a este tiempo se incrementó aproximadamente un 21% en comparación con trofozoitos controles. Estos resultados respaldan la hipótesis de que esta proteasa de cisteína participa en la fase de ejecución de la MCP. De manera similar, la reducción mediada por el silenciamiento de calpaína-1 en cultivos neuronales sometidos a apoptosis impidió la translocación del factor inductor de apoptosis (AIF) al núcleo, aumentando así la viabilidad celular (Cao et al., 2007; Jeong et al., 2011), y la disminución de calpaína-2 aumentó la viabilidad de las células AR42J pancreáticas tratadas con peróxido de hidrógeno (Hiemer et al., 2017).

Los análisis de interacción proteína-proteína permitieron identificar otras proteínas que posiblemente participan en la MCP de este parásito. Este estudio se inició analizando el interactoma putativo utilizando la base de datos String 10.5. Los resultados sugieren que al menos 20 proteínas pueden tener varias interacciones posibles entre ellas con un valor p de  $1.23e-07$ . Las interacciones de grainina-2 y calpaína-like aún no se han informado en la base de datos de *E. histolytica*. En este análisis identificamos

proteínas que participan en la endocitosis, como *vps36* y *snf7*, proteínas de unión a zinc, así como proteínas que pueden unirse al calcio, incluidos las *graininas-1* y *-2*. Curiosamente, estudios previos han demostrado un aumento en la expresión de los genes *grainina-1* y *-2* a los 30 minutos de la inducción de MCP con G418, lo que sugiere que estas proteínas podrían actuar como reguladores negativos de este evento que intentan regular la concentración de calcio citosólico libre relacionada con la activación de la MCP (Sánchez et al., 2010). Este supuesto se debe a que otras proteínas con motivos EF-hand, como las calmodulinas (CaM) y la proteína cinasa dependiente de la calmodulina (CaMKIV), que interactúan con la calpaína son críticas para mejorar la supervivencia (Strobl et al., 2000). Además de CaM (Berchtold y Villalobo, 2014), otras proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , incluidas las calpaínas, desempeñan funciones importantes en la transducción de señales que conducen al control de la proliferación celular, así como a la muerte celular (Yinfei, et al., 2011). *In vitro*, se sabe que el  $\text{Ca}^{2+}$  cambia la conformación de la calpaína, lo que afecta su escisión y activación autocatalítica (Strobl et al., 2000). Además, se ha demostrado que la proteasa calpaína activada por  $\text{Ca}^{2+}$  es un factor pro-apoptótico por su capacidad para escindir y activar diversas proteínas implicadas en el proceso apoptótico (Momeni, 2011). Curiosamente, prácticamente todas las proteínas que se unen a CaM también son sustratos de calpaína (Wang et al., 1989); por lo tanto, un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular estimula la proteólisis de las proteínas necesarias para la proliferación y viabilidad y desencadena la muerte celular programada (Berridge et al., 2003; Smyth et al., 2012).

Otras proteínas, como el receptor de andrógenos (AR) que se requiere para el crecimiento de cáncer de próstata se escinde por la calpaína en presencia de altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , debido a la liberación de calpaína del complejo calpaína-CaM-calpastatina. Además, se ha demostrado que la proteólisis de CaMKIV mediada por calpaína desencadena la apoptosis en neuronas cultivadas (Tremper-Wells y Lou Vallano, 2005).

Considerando una clasificación actualizada de la muerte celular centrada en los aspectos mecanicistas y esenciales morfológicos, bioquímicos y funcionales del proceso (Galluzzi et al., 2018), podríamos especular que la MCP de *E. histolytica* está

relacionada con la muerte celular dependiente de lisosoma (LDCD). La muerte celular programada descrita en *E. histolytica* y la LDCD clasificada por Galluzzi y cols, son inducidos por estímulos similares, tales como perturbaciones de la homeostasis intracelular, estrés celular, ROS y desequilibrio en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . La LDCD está demarcada por la permeabilización de las membranas lisosomales (LMP) y la liberación de contenidos lisosómicos, incluidas las enzimas proteolíticas de la familia de las catepsinas al citoplasma (Aits y Jäättelä, 2013). Otros desencadenantes incluyen agentes lisosomotrópicos (por ejemplo, esfingosina) y la activación de calpaínas (Gomez et al., 2016). Las ROS desempeñan un papel causal prominente en la LMP, no solo por la producción luminal de radicales hidroxilo impulsada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kurz et al., 2008), sino también porque las ROS favorecen la activación de los canales lisosomales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Sumoza et al., 2011).

En general, los resultados presentados aquí proporcionan una fuerte evidencia de que grainina-2 y calpaína-like de *E. histolytica* desempeñan un papel importante en la fase temprana y ejecutora de la MCP. Identificamos aquí *in silico*, algunas proteínas que podrían interactuar con grainina-2 y calpaína-like de *E. histolytica*. De acuerdo con el interactoma hipotético, estas dos proteínas de interés podrían estar interaccionando entre sí. Los experimentos moleculares y bioquímicos actualmente en progreso nos permitirán descubrir nuevos conocimientos sobre los roles lisosómicos y otras vías en el control de la MCP de *E. histolytica*.

## 9. CONCLUSIÓN

- Grainina-2, contiene 3 dominios EF-hands y su estructura 3D hipotética tiene mayor similitud con PDCD6 de *L. major*, y en menor grado con las calmodulinas de *T. gondii* y *T. brucei*.
- Calpaína-like, pertenece a la familia CP, debido a que conserva el dominio II, donde se encuentra la triada catalítica y dos sitios de unión a Ca<sup>2+</sup>. Al carecer de los dominios EF-hand es considerada una calpaína-like y su estructura 3D hipotética tiene similitud a la calpaína-1 de humano.
- Debido a que la MCP es un mecanismo genéticamente controlado, encontramos que el gen de grainina-2 se sobre-expresó a los 30 min, mientras que el gen de calpaína-like se sobre-expresó hasta los 90 min.
- La proteína grainina-2 se localiza en el citoplasma y cerca de la membrana en condiciones normales. Al inducir la MCP, se distribuye en el citoplasma para relocalizarse en vesículas ácidas y disminuye su expresión a las 9 h. Por el contrario, calpaína-like se localiza en el citoplasma durante la MCP, sobreexpresándose de manera creciente hasta a las 9 h.
- Finalmente, podemos sugerir que grainina-2 tienen un papel anti-apoptótico en la fase inicial de la MCP, ya que al silenciarla se observó un aumento del 18% en la fragmentación del DNA y una disminución de la viabilidad del 11%. Mientras que calpaína-like tiene un papel pro-apoptótico en la fase ejecutora de la MCP, ya que al silenciarla se observó una disminución del 70% de la fragmentación del DNA y una recuperación de la viabilidad celular aproximadamente del 21%.

## 10. PRESPECTIVAS

- Analizar *in silico* el interactoma propuesto en este trabajo, específicamente si grainina-2 y calpaína-like interactúan y de qué manera.
- Realizar inmunoprecipitaciones con algunas de las proteínas mencionadas en el interactoma de este trabajo.
- Buscar la endonucleasa que pudiera activar calpaína-like y que esté involucrada en la fragmentación del DNA durante la MCP inducida por G418.
- Buscar que proteínas relacionadas a grainina-2 pudieran tener un papel similar o redundante a esta, con la finalidad de silenciar proteínas con papel anti-apoptótico.
- Realizar cepas mutantes en la sobreexpresión de grainina-2 y calpaína-like para confirmar su papel en la MCP propuesto en este trabajo.
- Realizar cepas mutantes con la inhibición de la expresión y sobreexpresión de grainina-2 y calpaína-like en un modelo *in vivo*, con la finalidad de detectar si ambas proteínas son posibles blancos terapéuticos en contra de la amibiasis basada en la MCP de *E. histolytica*.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Ackers, J. P. M., D. (2006). Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 9(4): 367-373.

Aguilar-Díaz, H., Díaz-Gallardo, M., Laclette, J.P., Carrero, J.C. (2010). In vitro Induction of *Entamoeba histolytica* Cyst-like Structures from Trophozoites. *PLoS Negl Trop Dis* 4(2): e607. doi:10.1371/journal.pntd.0000607.

Altnauer, F., Conus, S., Cavalli, A., Folkers, G., and Simon, H. U. (2004). *J. Biol. Chem.* 279, 5947–5957.

Ameisen, J. C., Idziorek, T, Billaut-Mulot, O. (1995). Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ.* 2:285–300.

Ankri, S. S., T. Mirelman, D. (1998). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol* 28(4): 777-785.

Arbo, A. H., M. Ramirez, A. Ignacio Santos, J. (1990). *Entamoeba histolytica* inhibits the respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes. *Arch Invest Med (Mex)* 21 Suppl 1: 57-61.

Arroyo, R. O., E. (1987). Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol Biochem Parasitol* 23(2): 151-158.

Azam, A. P., J. Sehgal, D. Prasad, J. Bhattacharya, S. Bhattacharya, A. (1996). Identification of novel genes from *Entamoeba histolytica* by expressed sequence tag analysis. *Gene* 181(1-2): 113-116.

Barras, D y Widmann, C. (2011) Promises of apoptosis-inducing peptides in cancer therapeutics. *Curr Pharm Biotechnol* 12: 1153-1165.

- Basmaciyan, L., Azas, N y Casanova. M. (2018). Different apoptosis pathways in Leishmania Parasites. Cell Death Discovery. 4:90.
- Baxt, L. A. S., U. (2008). New insights into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. Curr Opin Infect Dis 21(5): 489-494.
- Begum, S., Quach, J y Chadee, K. (2015). Immune Evasion Mechanisms of *Entamoeba histolytica*: Progression to Disease. Front Microbiol. 6:1394. doi: 10.3389/fmicb.2015.01394.
- Bellairs, R. (1961). Cell death in chick embryos as studied by electron microscopy. J Anat 95(Pt 1): 54-60 53.
- Berninghausen, O. L., M. (1997). Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. Infect Immun 65(9): 3615-3621.
- Bhattacharya, A., Narendra, A., Padhan, A., Ruchi, J y Bhattacharyab, S. (2006). Calcium-Binding Proteins of *Entamoeba histolytica*. Archives of Medical Research 37 (2006) 221–225.
- Biagi, F. B., F. Ortega, P. S. (1966). Remobilization of *Entamoeba histolytica* after exposure to immobilizing antibodies. Exp Parasitol 18(1): 87-91.
- Braga, L. L. N., H. McCoy, J. J. Adal, K. Wiedmer, T. Pham, C. Sims, P. J. Petri, W. A., Jr. (1992). Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res 23(2): 133.
- Bruchhaus, I., Loftus, B. J., Hall, N y 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(3), 501-9.
- Caballero-Salcedo, A., Viveros-Rogel, M., Salvatierra, B., Tapia-Conyer, R., Sepúlveda-Amor, J., Gutiérrez, J y Ortiz-Ortiz, L. (1994). Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50:412–419.

- Calderon, J. T.-G., R. (1980). Loss of susceptibility to antibody and complement mediated lysis in *E. histolytica*. Arch Invest Med (Mex) 11(1 Suppl): 241-244.
- Canales-Trevino, M. L. (1986). Experimental amebiasis in the guinea pig: a model for resistance. Arch Invest Med (Mex) 17 Suppl 1: 223-228.
- Carrero, J. C. C.-R., C. Aguilar-Diaz, H. Diaz-Gallardo, M. Y. Laclette, J. P. Morales-Montor, J. (2007). The role of the secretory immune response in the infection by *Entamoeba histolytica*. Parasite Immunol 29(7): 331-338.
- Choudhuri, G., Prakash, V., Kumar, A., Shahi, S. K y Sharma, M. (1991). Protective immunity to *Entamoeba histolytica* infection in subjects with antiamebic antibodies residing in a hyperendemic zone. Scand. J. Infect. Dis. 23:771–776.
- Clapham, D. E. (1995). Calcium signaling. Cell. 80, 259–268.
- Cole, B. A. K., J. F. (1953). Immobilization of *Endamoeba histolytica in vitro* by antiserum produced in the rabbit. Proc Soc Exp Biol Med 83(4): 811-814.
- Conde-Bonfil, M. C. d. I. M.-Z., C. (1992). *Entamoeba histolytica*: a standing threat. Salud Publica Mex 34(3): 335-341.
- Cornick, S y Chadee, K. (2017). *Entamoeba histolytica*: Host parasite interactions at the colonic epithelium. Tissue barriers, 5(1), e1283386.
- Darmon, A. J., Nicholson, D. W., Bleackley, R. C. (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. Nature. 377:446-8.
- De Morais, C. G., Castro Lima, A. K., Terra, R., dos Santos, R. F., Da-Silva, S. A y Dutra, P. M. (2015). The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania spp.* and *Trypanosoma cruzi* Infection. BioMed research international, 2015, 324915.
- Debrabant, A., Lee, N., Bertholet, S., Duncan, R., Nakhasi, H. L. (2003). Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. Int J Parasitol. 33(3):257–267.

Dewson, G y Kluck, R. M. (2009) Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J Cell Sci* 122: 2801-2808.

Diamond, L. S., D. R. Harlow, et al. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72(4): 431-432.

Domínguez-Fernández, T. (2012). Análisis proteómico de la apoptosis en *E. histolytica*. (Tesis de maestría). Biomedicina Molecular. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía e IPN, CDMX.

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.

Espinosa-Cantellano, M. M.-P., A. (2000). Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* 13(2): 318-331.

Ewen, C.L., Kane, K.P., Bleackley, R.C. (2012) A quarter century of granzymes. *Cell Death Differ* 19: 28-35.

Fadok, V. A., Bratton, D. L y Henson, P. M. (2001). Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *The Journal of clinical investigation*, 108(7), 957-62.

Fleming, R., Cooper, C.J., Ramirez-Vega, R., Huerta-Alardin, A., Boman, D., Zuckerman, M.J. (2015). Clinical manifestations and endoscopic findings of amebic colitis in a United States-Mexico border city: a case series. *BMC Res Notes*. Dec 14;8:781.

Ghosh, A. S. D., S. Raha, S. (2010). Hydrogen peroxide-induced apoptosis-like cell death in *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Int* 59(2): 166-172.

Goldsmith, M. (1966). The anatomy of cell death (Abstr.). *J. Cell Bio* 31: 41.

Goldston, A. M., Powell, R. R., Koushik, A. B y Temesvari, L. A. (2012). Exposure to host ligands correlates with colocalization of Gal/GalNAc lectin subunits in lipid rafts

and phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate signaling in *Entamoeba histolytica*. Eukaryotic cell, 11(6), 743-51.

Goll, D., Valery, E., Thompson, F., Hongqi, Li., Wei, W y Cong, J. (2003). The Calpain System. Physiol Rev. 83: 731–801.10.1152/physrev.00029.2002.

Goll, D.E., V.F., Thompson, R.G., Taylor; y J.A. Christian. (1992). Properties and regulation of the calpain system and its role in muscle growth. Biochimie 74:225.

Gunther, J., Shafir, S., Bristow, B., & Sorvillo, F. (2011). Short report: Amebiasis-related mortality among United States residents, 1990-2007. The American journal of tropical medicine and hygiene, 85(6), 1038-40.

Haque, R. (2001). Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. J Infect Dis 183(12): 1787-1793.

Hawkins, C.J., Yoo, S.J., Peterson, E.P., Wang, S.L., Vernooy, S.Y., Hay, B.A. (2000). The Drosophila caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM. J. Biol. Chem. 275, 27084–27093.

He, B., Lu, N., y Zhou, Z. (2009). Cellular and nuclear degradation during apoptosis. Current opinion in cell biology, 21(6), 900-12.

Hsu, C. A. R., A. K. Su-Li, X. Gerald, T. M. Dawson, M. I. Schiffer, C Reichert, U. Shroot, B. Poirer, G. C. Fontana, J. A. (1997). Retinoid induced apoptosis in leukemia cells through a retinoic acid nuclear receptor-independent pathway. Blood 89(12): 4470-4479.

Hughes, M. A. P., W. A., Jr. (2000). Amebic liver abscess. Infect Dis Clin North Am 14(3): 565-582.

Jacobs, T y Leippe, M. (1995) Eur. J. Biochem. 231, 831^838.

Jiménez-Ruiz, A. et al. (2010). Apoptotic markers in protozoan parasites. Parasit. Vectors 3, 104.

Kaushansky, A., Metzger, P.G., Douglass, A.N., Mikolajczak, S.A., Lakshmanan, V, et al. (2013). Malaria parasite liver stages render host hepatocytes susceptible to mitochondria-initiated apoptosis. *Cell Death Dis* 4: e762.

Kelsall, B. L. R., J. I. (1993). Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 168(5): 1319-1322.

Kuldeep, V y Sunando, D. (2017). The Monomeric GTPase Rab35 Regulates Phagocytic Cup Formation and Phagosomal Maturation in *Entamoeba histolytica*. *Journal of biological chemistry*. Vol. 292, no. 12, pp. 4960 –497.

Lee, Y. A., Y. Saito-Nakano, et al. (2015). Modulation of endogenous Cysteine Protease Inhibitor (ICP) 1 expression in *Entamoeba histolytica* affects amoebic adhesion to Extracellular Matrix proteins. *Exp Parasitol* 149: 7-15.

Leroy, A. (2000). *Entamoeba histolytica* disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers. *FASEB J* 14(9): 1139-1146.

Li, M. (2000). Functional Role of Caspase-1 and Caspase-3 in an ALS Transgenic Mouse Model. *Science*, 288(5464), 335–339. doi:10.1126/science.288.5464.335.

Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147–157.

Low P. (2006). The Role of Proteasome in Apoptosis. In: Srivastava R. (eds) *Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases*. Humana Press. doi.org/10.1007/978-1-59745-199-4\_13.

Lu, H. F. C., Y. S. Yang, J. S. Chen, J. C. Lu, K. W. Chiu, T. H. Liu, K. C. Yeh, C. C. Chen, G. W. Lin, H. J. Chung, J. G. (2008). Gypenosides induced G0/G1 arrest via inhibition of cyclin E and induction of apoptosis via activation of caspases-3 and -9 in human lung cancer A-549 cells. *In Vivo* 22(2): 215-221.

Luna-Nácar, M., Navarrete-Perea, J., Moguel, B., Bobes, R. J., Laclette, J. P y Carrero, J. C. (2016). Proteomic Study of *Entamoeba histolytica* Trophozoites, Cysts, and Cyst-Like Structures. PloS one, 11(5), e0156018. doi:10.1371/journal.pone.0156018.

Lynch, E. C., I. M. Rosenberg, et al. (1982). An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. EMBO J 1(7): 801-804.

Martin, W y Berchtold, Antonio Villalobo. (2014). The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. Biochimica et Biophysica Acta 1843 (2014) 398–435.

Martinvalet, D., Zhu, P., and Lieberman, J. (2005). Granzyme A induces caspase independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. Immunity 22, 355–70.

Masoumeh, H., Najmabadi, H., Kahrizi, K. (2018). Calpains: Diverse Functions but Enigmatic. Arch Iran Med. 21(4):170-179.

Menna-Barreto, R.F.S y Castro, S.L. (2015). Between Armour and Weapons—Cell death mechanisms in trypanosomatid parasites. In Cell Death-Autophagy, Necrosis and Apoptosis, 1st ed.; Ntuli, T., Ed.; IntechOpen: Rijeka, Croatia, pp. 195–230.

Meza, I. T.-R., P. Vargas, M. A. (2006). The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: structure, function, and regulation by signaling pathways. Arch Med Res 37(2): 234-243.

Meza, I., F. Cazares, et al. (1987). Use of antibodies to characterize a 220-kilodalton surface protein from *Entamoeba histolytica*. J Infect Dis 156(5): 798-805.

Michelsen, J. W., Schmeichel, K. L., Beckerle, M. C., & Winge, D. R. (1993). The LIM motif defines a specific zinc-binding protein domain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90(10), 4404-8.

Nakada-Tsukui, k., Okada, H., Mitra, B. N y Nozak, T. (2009). Phosphatidylinositol-phosphates mediate cytoskeletalreorganization during phagocytosis via a

uniquemodular protein consisting of RhoG EF/DH and FYVE domains in the parasitic protozoon *Entamoeba histolytica*. Cellular Microbiology, 11(10), 1471–1491.

Neal, R. A. (1971). Pathogenesis of amoebiasis. Gut 12(6): 483-486.

Nickel, R., Jacobs, T., Urban, B., Scholze, H., Bruhn, H., Leippe, M., 2000. Two novel calcium-binding proteins from cytoplasmic granules of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. FEBS Letters 486, 112–116.

Olivos-Garcia, A. N.-A., M. Tello, E. Martinez, R. D. Gonzalez-Canto, A. Lopez-Vancell, R. Garcia de Leon, M. C. Montfort, I. Perez-Tamayo, R. (2004).

Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. Exp Mol Pathol 77(1): 66-71.

Orozco, E., G. Guarneros, et al. (1983). *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. J Exp Med 158(5): 1511-1521.

Pais-Morales J, Betanzos A, García-Rivera G, Chávez-Munguía B, Shibayama M, Orozco E. (2016). Resveratrol Induces Apoptosis-Like Death and Prevents *In Vitro* and *In Vivo* Virulence of *Entamoeba histolytica*. PLoS ONE 11(1): e0146287. doi:10.1371/journal.pone.0146287.

Pérez-Ishiwara, D. G. (2019). En vías de publicación.

Perreault, N., Herring-Gillam, F. E., Desloges, N., Be´langer, I., Pageot, L. P y Beaulieu. J. F. (1998). Epithelial vs mesenchymal contribution to the extracellular matrix in the human intestine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 248:121–126.

Peter, M. E y Krammer, P.H. (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. Cell Death Differ 10: 26-35.

Pineda, E y Perdomo, D. (2017). *Entamoeba histolytica* under Oxidative Stress: What Countermeasure Mechanisms Are in Place?. Cells. 6, 44; doi:10.3390/cells6040044.

Prior, P y Salvesen, G. S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. The Biochemical journal, 384(Pt 2), 201-32.

Que, X y Reed, S. L. (2000). Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clinical microbiology reviews*, 13(2), 196-206.

Ralston K. S. (2015). Chew on this: amoebic trophocytosis and host cell killing by *Entamoeba histolytica*. *Trends in parasitology*, 31(9), 442-52.

Reed, S. L. G., I. (1990). Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. Initiation of complement activation by an extracellular neutral cysteine proteinase. *J Clin Invest* 86(6): 1815-1822.

Reed, S. L. K., W. E. McKerrow, J. H. Gigli, I. (1989). Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Immunol* 143(1): 189-195.

Rodriguez, J y Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and Apaf-1 form an active holoenzyme. *Genes & Dev.* 13: 3179–3184.

Saeed El-Ashram. (2017). Cell death offers exceptional cellular and molecular windows for pharmacological interventions in protozoan parasites. *Integr Mol Med*, 4(2): 2-15. doi: 10.15761/IMM.1000277.

Sakata, T., Niwa, Y., Goto, H., Hirooka, Y., Hayakawa, T., Ohmiya, N y Kobayashi, S. 2001. Asymptomatic inflammatory bowel disease with special reference to ulcerative colitis in apparently healthy persons. *Am. J. Gastroenterol.* 96:735–739.

Sánchez, V. (2010). *Entamoeba histolytica*: Differential gene expression during programmed cell death and identification of early pro-and anti-apoptotic signals. *Experimental Parasitology*. 126 (2010) 497–505.

Sanchez-Monroy, V., Medel-Flores, O., Gómez-García, C., Yesenia, C. M., Domínguez-Fernández, T y Pérez-Ishiwara, D. G. (2015). Calpain-like: a Ca<sup>2+</sup> dependent cystein protease in *Entamoeba histolytica* cell death. *Exp. Parasitol.* 159, 245–251. doi: 10.1016/j.exppara.2015.10.005.

Sarastea, A y Pulkic, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research* 45 (2000) 528–537.

Savill, J. F., V. Henson, P. Haslett, C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14(3): 131-136.

Sena, L. A y Chandel, N. S. (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* 48: 158-167.

Serrano, J.J., de la Garza, M., Moreno, M.A., Tovar, R., Leon, G., Tsutsumi, V. and Munoz, M.L. (1994) *Mol. Microbiol.* 11,787^792.

Seydel, K. B. S., S. L., Jr. (1998). *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis. *Infect Immun* 66(6): 2980-2983.

Sim, S. Y., T. S. Park, S. J. Im, K. I. Kong, Y. Ryu, J. S. Min, D. Y. Shin, M. H. (2005). NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of ERK1/2 is required for apoptosis of human neutrophils induced by *Entamoeba histolytica*. *J Immunol* 174(7): 4279-4288.

Singh, D., Naik, S.R., Naik, S. (2004). Role of cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* in target cell death. *Parasitology.* 129:127–135.

Stanley, S. L. (2001). "Pathophysiology of amoebiasis." *Trends Parasitol* 17(6): 280-285.

Stauffer, W. R., J. I. (2003). *Entamoeba histolytica*: an update. *Curr Opin Infect Dis* 16(5): 479-485.

Strobl, S., Fernandez-Catalan, C., Braun, M., Huber, R., Masumoto, H., Nakagawa K., et al. (2000). The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 588–592. 10.1073/pnas.97.2.588.

Stuart, L. M. E., R. A. (2005). Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* 22(5): 539-550.

Su D, Xu H, Feng J, Gao Y, Gu L, Ying L, Katsaros D, Yu H, Xu S, Qi M. (2012). PDCD6 is an independent predictor of progression free survival in epithelial ovarian cancer. *J Transl Med.* 10: 31.

Suzanne, M y Steller, H. (2013). Shaping organisms with apoptosis. *Cell death and differentiation*, 20(5), 669-75.

Tanyuksel, M. (2003). Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 16(4): 713-729.

Tillack, M. B., L. Irmer, H. Freitas, M. Gomes, M. A. Tannich, E. Bruchhaus, I. (2007). The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics* 8: 170.

Ting-Jun FAN, L.-H. H., Ri-Shan CONG, Jin LIANG (2005). Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 37: 719-727.

Torgerson, P.R., Devleeschauwer, B., Praet, N., Speybroeck, N., Willingham, A.L., Kasuga, F., et al. (2015). World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Med* 12(12): e1001920.

Tran, M.K., Kurakula, K., Koenis, D.S., de Vries. (2016). Protein–protein interactions of the LIM-only protein FHL2 and functional implication of the interactions relevant in cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1863:219–228.

Tsutsumi, V., R. Mena-Lopez, et al. (1984). Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol* 117(1): 81-91.

Ucker, D. S. (1991). Death by suicide: one way to go in mammalian cellular development? *New Biol* 3(2): 103-109.

Van Cruchten, S. and W. Van Den Broeck (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31(4): 214-223.

Van Furth, R. (1998). Human monocytes and cytokines. *Res Immunol* 149(7-8): 719-720.

Vargas-Villarreal, J., Olvera-Rodriguez, A., Mata-Cardenas, B.D., Martinez-Rogriguez, H.G., Said-Fernandez, S. and Alagon-Cano, A. (1998) *Parasitol. Res.* 84, 310-314.

Villalba, J. D. G., C. Medel, O. Sanchez, V. Carrero, J. C. Shibayama, M. Ishiwara, D. G. (2007). Programmed cell death in *Entamoeba histolytica* induced by the aminoglycoside G418. *Microbiology* 153(Pt 11): 3852-3863.

Watanabe, K., Gatanaga, H., Escueta-de Cadiz, A., Tanuma, J., Nozaki, T., & Oka, S. (2011). Amebiasis in HIV-1-infected Japanese men: clinical features and response to therapy. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(9), e1318.

WHO (1997).

Wu, J., Liu, T., Xie, J., Xin, F., and Guo, L. (2006). *Cell Mol. Life Sci.* 63, 949–957.

Wyllie, A. H. B., G. J. Hargreaves, A. D. (1981). Chromatin changes in apoptosis. *Histochem J* 13(4): 681-692.

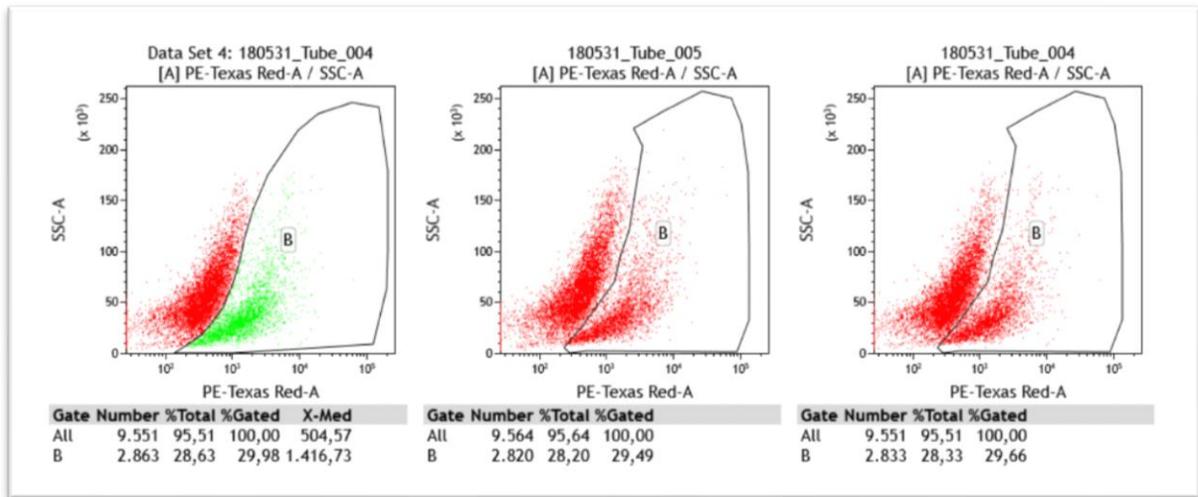
Wyllie, A. H. K., J. F. Currie, A. R. (1973). Cell death in the normal neonatal rat adrenal cortex. *J Pathol* 111(4): 255-261.

Yinfei, Tan., Chao, Wu., Teresa De Veyra y Peter A, Greer. (2011). Ubiquitous Calpains Promote Both Apoptosis and Survival Signals in Response to Different Cell Death Stimuli. *The journal of biological chemistry* vol. 281, no. 26, pp. 17689 –17698. doi 10.1074/jbc.m601978200.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90: 405–413.

## 12. ANEXOS

**Anexo 1.** Efecto del silenciamiento sobre la viabilidad celular, utilizando 100 µg/ml de siRNA para grainina-2 de *E. histolytica*.



**Anexo 2.** Artículo publicado: A Calpain-Like Protein Is Involved in the Execution Phase of Programmed Cell Death of *Entamoeba histolytica*.