



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
CAMPUS GUANAJUATO
División de Ciencias Naturales y Exactas
Departamento de Biología

**Análisis funcional de esfingomielinasas
neutras de *Entamoeba histolytica***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

PRESENTA:

QFB Luz Yolanda Urquieta Ramírez

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Luis Felipe Padilla Vaca

Dr. Luis Fernando Anaya Velázquez





Guanajuato, Gto., 16 de Mayo de 2018

Dr. Agustín Ramón Uribe Ramírez
Director de la División de Ciencias Naturales y Exactas
Universidad de Guanajuato
Presente.

Por medio de la presente hacemos constar que el trabajo de tesis Titulado “**Análisis funcional de esfingomielinasas neutras de *Entamoeba histolytica***” fue desarrollado en el Departamento de Biología por la **Q.F.B. Luz Yolanda Urquieta Ramírez**, para obtener el grado de **Doctor en Ciencias (Biología)**. El trabajo experimental realizado bajo nuestra dirección es original y cuenta con la calidad y rigor científicos requeridos para una tesis de doctorado.

Atentamente



Dr. Luis Felipe Padilla Vaca



Dr. Luis Fernando Anaya Velázquez

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato de la Universidad de Guanajuato, bajo la dirección del Dr. Luis Felipe Padilla Vaca y del Dr. Luis Fernando Anaya Velázquez. Para la realización de dicho trabajo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CB-2012/182671) y de la Universidad de Guanajuato (89/2016).

Para la realización del presente trabajo la Q.F.B. Luz Yolanda Urquieta Ramírez recibió una beca del CONACYT.

El jurado de evaluación del proyecto “Análisis funcional de esfingomielinasas neutras de *Entamoeba histolytica*” estuvo integrado por:

Dr. Julio César Villagómez Castro (Presidente)

Dr. Mario Pedraza Reyes (Secretario)

Dr. Héctor Manuel Mora Montes (Sinodal)

Dr. Juan Carlos Torres Guzmán (Sinodal)

Dra. Ruth Reyes Cortés (Sinodal Suplente)

Dra. Beatriz Liliana España Sánchez (Sinodal Externo)

DEDICATORIAS

A Dios por haberme permitido vivir hasta este día, haberme guiado a lo largo de mi vida, por ser mi apoyo, mi luz y mi camino. Por darme fortaleza para seguir adelante en aquellos momentos de debilidad, gracias a Él y a mis tres ángeles que están en su compañía es que hoy puedo estar aquí cerrando esta etapa de mi vida.

A mis papás por todo el apoyo brindado a lo largo de mi vida. En especial a mi mamá Yolanda Ramírez por darme la oportunidad de estudiar a pesar de carencias y dificultades, pero sobre todo por estar siempre a mi lado orgullosa festejando cada logro académico desde mis encabezados en cuadros de honor en mi infancia hasta este título de Doctora, los cuales han sido todos 100% su mérito.

A mis hermanos por estar siempre ahí a pesar de nuestras diferencias, Josué, Ricardo y Saúl saben que los quiero mucho. Blue mi favorita y única sobrina espero ser un poco de inspiración a tu corta edad para que un día estemos juntas celebrando la culminación de tus estudios también. Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos del resto de mi familia.

A mi amiga y colega la Dra. Adriana Rico lo logramos hijo cada una por su propio camino pero al final juntas en la meta, como lo dijimos un día seremos todas una doctoras y hoy se llegó esa fecha.

A mis amigos desde la preparatoria, Chepe mi incondicional durante los últimos 16 años, ya estamos viejos, cansados y devastados pero juntos y eso es lo que importa, bromeo obvio, te adoro lo sabes y pues seguimos ganando como siempre. Aranzazú Lera que sería de mi sin esos días sentada frente a la

computadora sin tenerte del otro lado amenizando la escritura y estudios de este proyecto, te amo amiga y ya sabes juntas hasta que se nos caiga el último diente.

A mis hermanos no consanguíneos Roberto y Arciniega mi flaco y gordo preferidos, Carmelita no creas que me olvido de ti te quiero amiga gracias a los tres por ser 24/7 para su Luchis.

A las personas que aparecieron en mi vida en la recta final de este proyecto, piezas claves para darme ese último impulso para cerrar por completo este ciclo. La futura Ing. Priscila Rodríguez, mi smartfriend y próxima colega científica, gracias por tu apoyo siempre y en todo. Dedicado también a otra amiga incondicional porque con su forma de ser regresó a mi esa chispa de querer comerme al mundo, porque me permitió reflejar en sus ojos a esa Luz chancitas de 24 años llena de energía, este 2018 logramos concluir cada una su ciclo académico, y próximamente concluiremos uno juntas, panzas espero sean muchos más logros que nos toque celebrar juntas, gracias por todo el apoyo brindado, por aguantarme y por siempre buscar la manera de hacerme reír pero sobre todo sonreír, por soportar mis ratos de histeria y por ser una excelente amiga, te adoro fatty girl, pase lo que pase recuerda que siempre estaremos juntas POMESA!

A todas esas personas que estuvieron pero por azares del destino ya no están hoy, donde quiera que estén les envío toda la buena vibra; sin duda formaron parte importante para que esto que hoy concluye pudiera dar el primer paso.

Gracias a todos ustedes por haber estado, por estar y/o estarán celebrando conmigo este éxito.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Felipe Padilla y al Dr. Fernando Anaya, directores de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la motivación, paciencia y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

A los miembros de mi comité por las aportaciones realizadas para el enriquecimiento del proyecto, al Dr. Héctor Mora, Dr. Julio César Villagómez, Dr. Juan Carlos Torres, Dr. Mario Pedraza, Dra. Ruth Reyes y a la Dra. Liliana España, también me gustaría agradecer los comentarios, sugerencias y aportaciones del Dr. Bernardo Franco y la Dra. Claudia Mendoza.

A mis compañeros de laboratorio especialmente a la Dra. Ángeles Serrano y a la Q.F.B Itzel Páramo porque fueron clave importante para llevar a cabo este proyecto, de igual forma a Fabe, Sayri y Janeth por los buenos momentos compartidos y las pláticas que hacían más ameno el trabajo en el laboratorio.

A mi Universidad de Guanajuato por contribuir en mi formación académica y personal a lo largo de casi dieciséis años.

Al CONACyT por otorgarme la beca económica para poder estudiar el doctorado.

A todas aquellas personas que han formado parte directa e indirecta para la culminación de este proyecto: GRACIAS.

“Un científico en su laboratorio no es solo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”

Marie Curie

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Amibiasis: epidemiología, diagnóstico y tratamiento	3
2.2. <i>Entamoeba histolytica</i>	3
2.2.1. Morfología y Biología	
2.2.2. Genoma de <i>Entamoeba histolytica</i> .	
2.2.3. Virulencia	
2.2.3.1. Factores de virulencia asociados con el hospedero.	
2.2.3.2. Factores de virulencia asociados con el parásito	
2.2.3.3. Determinantes de virulencia	
2.3. Esfingolípidos.....	10
2.3.1. Metabolismo de esfingolípidos y regulación celular	
2.3.2. Esfingomielinasas	
2.3.2.1. Clasificación de las esfingomielinasas	
2.3.2.2. Funciones de las esfingomielinasas	
2.3.2.3. Esfingomielinasas en <i>E. histolytica</i> .	
2.4. Respuesta al estrés oxidativo.....	14
2.5. Modificaciones postraduccionales	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. OBJETIVOS	19
4.1. General	
4.2. Específicos	
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1. Microorganismos utilizados	20
5.1.1 Cepas de <i>Entamoeba histolytica</i>	
5.2 Medios de cultivo.....	21
5.2.1 Medio TYI-S-33 para el cultivo de <i>E. histolytica</i> .	
5.3 Soluciones de trabajo.....	21

- 5.3.1 Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS)
- 5.3.2 Solución amortiguadora de lisis para *E. histolytica*
- 5.3.3 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10%.
- 5.3.4 Amortiguador de corrida para electroforesis.
- 5.3.5 Solución amortiguadora de transferencia para ensayos de inmunodetección.
- 5.3.6 Solución amortiguadora salina de Tris-Tween (TBS-T) para bloqueo y lavado de membranas de nitrocelulosa.
- 5.3.7 Solución amortiguadora salina PBS-T para bloqueo y lavado de membranas de nitrocelulosa.
- 5.3.8 Solución amortiguadora, para diluciones de H₂O₂, de sales de Hank (HBSS)
- 5.3.9 Soluciones de H₂O₂
- 5.4 Plásmidos y oligonucleótidos.....24
- 5.5 Métodos bioquímicos y celulares.....25
- 5.5.1 Cultivo de *E. histolytica*.
- 5.5.2 Preparación de homogenados totales de *E. histolytica* para determinar actividad de SMasa y ensayos de inmunodetección.
- 5.5.3 Preparación de fracciones celulares de *E. histolytica* para determinar actividad de SMasa y ensayos de inmunodetección.
- 5.5.4 Cultivo de células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney)
- 5.5.5 Cuantificación de proteína
- 5.5.6 Medición de actividad de nSMasa.
- 5.5.7 Inmunodetección de proteínas con etiqueta HA
- 5.5.8 Inmunodetección de nSMasas.
- 5.5.9 Inducción de estrés oxidativo con H₂O₂ en trofozoítos de *E. histolytica*.
- 5.5.10 Efecto del inhibidor de palmitoilación 2-Br palmitoilato en la localización de nSMasas.

5.5.11 Separación de proteínas fosforiladas y no fosforiladas a partir de homogenados totales de <i>E. histolytica</i> .	
5.5.12 Inmunolocalización mediante microscopia confocal de nSMasas con etiqueta HA.	
5.5.13 Actividad hemolítica de <i>E. histolytica</i>	
5.5.14 Efecto citopático	
5.5.15 Efecto citotóxico	
5.6 Métodos de biología molecular.....	31
5.6.1 Extracción y precipitación de RNA	
5.6.2 RT-PCR semicuantitativo.	
5.6.3 Lipofección de <i>E. histolytica</i>	
5.7 Análisis estadísticos y bioinformáticos.....	33
5.7.1 Análisis bioinformático de posibles sitios de fosforilación en las nSMasas.	
5.7.2 Análisis bioinformáticos de posibles sitios de palmitoilación en las nSMasas.	
5.7.3 Análisis estadísticos	
6. RESULTADOS.....	34
6.1. Cepas transfectantes de <i>E. histolytica</i> sobreexpresantes y silenciadas en los genes <i>ehnsm1</i> , <i>ehnsm2</i> y <i>ehnsm3</i>	34
6.2. Determinación de la actividad de nSMasa en cepas HM1, G3 y transfectantes.	35
6.3. Efecto del H ₂ O ₂ y choque térmico en viabilidad celular y actividad de nSMasa en cepas la cepa HM1 y EhnSM3 de <i>E. histolytica</i>	42
6.3.1. Viabilidad celular de trofozoítos estimulados con H ₂ O ₂ , y choque térmico.	
6.3.2. Actividad de nSMasa en trofozoitos estimulados con H ₂ O ₂ .	
6.3.3. Respuesta, a nivel génico, de las nSMasas de <i>E. histolytica</i> en presencia de estrés oxidativo, para las cepas HM1 y EhnSM3-HA presencia de H ₂ O ₂ .	

6.3.4.	Expresión de los genes <i>ehnsm1</i> , <i>ehnsm2</i> y <i>ehnsm3</i> posterior a la interacción con $1 \text{ H}_2\text{O}_2$.	
6.4.	Localización celular de la proteína EhnSM3.....	45
6.5.	Regulación de la actividad y localización de las nSMasas de <i>E. histolytica</i> , mediante modificaciones postraduccionales	48
6.5.1.	Fosforilación como probable mecanismo de regulación de la actividad de nSMasa.	
6.5.2.	Palmitoilación como posible mecanismo regulador de la localización de las nSMasas	
6.6.	Análisis in vitro de la participación de las nSMasas de <i>E. histolytica</i>	52
7.	DISCUSIÓN.....	56
8.	CONCLUSIONES.....	68
9.	PERSPECTIVAS.....	69
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Formas celulares de <i>E. histolytica</i>	4
Figura 2. Metabolismo de esfingolípidos y su papel en procesos biológicos.....	11
Figura 3. Inmunodetección de las nSMasas etiquetadas en las cepas sobreexpresantes de <i>E. histolytica</i>	36
Figura 4. Niveles de expresión de los genes <i>ehnsm1</i> , <i>ehnsm2</i> y <i>ehnsm3</i> en los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> de las cepas silenciadas G3-GS EhnSM1 y G3-GS EhnSM2-3.....	37
Figura 5. Actividad de nSMasa de <i>E. histolytica</i> (HM1) y <i>B. cereus</i>	38
Figura 6. Efecto de la concentración de sustrato, del tiempo de incubación y del manganeso en la actividad de nSMasa en homogenados totales de <i>E. histolytica</i> (HM1).....	39
Figura 7. Actividad de nSMasa en fracciones celulares de <i>E. histolytica</i>	40
Figura 8. Determinación de actividad de nSMasa en cepas sobreexpresantes y silenciadas en los genes que codifican para nSMasas de <i>E. histolytica</i>	41
Figura 9. Viabilidad celular de las cepas HM1-HA y EhnSM3-HA en respuesta a inductores de estrés oxidativo.....	43
Figura 10. Actividad de SMasa neutra de las cepas HM1-HA y EhnSM3-HA de <i>E. histolytica</i> en respuesta a peróxido de hidrógeno.....	44
Figura 11. Efecto del peróxido de hidrógeno en la expresión de los genes <i>ehnsm1</i> , <i>ehnsm2</i> y <i>ehnsm3</i>	46
Figura 12. Inmunodetección en homogenados totales y fracciones celulares de nSMasas de <i>E. histolytica</i> de cepas sobreexpresantes.....	47
Figura 13. Inmunolocalización de la proteína EhSM3-HA.....	48
Figura 14. Inmunodetección de nSMasas fosforiladas en las cepas sobreexpresantes y la cepa HM1 de <i>E. histolytica</i>	50

Figura 15. Estructura predicha para la EhnSM1, relacionado con sitios potenciales de palmitoilación.....**51**

Figura 16. Efecto del 2-Br palmitoilato en la localización de nSMasas de las cepas sobreexpresantes de *E. histolytica*..... **52**

Figura 17. Actividades biológicas de cepas sobreexpresantes y silenciadas en los genes que codifican para nSMasas de *E. histolytica*.....**55**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de *E. histolytica* utilizadas en este estudio.....**20**

Tabla 2. Plásmidos utilizados para el silenciamiento y sobreexpresión de los genes que codifican para las proteínas EhnSM1, EhnSM2 y EhnSM3.....**24**

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen de las proteínas EhnSM1, EhnSM2 y EhnSM3, y de los genes control utilizados en el presente estudio.....**25**

Tabla 4. Análisis bioinformático de posibles sitios de fosforilación en las nSMasas.....**49**

RESUMEN

La virulencia de *Entamoeba histolytica* es un proceso multifactorial, en el que están involucrados factores tanto del hospedero como de la amiba. Entre los factores del parásito se encuentran los amebaporos, las cisteín proteasas y la lectina; sin embargo, no se descarta la participación de otras moléculas. Algunas de estas moléculas candidatas son las esfingomielinasas (SMasas), enzimas que catalizan la hidrólisis de esfingomielina (SM) produciendo ceramida, la cual está involucrada en diferentes procesos celulares como proliferación celular, apoptosis y lisis celular. En el grupo de trabajo se ha reportado que el genoma de *E. histolytica* posee tres genes que codifican para SMasas neutras, los cuales se expresan y producen proteínas con actividad enzimática. El objetivo del presente es el análisis funcional de las SMasas neutras, para lo cual se obtuvieron trofozoítos transfectantes para silenciar o sobreexpresar los genes que codifican para dichas enzimas. Se encontró que la actividad de SMasa neutra disminuye con el silenciamiento de los genes y aumenta con su sobreexpresión, lo que permitió evaluar su participación en la virulencia del parásito. La nSMasa3 está asociada con la muerte y lisis celular, mientras que la nSMasa1 y nSMasa2 con la destrucción de monocapas celulares. Mediante ensayos de inmunodetección y microscopía confocal se encontró que estas proteínas están asociadas principalmente a la membrana plasmática, lo que sugiere que el efecto citotóxico y citolítico es dependiente de contacto. La actividad de nSMasa aumentó en amibas expuestas a H₂O₂ o choque térmico, sin embargo, las cepas sobre-expresantes no mostraron cambios en su actividad. Esta es la primera vez que se demuestra la participación de las nSMasas en la virulencia de *E. histolytica*, principalmente de la EhnSM3.

1. Introducción

1.1. Amibiasis: epidemiología, diagnóstico y tratamiento

Entamoeba histolytica es el agente causal de la amebiasis humana. Entre las manifestaciones clínicas de esta patología se incluyen diarrea, disentería y absceso hepático. Aproximadamente 50 millones de personas se ven afectadas por este parásito causando cerca de 100 000 muertes anualmente (World Health Organization, 1997). Recientemente, se ha estimado que el número de muertes es de 55,500 cada año (Turkeltaub et al., 2015). La incidencia de esta infección se encuentra estrechamente relacionada al hacinamiento y la pobreza, las cuales contribuyen a condiciones sanitarias inadecuadas, favoreciendo la transmisión directa fecal-oral de amibas de una persona a otra. En nuestro país la amibiasis intestinal se encuentra entre las veinte principales causas de enfermedad Nacional, las poblaciones más afectadas son al sur del país (Chiapas y Oaxaca, con incidencias superiores a 17 000 casos reportados en 2016), mientras que los niveles más bajos se registran en el norte del país (Baja California y Baja California Sur con un promedio de 1500 reportes en el mismo año (Dirección General de Epidemiología, 2016).

La infección inicia con la ingestión de quistes de *E. histolytica* a partir de alimentos contaminados con materia fecal. El parásito se desenquista en la porción terminal del intestino delgado produciendo trofozoítos que pasan al intestino grueso y logran adherirse a las mucinas del colon y de ese modo colonizan el intestino grueso, facilitando en algunos casos su migración a otros órganos (Haque, R. et al., 2003). El período de incubación es de 1 a 6 semanas después de la exposición inicial y es más corto en infecciones severas. Desde el punto de vista clínico la infección con *E. histolytica* puede ser asintomática o puede causar disentería o enfermedad extraintestinal (colitis necrosante aguda, apendicitis amibiana, megacolon tóxico, ameboma del colon y ulceración perianal con potencial formación de una fístula (Sepúlveda and Treviño-García Manzo, 1986; Martínez-Palomo, 1990; Haque, R. et al., 2003).

El diagnóstico de la infección se realiza mediante la observación de muestras fecales al microscopio; sin embargo, debido a la existencia de especies de *Entamoeba* no patógenas que son morfológicamente indistinguibles de las patógenas, esta tarea resulta complicada. Por esta razón se ha hecho uso de métodos serológicos como el ELISA, y en la última década se han aplicado experimentalmente procedimientos basados en la biología molecular que permiten distinguir de una manera más precisa las diferentes especies de *Entamoeba*. La técnica de amplificación de DNA por PCR es la más usada en laboratorios de investigación por su alta sensibilidad y especificidad (Tanyuksel et al., 2003; Nair et al., 2015), basadas en la amplificación de secuencias específicas del gen que codifica para el rRNA de la subunidad 18S (Katzwinkel-Wladarsch et al., 1994). Sin embargo, el análisis de rutina en los laboratorios clínicos de nuestro país sigue estando basado en la microscopía.

Los medicamentos empleados para el tratamiento de la amibiasis se dividen en lumbinales, como el yodoquinol y el teclozán, tisulares, como secnidazol y ornidazol y mixtos como el metronidazol (Gómez et al., 2007). El tratamiento de la infección varía de acuerdo al tipo de infección, si es invasiva o no invasiva. La terapia para la infecciones no invasivas puede ser tratado con paromomicina, mientras que los nitroimidazoles, particularmente el metronidazol, son el pilar de la terapia para amebiasis invasiva (Haque, R. et al., 2003). En la última década se ha utilizado clínicamente a la nitazoxanida, un nuevo fármaco de amplio espectro (Adagu et al., 2002; Cedillo-Rivera et al., 2002). En los últimos años se ha implementado el uso terapéutico de dicho compuesto que tiene acción en contra de protozoarios, helmintos y bacterias (Rossignol et al., 2001; Bobak, 2006).

1.2. *Entamoeba histolytica*

1.2.1. Morfología y Biología

E. histolytica pertenece a la superclase de protozoarios formadores de pseudópodos *Rhizopoda* en el subfilum *Sarcodina*. Este protozoario es capaz de penetrar la mucosa intestinal y distribuirse a través del sistema sanguíneo a otros

órganos, dando lugar a lesiones extraintestinales, principalmente abscesos hepáticos (Martínez-Palomo and Espinosa Cantellano, 1998). Posee dos estadios morfológicos: el trofozoíto, que representa la forma vegetativa y el quiste que es la forma de resistencia. El quiste (**Figura 1B**), mide de 10 a 16 μm de diámetro, presenta cuatro núcleos, el cariosoma es pequeño, compacto y usualmente con localización central, y en el citoplasma pueden presentarse cuerpos cromatoides alargados. Los quistes pueden sobrevivir durante semanas en el suelo o en el agua, que son las principales fuentes de infección. Cuando los quistes llegan al intestino, comienza la división citoplásmica y nuclear, para dar como resultado la generación de trofozoítos (Diamond and Clark, 1993). El trofozoíto, la forma móvil del parásito (**Figura 1A**), puede residir en el intestino del humano y, ocasionalmente, invadir la mucosa intestinal, penetrándola e invadiéndola. Tienen un diámetro de 15 a 20 μm y es activamente móvil debido a sus pseudópodos, su núcleo presenta un cariosoma central pequeño y compacto, cromatina periférica con gránulos uniformes, su citoplasma es fino y granular. Los trofozoítos tienen la capacidad de colonizar la mucosa intestinal (González-Vázquez et al., 2012).

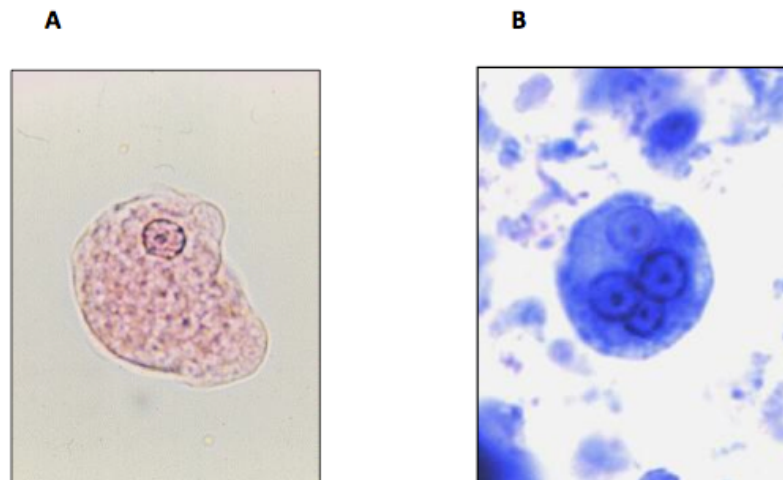


Figura 1. Formas celulares de *E. histolytica*. A. Trofozoíto teñido con MIF, observado con microscopia de campo claro. (Figura proporcionada por Dr. Anaya Velázquez); B. Quiste teñido con hematoxilina de Mayer, microscopia de luz. (<http://www.k-state.edu/parasitology/546tutorials/ProtQuery39>).

El ciclo de vida del parásito comienza por la ingesta de quistes los cuales se encuentran en alimentos y agua contaminados con heces. La pared de los quistes es disuelta en el tracto gastrointestinal superior y el parásito se desenquista en la porción terminal el íleon, liberando un trofozoíto cuadrinucleado el cual se multiplica por fisión binaria. Los trofozoítos viven en el lumen del intestino grueso en interacción con componentes de la microbiota intestinal residente. Después de algunos ciclos de división, algunos de los trofozoítos se diferencian a quistes y son excretados en la materia fecal (Martínez-Palomo, 1982).

1.2.2. Genoma de *Entamoeba histolytica*

E. histolytica posee un cariotipo complejo, en metafase se han descrito de 30 a 50 cromosomas, cuyo tamaño varía entre los diferentes aislados, lo cual se ha sugerido que se debe a cambios en los números de genes para tRNA repetidos en tándem. Es un organismo poliploide (4N o más) (Petri Jr, 2002) con un contenido de G-C del 24.2% en su material genético, 28% en regiones codificantes y sólo 16% en la tercera posición de los codones, lo que indica su uso preferencial (Loftus et al., 2005). El contenido de DNA total es de 0.5 pg por célula, concentrado en el núcleo (Martínez-Palomo and Espinosa Cantellano, 1998), aunque se reportó la presencia de DNA citoplasmático en una estructura denominada EhkO (Orozco et al., 1997). El tamaño del genoma haploide es menor a 20 Mb. Posee DNA circular extracromosomal, en el que está contenido rDNA además de otros genes cuya función es desconocida. A diferencia de otros eucariotas unicelulares, el rDNA está contenido exclusivamente en las moléculas de DNA extracromosomal (Martínez-Palomo and Espinosa Cantellano, 1998). La secuencia del genoma completo, predice 8,201 genes con un tamaño promedio de 1.17 Kb que comprenden el 49% del genoma (Loftus et al., 2005; Lorenzi et al., 2010). Los intrones se encuentran en el 24.4% de los genes y en promedio miden 74.1 pb (Lorenzi et al., 2010). Los RNA mensajeros contienen regiones que no se traducen (UTRs), que suelen ser de 5 a 21 bases y de 14 a 61 bases en las regiones 5' y 3', respectivamente. Al realizar el análisis de los genes de este

organismo, se encontró que el 31.8% de las proteínas codificadas no tenía homólogos en las bases de datos. También, algunos de ellos, correspondientes a enzimas metabólicas, tienen su origen más probable en una transferencia lateral de genes bacterianos (Loftus et al., 2005).

1.2.3. Virulencia

La patogénesis de la amibiasis está relacionada con la virulencia de *E. histolytica*, la cual es un proceso multifactorial que involucra componentes del parásito y del huésped. Existen moléculas denominadas factores de virulencia del parásito que tienen una participación directa en la capacidad lítica e invasiva de *E. histolytica*, mientras que otras pudieran estar involucradas en el crecimiento y sobrevivencia de las amibas en el hospedero, los cuales se han llamado determinantes de virulencia (Padilla-Vaca and Anaya-Velázquez, 2010).

1.2.3.1. Factores de virulencia asociados con el hospedero

Sistema inmune. Se ha observado una mayor susceptibilidad a desarrollar esta infección en individuos inmunocomprometidos, lo que sugiere un vínculo entre la respuesta inmune del hospedero y la expresión de la virulencia del parásito. (Guo et al., 2009). Bajo estas condiciones, la amiba puede evadir los mecanismos de defensa del hospedero e invadir células blanco (Gandhi et al., 1986; Marie and Petri, 2014). Así mismo, la condición fisiológica general del hospedero podría ser importante, ya que en estados de malnutrición y durante embarazo se ha mostrado un incremento en la posibilidad del establecimiento de la amibiasis invasiva (Mirelman, 1988; Verkerke et al., 2012).

Mucinas. La barrera de mucina, formada predominantemente por glicoproteínas mucilaginosas (Cone, 2009), es la primera capa de defensa que bloquea la adherencia a los trofozoítos y la citotoxicidad sobre el epitelio intestinal (Marie and Petri, 2014). Por otro lado, uno de los papeles más importantes de las proteínas mucilaginosas pudiera ser la regulación del enquistamiento, ya que en *E. invadens*, las mucinas inducen a los trofozoítos a transformarse en quistes (Eichinger, 2001).

Microbiota. La microbiota del tracto gastrointestinal constituye un ecosistema complejo. Se sabe que la virulencia relativa de diferentes cepas de *E. histolytica* varía a consecuencia de cambios en las condiciones de su cultivo *in vitro* (Diamond, 1983), así mismo, se ha demostrado que la asociación de cultivos axénicos de trofozoítos de *E. histolytica* con ciertos tipos de bacterias incrementan su virulencia *in vivo* (Rosenbaum and Wittner, 1970; Anaya-Velázquez et al., 1985) e *in vitro* (Bracha and Mirelman, 1984; Anaya-Velazquez and Padilla-Vaca, 1992). *E. histolytica* vive en el intestino grueso en contacto con la microbiota residente, la cual se ha sugerido que puede modular la expresión patogénica del parásito (Mirelman, 1988; Shah et al., 2005; Variyam, 2007) o alterar la microbiota del huésped (Marie and Petri, 2014). La asociación de amibas con bacterias específicas puede modular la virulencia amibiana y la expresión de genes (Padilla-Vaca et al., 1999).

Se ha demostrado que existe una expresión diferencial de genes que codifican para enzimas metabólicas, proteínas ribosomales, factores de virulencia, citoesqueleto y tráfico vesicular, relacionada con la interacción amiba-bacteria (Mendoza-Macías et al., 2009).

1.2.3.2. Factores de virulencia asociados con el parásito

Lectina Gal/GaINAc. La adhesión del parásito a la mucina, células epiteliales y a bacterias, ocurre principalmente a través de una lectina que une residuos de galactosa y N-acetilgalactosamina, presentes en las glicoproteínas de las células blanco y que es muy abundante en la superficie del trofozoíto (Frederick and Petri, 2005). Además de las funciones en adhesión, se ha sugerido que esta lectina participa en la evasión del parásito a la lisis por el complejo de ataque a membrana del complemento (Braga et al., 1992). Así mismo, se ha considerado que está involucrada en el señalamiento intracelular durante el evento citolítico, a través del dominio citoplasmático de la subunidad pesada (Vines et al., 1998). Esta proteína polimérica también participa en señales de transducción y en la

evasión del sistema del complemento del huésped (Laughlin and Temesvari, 2005).

Amebaporo. El amebaporo de *E. histolytica* es un péptido formador de canales compuesto por 77 aminoácidos (Leippe et al., 1994; Bracha et al., 2002). Existen tres isoformas principales denominadas amebaporo A, B y C, las cuales están presentes en una relación 35:10:1, respectivamente, siendo el amebaporo C el más efectivo, mientras que el amebaporo A no es tan eficiente en la lisis de eritrocitos *in vitro* (Leippe et al., 1992).

Cisteín proteasas. Son las proteasas más abundantes a las que se les ha implicado en la patogenicidad de los trofozoítos de *E. histolytica* (Keene et al., 1990). Están presentes en el citoplasma de la célula y enriquecidas en las membranas internas (Lushbaugh et al., 1985; Luaces and Barrett, 1988). Participan en la destrucción de tejidos, degradación de componentes de la matrix extracelular, fibronectina, laminina y colágeno, así como en la disrupción de uniones celulares, que facilitan la invasión del parásito (Espinosa-Cantellano and Martínez-Palomo, 2000; Padilla-Vaca and Anaya-Velázquez, 2010).

Con respecto a la presencia de otras actividades proteolíticas en las amibas, se ha reportado una nueva serín proteasa homóloga a los elementos representativos de la familia S28 del clan SC capaz de generar péptidos activos, la cual podría participar en el proceso patogénico de *E. histolytica* (Barrios-Ceballos et al., 2005)

1.2.3.3. Determinantes de virulencia

Como se mencionó anteriormente, el ambiente intestinal constituye un factor importante para el desarrollo de la patogenicidad del parásito. Dentro de este entorno existen bajos niveles de oxígeno, sin embargo, durante la invasión de los tejidos, los trofozoítos se exponen a un ambiente cada vez más oxigenado. La amiba contiene enzimas fermentativas que reducen el oxígeno a peróxido de hidrógeno sin la ganancia o pérdida neta de energía. Estas enzimas de

fermentación incluyen la piruvato: ferredoxina oxidorreductasa (POF) (Vayssie et al., 2004) y la ferredoxina (Snow et al., 2008; Lotter et al., 2006; Moran et al., 2002). Se ha propuesto la participación de estas moléculas y otras como lipofosfoglicanos, fosfolipasas y esfingomielininasas en el proceso patogénico de *E. histolytica*. Todas estas moléculas han sido propuestas como participantes en la protección del parásito durante el proceso de invasión del huésped. Sin embargo, no se sabe si están directamente relacionadas con el proceso de patogenicidad, por lo que es necesario profundizar más en su estudio para definirlos como factores o determinantes de virulencia. (Padilla-Vaca and Anaya-Velázquez, 2010).

Durante la infección el patógeno necesita adaptarse a la respuesta y entorno específicos de los diferentes tejidos, por ejemplo, citoquinas, ROS y retos mecánicos, tales como cruzar barreras biológicas. La microbiota, la disponibilidad de oxígeno, la glucosa y el hierro representan importantes parámetros que afectan el proceso de infección intestinal de *E. histolytica*. La finalidad del parásito es sobrevivir durante la infección, esencialmente al responder rápidamente a los cambios en el microambiente dentro del intestino, la sangre y el hígado, activando un programa de expresión de diversos genes en respuesta al estrés oxidativo, generado por la respuesta inflamatoria del hospedero y los factores del sistema inmunológico (Faust and Guillen, 2012).

2.3 Esfingolípidos

2.3.1 Metabolismo de esfingolípidos y su papel en procesos biológicos

Los esfingolípidos son los lípidos de membrana que incluyen en su estructura las denominadas bases esfingoides, conocidas también como bases de cadena larga o esfingosinas (Pruett et al., 2008). El grupo de los esfingolípidos se encuentran distribuidas esencialmente en todos los animales, plantas, en algunos organismos procariotes y en virus, como componentes de membranas, lipoproteínas y otras estructuras biológicas importantes, además de sus importantes funciones estructurales en las células eucarióticas (Futerman and Hannun, 2004). Participan

en la transducción de señales por medio de la formación de estructuras membranales denominadas balsas lipídicas (rafts) (Degroote et al., 2004; Dickson et al., 2006), y en el transporte intracelular de membranas. Regulan procesos de muerte y proliferación celular, diferenciación, envejecimiento, inflamación y transformación (Zheng et al., 2006; Zeidan and Hannun, 2007).

2.3.2 Esfingomielinasas

Las esfingomielinasas (SMasas), son enzimas importantes en el metabolismo de lípidos y son la principal vía de producción de ceramida, un lípido bioactivo involucrado en diversos procesos celulares (Ogretmen and Hannun, 2004; Hannun and Obeid, 2011). La ceramida es el centro del metabolismo de los esfingolípidos y se puede sintetizar mediante tres vías principalmente, biosíntesis *de novo* a partir de serina y palmitoil CoA, mediante la hidrólisis de la esfingomielina o mediante la vía de reciclaje o de salvamento de la esfingosina libre (Patwardhan et al., 2016). Se ha descrito que la ceramida puede participar en proliferación celular, apoptosis, envejecimiento celular y respuesta a estrés en células de mamíferos, y podría estar involucrada en el enquistamiento, ciclo celular y virulencia de algunos parásitos (Hannun and Obeid, 2008).

2.3.2.1 Clasificación de las esfingomielinasas

Las esfingomielinasas se clasifican en función de su pH óptimo de actividad, por lo que pueden ser ácidas, neutras y alcalinas (Hannun and Obeid, 2008).

Las SMasas ácidas (aSMasas) son enzimas capaces de hidrolizar esfingomielina, con un pH óptimo de actividad de alrededor de 5. La ausencia de esta enzima en humanos es la responsable del desorden neurológico conocido como síndrome de Niemann-Pick, siendo la mejor caracterizada de estas enzimas. En mamíferos, las aSMasas se presentan en dos formas, una lisosomal y otra secretada, ambas codificadas por el mismo gen, y se ha descrito que la primera no es dependiente de Zn^{2+} , mientras que la última es activada por concentraciones fisiológicas del mismo ion (Marchesini and Hannun, 2004; Jenkins et al., 2009).

Las SMasas de tipo neutro (nSMasas), presentan un pH óptimo de actividad cercano a 7, y se han descrito en mamíferos, tanto dependientes de Mg^{2+} o Mn^{2+} cuya localización es membranal, así como enzimas no dependientes de Mg^{2+} localizadas en el citosol. Las primeras han sido involucradas en la transducción de señales mediada por ceramida en respuesta a citocinas y estrés oxidativo, asociando estas actividades con interrupción del crecimiento y apoptosis (Marchesini and Hannun, 2004; Hannun and Obeid, 2008; Shamseddine et al., 2015).

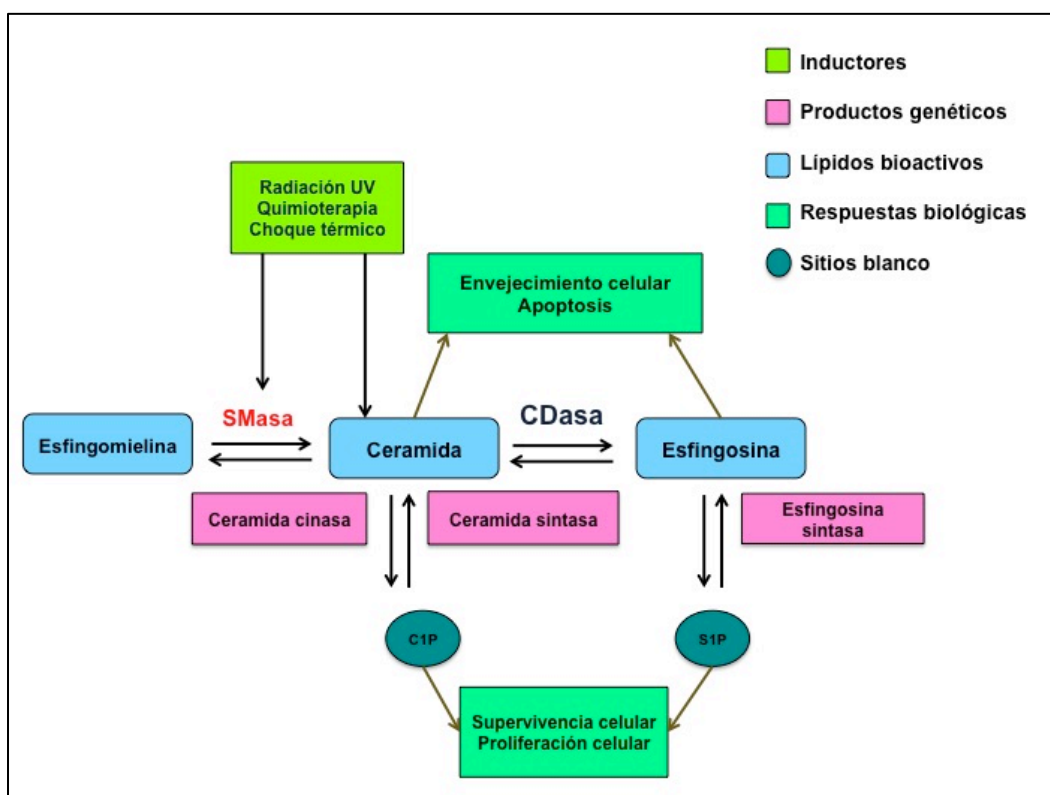


Figura 2. Metabolismo de esfingolípidos y su papel en procesos biológicos. La vía de señalización esfingolípida se compone de esfingomielina, ceramida, y esfingosina, que se interconvierten mediante enzimas metabólicas o por diversos estímulos. Estos metabolitos interactúan con fosfatasas, cinasas, proteínas G acopladas a receptores, entre otras, las cuales desencadenan cascadas que culminan en respuestas celulares específicas. Esfingosina-1-fosfato (S1P), ceramida-1-fosfato (C1P), esfingomielinasa (SMasa), ceramidasa (CDasa). Adaptado de (Hannun and Obeid, 2008; Chan et al., 2017).

Las nSMasas se activan por las citocinas TNF-alfa e interleucina (IL)-1. Se han visto inducidas durante el envejecimiento en hepatocitos de ratón y se ha determinado que pueden modular al menos en parte los efectos de TNF-alfa en la migración y adhesión celular. Los mecanismos involucrados en la activación de las nSMasas no se han definido aún, pero se ha visto que el TNF-alfa induce la translocación de la enzima a la membrana plasmática en un mecanismo dependiente de MAPK (Clarke et al., 2007, 2011). En bacterias se han descrito como enzimas relacionadas con procesos de virulencia (Oda et al., 2012; Doll et al., 2013; Flores-Díaz et al., 2016).

Las SMasas de tipo alcalino son las menos estudiadas, y a diferencia de las nSMasas y aSMasas se distribuyen exclusivamente en la mucosa intestinal, requiriendo sales biliares para su actividad. Se sugiere que puedan llevar a cabo un papel fisiológico en la digestión de la SM en la dieta, además se ha reportado un posible papel en la protección contra la inflamación y la tumorigénesis del colon (Marchesini and Hannun, 2004; Wu et al., 2006).

2.3.2.2 Funciones de las esfingomielinasas

Se ha reportado actividad de esfingomielinasa en bacterias como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Helicobacter*, *Chlamydia*, *Pseudomonas* y *Leptospira*, en estos microorganismos se ha visto que las nSMasas actúan como factores de virulencia (Oda et al., 2012; Doll et al., 2013; Flores-Díaz et al., 2016). Sin embargo, poco se conoce acerca de la función de SMasas en parásitos. *Leishmania major* posee un gen que codifica para una nSMasa que comparte varias regiones estructurales con las nSMasas de mamíferos, entre ellas algunas esenciales para la catálisis tales como los sitios de unión a Mg^{2+} y posibles regiones intramembranales en el extremo C-terminal. A pesar de que *L. major* no sintetiza esfingomielina, posee actividad de SMasa neutra que es necesaria para la proliferación del parásito y su patogénesis (Zhang et al., 2009). De manera similar, existe un gen de nSMasa en *Trypanosoma brucei*, el cual comparte similitudes en su secuencia con otros organismos, la inhibición de la expresión de este gen interviene de manera negativa en la ruta de síntesis de las glicoproteínas

variables de superficie (VSG), las cuales constituyen un mecanismo de protección del parásito y afectan el tráfico de las vías endocítica y secretora de *T. brucei* (Young and Smith, 2010; Fernandes et al., 2011; Walker et al., 2013).

Giardia lamblia, sintetiza SMasas codificadas por los genes *gsmaseB* y *gsmase3b* durante su enquistamiento para hidrolizar esfingomielina y generar ceramida adicional, la cual no es sintetizada *de novo* por el parásito (Hernandez et al., 2008; Mendez et al., 2015). *Plasmodium falciparum* es el parásito intraeritrocitario responsable de la malaria y posee actividad de nSMasa asociada a la membrana, la cual es dependiente de Mg^{2+} y fosfolípidos aniónicos (Hanada et al., 2000). Se ha sugerido que la ceramida en este parásito participa en la modulación de la progresión del ciclo celular (Hanada et al., 2002), posiblemente relacionado con la participación de fosfolipasas durante la etapa de merozoíto (Burda et al., 2015).

T. vaginalis posee actividad de SMasa, asociada principalmente a la fracción membranal, esta actividad aumenta con respecto al tiempo y presenta dos picos de actividad a pH 5.5 y 7.5. La adición de Mn^{2+} a la mezcla de reacción aumenta 1.97 veces su actividad basal (González-Salazar et al., 2013).

2.3.2.3 Esfingomielinasas en *E. histolytica*

En *E. histolytica* los fosfolípidos representan el 60-70% del total de lípidos (Sawyer et al., 1967), a pesar de ser incapaz de sintetizar ácidos grasos, conserva la capacidad de sintetizar una variedad de fosfolípidos (Loftus et al., 2005). El genoma de *E. histolytica* ha revelado genes relacionados con el metabolismo de fosfolípidos (Loftus et al., 2005) y está reportado que las amibas sintetizan esfingolípidos como esfingomielina, ceramida-inositol fosfato y ceramida etanolamida fosfato (Aley, Scott, and Cohn, 1980; McLaughlin and Aley, 1985). *E. invadens* es un parásito relacionado con *E. histolytica* que ha sido ampliamente estudiado como modelo para el enquistamiento amibiano y posee varios metabolitos intermediarios de la síntesis de esfingomielina que son importantes para la proliferación celular (Carbon et al., 2009). *E. histolytica* presenta en su

membrana estructuras ricas en esfingomielina, llamadas balsas lipídicas, que están asociadas con la adhesión a células blanco y pinocitosis (Laughlin and Temesvari, 2005; Mittal et al., 2008).

En *E. histolytica* se ha reportado la expresión diferencial de un gen (EHI_067710) que codifica para una SMasa neutra en respuesta a choque térmico (MacFarlane et al., 2005). *E. dispar*, la amiba no patógena, así como *E. histolytica* Rhaman, la cepa avirulenta, muestran una disminución en la expresión de este mismo gen (MacFarlane and Singh, 2006). En el grupo de trabajo se describió que *E. histolytica* posee 3 genes para SMasas neutras y 6 para SMasas ácidas, los cuales se expresan en condiciones basales. Una de las SMasas neutras de *E. histolytica* ya ha sido parcialmente caracterizada (Mendoza-Macías et al., 2010).

Se detectó actividad de SMasa en fracciones celulares de *E. histolytica* (Mendoza-Macías et al., 2010; Vargas-Villarreal et al., 2010). Además, se encontró que las proteínas recombinantes neutras presentan actividad de SMasa, la cual es estimulada por Mn^{2+} e inhibida por Zn^{2+} (Mendoza-Macías et al., 2010; González Ríos, 2011). El silenciamiento epigenético de los genes *ehsm1*, *ehsm2* y *ehsm3* en *E. histolytica*, resulta en la disminución o desaparición del transcrito y de las proteínas correspondientes, el resultado de este silenciamiento total o parcial de los genes que codifican para nSMasas en *E. histolytica*, afecta su regulación de ROS y la viabilidad celular de manera diferencial (Mendoza-Macías et al., 2010; Mendoza Macías, 2010).

Dentro del grupo de trabajo se reporta que los trofozoítos de *E. histolytica* secretan espontáneamente SMasa ácida, la cual es inhibida por el Co^{2+} y estimulada por Mg^{2+} , así como por agentes perturbadores de la membrana plasmática como la estreptolisina y la saponina, y por agentes inductores de estrés oxidativo como peróxido de hidrógeno o el choque térmico (Ramírez-Montiel, 2015).

2.4 Respuesta al estrés oxidativo

En células de mamífero, diversos estímulos por estrés, como peróxido de hidrógeno, luz ultravioleta, radiación ionizante, choque térmico, unión de

receptores para muerte celular y agentes quimioterapéuticos (como platino, paclitaxel e inhibidores de la deacetilasa de histonas) activan a las SMasas, involucrando a estas enzimas en la transducción de señales vía ceramida (Zeidan et al., 2008). Aunque el mecanismo involucrado en la activación de las SMasas está pobremente definido, se ha reportado que responden a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Castillo et al., 2007) y a la activación por PKC δ , la cual está implicada en la mediación de efectos de luz UV (Zeidan and Hannun, 2007). La expresión de la nSMasa-2 de ratón en *E. coli* demostró que esta enzima es sensible a reacciones oxido-reducción y es principalmente activada durante estrés oxidativo (Dotson et al., 2015).

Algunos de los inductores de estrés relacionados con las esfingomielinasas que se han descrito en la literatura son el tetracloruro de carbono (Ichi et al., 2009), óxido nítrico (Törnquist et al., 1999), peróxido de hidrógeno (Dotson et al., 2015), choque térmico (Yabu et al., 2015) y radiación ultravioleta (Jaffrezou et al., 2001; Magnoni et al., 2002).

Peróxido de hidrógeno. El H₂O₂ es una molécula que puede difundirse por las membranas. Su peligrosidad radica en su capacidad de formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como los radicales hidroxilo y superóxido. El peróxido de hidrógeno y sus productos, poseen una capacidad significativa para el daño celular asociados con diferentes procesos biológicos.(Goldkorn et al., 1998; Halliwell and Gutteridge, 2006, 1984), sin embargo la célula ha desarrollado sistemas de eliminación de esta molécula, siendo la catalasa y la glutatión peroxidasa los exponentes más eficaces (Hassan and Fridovich, 1979).

En células de mamífero, se ha reportado la relación entre apoptosis y la activación de nSMasa por acción del H₂O₂, mediante la generación de ceramida por hidrólisis de la esfingomielina (Goldkorn et al., 1998; Jana and Pahan, 2007, 2004). En *E. histolytica* se ha reportado que el estrés oxidativo generado por H₂O₂, también puede desencadenar la apoptosis en las cepas 200:NIH y HM1:IMSS (Ghosh et al., 2010).

Radiación UV. La radiación UV causa diferentes efectos biológicos en diversos tipos celulares, los efectos de la radiación sobre las células dependen principalmente de dos parámetros, la dosis y la longitud de onda.

Las células de mamífero responden a la irradiación UV mediante la activación de una compleja red que implica la estimulación de las serin-treonin y tirosin cinasas, implicados en el crecimiento celular y la apoptosis. Esta vía está regulada bajo dos tipos principales de mediadores: especies reactivas de oxígeno y mensajeros lípidicos, incluyendo diacilglicerol, ácido araquidónico, ácido fosfatídico, y ceramida (Schieven et al., 1993; Eller et al., 1996; Komatsu et al., 2001) .

Existen reportes que muestran la activación y relocalización de una SMasa ácida, en respuesta a la radiación de luz UV-C, hacia la cara exterior de la membrana, permitiendo de esta manera una mayor generación de ceramida desencadenando procesos apoptóticos, respuesta no observada con radiación UV-A. (Grether-Beck et al., 2000).

Choque térmico. Las células crecen de manera óptima dentro de un intervalo de temperatura relativamente estrecho, sin embargo pueden tolerar desviaciones moderadas, algunos de los cuales inciden en la estructura y función de la célula, a través de rápidas adaptaciones fisiológicas (Verghese et al., 2012), empleadas como mecanismos de adaptación celular para proteger a las células contra el estrés ambiental y fisiológico (Kalmar and Greensmith, 2009), bajo la regulación principal de proteínas de la familia de las MAP cinasas, JNK, ERK y p38 (Kim et al., 2007).

Existen reportes que muestran la relación de este mecanismo regulador con la activación de esfingomielinasas, en células HL-60, los niveles de ceramida son incrementados mediante la activación de una nSMasa en respuesta a choque térmico (Kondo et al., 2000), de igual forma se ha reportado una proteína de choque térmico (Hsp60) como regulador de la actividad de la nSMasa2 de cerebro de bovino (Ahn et al., 2013).

En *E. histolytica* se ha reportado la expresión diferencial de un gen (EHI_067710) que codifica para una SMasa neutra en respuesta a choque térmico (MacFarlane et al., 2005), cuya expresión se ve disminuida en *E. dispar*, la amiba no patógena, así como en *E. histolytica* Rhaman, la cepa avirulenta, (Macfarlane and Singh, 2006).

2.5 Modificaciones postraduccionales

Fosforilación. En células de mamífero se describió una ruta en cascada responsable de regular diferentes procesos celulares, la cual está regida por mecanismos de fosforilación principalmente (Hunter, 1995; Marshall, 1995; Mustelin et al., 2002). A la par de esta ruta, se describió otra denominada STAT (Traductor de señales y activador de la transcripción), el cual es un factor encargado directamente de la activación de las tirosin cinasas. Sin embargo poco se sabe acerca de estos dos mecanismos en células de eucariotes primitivos (Schemarova, 2006).

En 2010 se reportó que la nMasa2 de mamífero es una fosfoproteína, cuyo nivel de fosforilación es modulado por el estrés oxidativo (Filosto et al., 2010), por acción de una fosfatasa dependiente de calcio, fosfatasa de calcineurina (CAN), que actúa como un interruptor de encendido y apagado para la fosforilación de la nMasa2 en presencia o ausencia de estrés oxidativo. Esta nMasa posee cinco residuos de serina que se sabe son los encargados de regular su nivel de expresión de forma post-traducciona (Filosto et al., 2012).

Palmitoilación. La lipidación de proteínas, dividida en cuatro categorías principales: prenilación, glipiación, colesteroilación y acilación, son modificaciones covalentes que sufren algunas proteínas por acción de lípidos, proporcionando hidrofobicidad suficiente que permite la asociación de la proteína a membranas celulares, la modulación de interacciones proteína-proteína, estabilización de su estructura así como regulación de su actividad (Charron et al., 2009).

La palmitoilación, una subcategoría de la acilación, funciona principalmente en

proteínas de anclaje a membranas y dominios sub-membranales enriquecidas de esfingolípidos y colesterol, denominadas balsas lipídicas. Este mecanismo se ha visto relacionado también en el tráfico de proteínas de la vía secretora a la membrana plasmática, en la regulación de la actividad de proteínas así como en la modulación de la transcripción de genes de proteínas mitocondriales (Charron et al., 2009; Corvi et al., 2011). Recientemente, se ha demostrado la nSMasa2 de mamífero posee dos sitios de palmitoilación, residuos de cisteína, uno se encuentra entre los dos segmentos hidrófobos, y el segundo situado en el centro de la región catalítica de la proteína. Se ha demostrado que esta modificación postraducciona es la responsable de regular su localización en membrana (Tani and Hannun, 2007).

2. JUSTIFICACIÓN

Las esfingomielinasas son enzimas involucradas en diferentes procesos celulares relacionados con la proliferación celular, apoptosis y lisis celular. El análisis del genoma de *E. histolytica* reveló la presencia de tres genes que codifican para nSMasas neutras, los cuales se expresan y producen proteínas con actividad enzimática, la cual es estimulada por estrés oxidativo. Por lo que es de interés dilucidar la función de las esfingomielinasas en *E. histolytica* y su participación en la patobiología y metabolismo de este parásito.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Determinar la función de las esfingomielinasas neutras en *E. histolytica*

3.2. Específicos

- 3.2.1. Silenciamiento y sobreexpresión de genes que codifican para nSMasas en trofozoítos de *E. histolytica*.
- 3.2.2. Determinar la actividad de nSMasa en cepas transfectantes de *E. histolytica*, en condiciones basales y en respuesta a estímulos.
- 3.2.3. Analizar modificaciones postraduccionales de nSMasas de *E. histolytica*.
- 3.2.4. Analizar la participación de las nSMasas en la virulencia de *E. histolytica*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Microorganismos utilizados

5.1.1 Cepas de *Entamoeba histolytica*

En la tabla 1 se muestran las cepas de *E. histolytica* utilizadas en el presente trabajo para evaluar la función de las nSMasas.

Tabla 1. Cepas de *E. histolytica* utilizadas en este estudio.

Cepa	Características	Referencia
HM1:IMSS	Cepa virulenta, cultivada en condiciones axénicas.	(Diamond et al., 1978)
G3	Cepa avirulenta silenciada en el gen del amebaporo, derivada de la cepa HM1.	(Bracha et al., 2003)
HM1-HA	Cepa transfectante, que contiene el plásmido vacío phex-HA, derivada de la cepa HM1.	(Mendoza Macías, 2010; Saito-Nakano et al., 2004)
EhnSM1-HA	Cepa transfectante, que sobreexpresa la proteína EhnSM3 con etiqueta de HA en el C-terminal, derivada de la cepa HM1.	(Mendoza Macías, 2010)
EhnSM2-HA	Cepa transfectante, que sobreexpresa la proteína EhnSM2 con etiqueta de HA en el C-terminal, derivada de la cepa HM1.	(Mendoza Macías, 2010)
EhnSM3-HA	Cepa transfectante, que sobreexpresa la proteína EhnSM3 con etiqueta de HA en el C-terminal, derivada de la cepa HM1.	(Mendoza Macías, 2010)
G3-GS EhnSM1	Cepa transfectante derivada de la cepa G3. que tiene silenciado el gen <i>ehnsm1</i> .	(Mendoza Macías, 2010)
G3-GS EhnSM2-3	Cepa transfectante derivada de la cepa G3 que tiene silenciados los genes <i>ehnsm2</i> y <i>ehnsm3</i> .	(Mendoza Macías, 2010)

5.2 Medios de cultivo

5.2.1 Medio TYI-S-33 para el cultivo de *E. histolytica*

3.6% de peptona Biotriptasa (Bioxon), 1.2% dextrosa (Bioxon), 0.24% NaCl, 0.073% KH_2PO_4 , 0.073% K_2HPO_4 , 0.122% cisteína-HCl, 0.122% ácido ascórbico, 0.029% citrato férrico de amonio. Disolver todos los componentes en agua destilada y ajustar a pH de 6.8 (Diamond et al., 1978). El medio completo TYI-S-33 se obtiene adicionando suero vitaminado en relación 5:1.

- **Preparación de vitaminas:** Las vitaminas son suplementadas con 1 mL del suplemento especial de Diamond (SED) 100X por cada 100 mL. El suplemento es una mezcla de las siguientes soluciones: 4 mg de vitamina B12 en 1 mL de agua destilada, 3.3 mg de ácido- DL 6,8-tióctico en 4.5 mL de etanol absoluto y 1.66 g de Tween 80 en 4.5 mL de etanol absoluto. Las tres soluciones se mezclan para formar el SED 100X, el cual se esteriliza por filtración con un sistema Millipore y se almacena a -20°C protegido de la luz.
- **Suero Bovino Adulto:** Se utiliza suero comercial (Microlab). Con la finalidad de inactivar las proteínas el suero es descomplementado por calor, durante 30 min a 56°C . Se enfría a temperatura ambiente, se adicionan vitaminas suplementadas a razón 1:10 v/v, y se almacena a 4°C .

5.3 Soluciones de trabajo

5.3.1 Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS)

La solución PBS-A se utilizó para lavar los trofozoítos amibianos, y se preparó a partir de la disolución de 0.3981 g fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4 concentración final 15 mM), 0.7965 g de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4 concentración final 15 mM) y 5.1135 g de cloruro de sodio (NaCl concentración final 175 mM) en agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.2 y se aforó a 500 mL.

5.3.2 Solución amortiguadora de lisis para *E. histolytica*

Para la preparación de homogenados celulares de *E. histolytica*. Solución de Tris-HCl 50 mM pH 7.5, Tritón 100X al 1%, inhibidor de proteasas E64 1.4 mM (SIGMA).

5.3.3 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10%

Por cada minigel separador al 10 % mezclar 2 mL de agua bidestilada, 1 mL de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 50 μ L de SDS al 10%, 1.66 mL de acrilamida al 30%, 25 μ L de persulfato de sodio al 10% y 2.5 μ L de TEMED. Esta solución se vierte entre los dos cristales que forman el minigel. El gel concentrador se adiciona una vez que solidifica el gel separador el cual contiene 1.525 μ L de agua bidestilada, 0.625 μ L de Tris-HCl 0.5M pH 6.8, 25 μ L de SDS al 10%, 0.325 μ L de acrilamida al 30%, 12.5 μ L de persulfato de sodio al 10% y 1.25 μ L de TEMED. La electroforesis de proteínas se llevó a cabo de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1970) y la tinción se efectuó con azul de Coomassie R-250 al 0.05% en metanol al 40% y ácido acético al 10%.

5.3.4 Amortiguador de corrida para electroforesis

Se disuelven 30 g de Tris-base en 700 mL de agua destilada (concentración final de 0.25 M), se agrega poco a poco 144 g de glicina (concentración final de 1.9 M) agitando hasta disolver completamente y 10 g de SDS (concentración final 34.6mM), la solución se afora a 1 litro con agua destilada.

5.3.5 Solución amortiguadora de transferencia para ensayos de inmunodetección

Se disuelven 3.025 g de Tris base (25 mM) y 14.41 g de glicina (193 mM) en 600 mL de agua bidestilada, se adicionan 200 mL de metanol y la solución se afora a 1 litro.

5.3.6 Solución amortiguadora salina de Tris-Tween (TBS-T) para bloqueo y lavado de membranas de nitrocelulosa

Esta solución fue utilizada para preparar solución de bloqueo y lavado de membranas. Se preparó a partir de soluciones stock Tris-HCl 1M, pH 8.0 y NaCl 5M. Se requieren 50 mL de la solución Tris-HCl 1M pH 8.0 (concentración final de 50 mM) y 30 mL de NaCl (concentración final 150 mM) a los cuales se adiciona 0.5 ml de Tween-20 (concentración final de 0.05%), se agita suavemente hasta disolver el Tween-20 y se afora con agua bidestilada a un volumen final de 1 litro.

5.3.7 Solución amortiguadora salina PBS-T para bloqueo y lavado de membranas de nitrocelulosa

Se utilizó para preparar solución de bloqueo de membranas y para el lavado de las mismas. Se preparó pesando 8.766 g de Cloruro de sodio (NaCl 150 mM), 0.7962 g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) concentración final 15 mM), 1.5939 g de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) concentración final 15 mM) y 0.5 mL Tween-20 (concentración final de 0.05%), se agita suavemente hasta disolver el Tween-20 y se afora con agua bidestilada a un volumen final de 1 litro.

5.3.8 Solución amortiguadora de sales de Hank (HBSS), para diluciones de H_2O_2

La solución HBSS es necesaria prepararse *in situ* a partir de la mezcla de las siguientes soluciones stock:

Solución A: NaCl 1.343 M; KCl 52.92 mM.

Solución B: Na_2HPO_4 24.5 mM; KH_2PO_4 43.12 mM.

Solución C: CaCl_2 127.41 mM.

Solución D: MgSO_4 98.01 mM.

Solución E: NaHCO_3 415.8 mM

Obtener una mezcla homogénea, expresada en %v/v en H_2O destilada, en la siguiente proporción y en el orden indicado: 10.1% de solución A, 1.01% de cada una de las soluciones B,C y D, y finalmente 0.01% de la solución E.

Las concentraciones finales de cada compuesto son: NaCl 0.137 M; KCl 5.4 mM; Na₂HPO₄ 0.25 mM; KH₂PO₄ 0.44 mM; CaCl₂ 1.3 mM; MgSO₄ 1 mM; NaHCO₃ 4.2 mM.

5.3.9 Soluciones de H₂O₂

Se emplearon diluciones de H₂O₂ en HBSS a diferentes concentraciones (0, 100, 125, 150, 175, 200 µM) a partir de una solución comercial de H₂O₂ (Kem) estabilizada al 30% (9.97 M).

5.4 Plásmidos y oligonucleótidos

En la tabla 2 se muestran los plásmidos utilizados en este trabajo para la obtención de las cepas silenciadas y las sobreexpresantes. En la tabla 3 se describen los oligonucleótidos empleados en los ensayos de RT-PCR para determinar la expresión de los genes así como para evaluar a las transfectantes obtenidas por silenciamiento epigenético.

Tabla 2. Plásmidos utilizados para el silenciamiento y sobreexpresión de los genes que codifican para las proteínas EhnSM1, EhnSM2 y EhnSM3.

Plásmidos	Características	Referencia
pcEhnSM1-HA, pcEhnSM2-HA, pcEhnSM3-HA	Construcciones para expresar las proteínas EhnSM1, EhnSM2 y EhnSM3 con etiqueta HA en el N-terminal, en <i>E. histolytica</i> . Para generarlos se introdujo el marco de lectura del gen <i>ehnsm1</i> , <i>ehnsm2</i> y <i>ehnsm3</i> entre los sitios <i>SmaI</i> y <i>XhoI</i> del vector phex-HA cortado con las mismas enzimas.	(Mendoza Macías, 2010)
pcEhnSM1-GS, pcEhnSM2-GS	Construcciones diseñadas para silenciar los genes <i>ehnsm1</i> y <i>ehnsm2</i> de <i>E. histolytica</i> . Se obtuvieron insertando un fragmento de 400 pb correspondientes a los nucleótidos 1-400 de los genes <i>ehnsm1</i> y <i>ehnsm2</i> respectivamente, entre los sitios <i>StuI</i> y <i>SacI</i> del vector pSAP2-Gunma cortado con las mismas enzimas.	(Mendoza Macías, 2010)

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen de las proteínas EhnSM1, EhnSM2 y EhnSM3, y de los genes control utilizados en el presente estudio.

Oligonucleótido	Secuencia 5'è'3	Ubicación en el gen correspondiente	Tamaño del fragmento (pb)
SM18b-D	tcatagaaaaagcaaaacaacaag	197-220 <i>ehnsm1</i>	517
SM18-R	tttccatcgataacttactgt	714-692 <i>ehnsm1</i>	
SM2-D	gtaaggtaagtcaaatcaggaaat	499-523 <i>ehnsm2</i>	224
SM7-D	agaaatatattctgttttgacact	419-444 <i>ehnsm3</i>	304
SM27-R	tactggtgaaatgcatgattatctct	723-697 <i>ehnsm3</i>	
GAPDH-D	attaaaatatgataccgtccacaga	134-159 <i>ehgapdh</i>	417
GAPDH-R	tgagtagcagtagtagcatgaatagtt	551-521 <i>ehgapdh</i>	

5.5 Métodos bioquímicos y celulares

5.5.1 Cultivo de *E. histolytica*

Los trofozoítos axénicos de *E. histolytica* HM1:IMSS y G3 fueron cultivados a 36°C en medio TYI-S-33 en tubos de vidrio de borosilicato. Las amibas transfectantes fueron cultivadas en las mismas condiciones que las cepas parentales, pero en presencia de diferentes concentraciones de geneticina (G418) como agente selectivo en el medio de cultivo.

5.5.2 Preparación de homogenados totales de *E. histolytica* para determinar actividad de SMasa y ensayos de inmunodetección.

Obtener el paquete celular de amibas mediante enfriamiento en baño de agua-hielo y centrifugación posterior de trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento (48 h). Lavar el paquete celular con PBS-A mediante centrifugación y resuspender la pastilla a razón de 5×10^6 células/mL en amortiguador de lisis con inhibidor de proteasas, E-64 1.4 mM. Cuantificar la concentración de proteína.

5.5.3 Preparación de fracciones celulares de *E. histolytica* para determinar actividad de SMasa y ensayos de inmunodetección.

Posterior a la obtención de homogenado total anteriormente descrito, lisar en un homogenizador de vidrio con 20 golpes. Someter el lisado a 3 ciclos de

congelación/descongelación con nitrógeno líquido. Ultracentrifugar a 100,000 x g a 4 °C durante 1 h para separar las fracciones soluble y membranal. Cuantificar la concentración de proteína.

5.5.4 Cultivo de células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney)

Células epiteliales de riñón de perro (MDCK) fueron cultivadas en cajas estériles para cultivo de 25 cm² a 37°C en presencia de CO₂ al 5%, en medio D- MEM adicionado con 10% de suero fetal bovino. La monocapa de células epiteliales, se lavó con PBS estéril y se incubó a 37 °C durante 30 min con 1 mL de una solución de tripsina al 0.05% (Gibco). Se lavaron las células y se adicionó medio D-MEM suplementado con suero fetal bovino al 10%. El cultivo se suplementó con 1 U de insulina (Humulin^R L/Lilly) y 0.01 U de bencilpenicilina (Lakeside) por mL de medio de cultivo. Para los ensayos de destrucción de monocapa, el cultivo de células MDCK se llevó a cabo en una placa de 24 pozos (Nunclon), utilizando los mismos parámetros descritos anteriormente.

5.5.5 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se efectuó con el kit "DC Protein Assay"(Bio-Rad). Dicho ensayo es una modificación del método descrito por Bradford (Bradford, 1976) que permite la determinación de proteínas en presencia de algunos detergentes y/o agentes reductores.

5.5.6 Medición de actividad de nSMasa

La actividad de nSMasa en homogenados totales y fracciones celulares de amibas se determinó mediante un sistema de ensayo micela mixta, descrito por Weigmann en 1994, (Wiegmann et al., 1994) utilizando como sustrato SM marcada radioactivamente [¹⁴C] (actividad específica 0.05 Ci/mmol). Para la actividad de nSMasa, los componentes de la mezcla de reacción fueron Tris 100 mM, pH 7,5, MgCl₂ 1 mM, Triton X-100 al 0,2%, 4 mg de esfingomielina, 1,25 µCi [N-metil-14C] esfingomielina. La mezcla de reacción fue sonicada, separada en alícuotas y almacenada a -70°C hasta su uso. A partir de homogenados totales o

fracciones celulares, se cuantificaron 30 µg de proteína a los cuales, se le adicionaron 10 µL de la mezcla de reacción. La mezcla se incubó a 37 °C durante el tiempo requerido por el experimento y fue detenida adicionando una mezcla de solventes orgánicos cloroformo:metanol:agua (1:2:2 v/v/v). Se aplicó vórtex vigoroso para permitir la separación de fases, las cuales fueron separadas y se les adicionó líquido de centelleo para el recuento de la radioactividad en cada una. Se utilizaron como blancos, muestras que contenían homogenados con proteínas desnaturalizadas (homogenados incubados durante 30 minutos a 95 °C), las lecturas de estos blancos fueron restados a las muestras correspondientes. La actividad de nSMasa fue calculada y expresada como actividad específica, esto es, micromoles de esfingomielina hidrolizada por 1 mg de proteína, durante una hora.

5.5.6 Inmunodetección de proteínas con etiqueta HA

Las muestras para analizar se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa siguiendo el protocolo descrito por Towbin en 1979 (Towbin et al., 1979), con algunas modificaciones. La transferencia se realizó con amortiguador de transferencia a 225 mA durante 75 min, a 4°C. La membrana se bloqueó con solución de bloqueo (Difco™ Skim Milk al 5% en TBS-T) a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo primario “mouse anti-HA” (Molecular Probes) dilución 1:500, en solución de bloqueo durante 1 h. Después se lavó con TBS-T y se incubó con el segundo anticuerpo “goat anti-rabbit IgG Alkaline phosphatase conjugate” (Molecular Probes) a una dilución 1:3000. La membrana se reveló con sustrato conjugado para fosfatasa alcalina (Bio Rad) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

5.5.7 Inmunodetección de nSMasas

Se siguió el protocolo utilizado para la inmunodetección de proteínas con etiqueta HA, con las siguientes modificaciones: La membrana se bloqueó con solución de bloqueo (Amersham al 5% en PBS-T), anticuerpo primario “rabbit anti-nSMasa1” o

“rabbit anti-nSMasa2-3”, anticuerpo secundario chivo anti-conejo acoplado a peroxidasa (Amersham). La membrana se reveló con sustrato conjugado para peroxidasa (ECLTM Western Blotting Analysis System Amersham), de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se detectó la señal en el equipo Image Station 2000R (Kodak).

5.5.8 Inducción de estrés oxidativo con H₂O₂ en trofozoítos de *E. histolytica*

Se retiró el medio TYI-S-33 de los tubos incubados con amibas durante 24 h y se adicionó medio de cultivo sin suero (TYI-33) a 36 °C, al que previamente se le adicionó H₂O₂ (concentraciones de 0 a 2 mM). Estos tubos se incubaron a 36 °C por diferentes tiempos.

5.5.9 Ensayo de inhibición de la palmitoilación

Con la finalidad de analizar si la localización de las nSMasas se modificaba por acción del 2-Br palmitoilato, un inhibidor del mecanismo de palmitoilación, los trofozoítos en fase exponencial fueron interaccionados con concentraciones de 50 ó 100 µM de este reactivo preparado en DMSO, el cual fue utilizando como control. Se incubaron a diferentes períodos de tiempo y posteriormente se obtuvieron fracciones celulares y los resultados fueron analizados mediante ensayos de inmunodetección.

5.5.10 Separación de proteínas fosforiladas y no fosforiladas a partir de homogenados totales de *E. histolytica*

Para analizar si las nSMasas de *E. histolytica* se encontraban o no fosforiladas, se utilizó el kit para separación de proteínas fosforiladas y no fosforiladas, Pierce® Phosphoprotein Enrichment Kit (Thermo scientific), siguiendo las instrucciones de del fabricante. Brevemente, los trofozoítos en fase de crecimiento exponencial fueron lavados con HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.0. Las amibas fueron lisadas en con Lysis/Binding/Wash Buffer (proporcionado por el kit), adicionado con CHAPS 0.25%, inhibidor de fosfatasa 1X. Los lisados celulares fueron

centrifugados a $10,000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C . Se colectó el sobrenadante, se determinó la concentración de proteína y se adicionó el lisado a las columnas proporcionadas por el kit, las cuales contienen una resina acoplada a anticuerpos contra residuos de Ser, Thr y Tyr. Las columnas fueron colocadas en agitación durante 30 minutos a 4°C . Posterior a esta incubación se obtuvieron tres fracciones. La primera fracción correspondiente a las proteínas no fosforiladas, posterior al lavado de la columna se obtuvo la segunda fracción que correspondía a los lavados, finalmente se adicionó buffer de elución para obtener las proteínas fosforiladas. Estas fracciones fueron dializadas y posteriormente liofilizadas para ser preparadas con buffer de carga y mercaptoetanol para ensayos de SDS-PAGE. Las muestras fueron finalmente analizadas mediante ensayos de inmunodetección.

5.5.11 Inmunolocalización mediante microscopia confocal de nSMasas con etiqueta HA

Los trofozoítos transfectados con las construcciones correspondientes a cada una de las nSMasas, etiquetadas con HA, fueron crecidos hasta fase exponencial, para posteriormente cosecharse y lavarse en medio TYI-33-S. Se adicionaron 150 000 amibas por pozo de placas de 24 pozos, los cuales contenían en su interior cubreobjetos de 9 mm con 500 μL de medio TYI-33-S puestos a 37°C . Las amibas fueron incubadas durante 1.5 horas a 37°C . Se retiró el medio, posteriormente se fijaron, se permeabilizaron y se bloquearon con p-formaldehído al 3.7%, Tritón 0.1%-metanol y BSA al 1%, respectivamente. Se incubaron durante 1 hora con anticuerpo anti HA, dilución 1:300 en solución BSA 1% en PBS. Con agitación constante. Se realizaron lavados con BSA 0.1%, y se adicionó el segundo anticuerpo acoplado a Alexa-Flour, dilución 1:1000. Se realizaron lavados con BSA 0.1%, y finalmente se colocaron las amibas sobre portaobjetos, que contenía 10 μL de medio de montaje. Las muestras fueron observadas en el microscopio confocal.

5.5.12 Actividad hemolítica en *E. histolytica*

Se utilizaron eritrocitos humanos (RBC) conservados en Alsever 1x y lavados una vez con buffer PIPES-Tris pH 6.8 (importante checar el pH antes de usarlo, de no tener el pH indicado habrá lisis de eritrocitos desde antes del experimento) se ajustó a una concentración de 1×10^9 RBC/mL con buffer PIPES-Tris pH 6.8. Se ajustó la cantidad necesaria de proteína recombinante, añadirla a la suspensión de eritrocitos y amortiguador PIPES-TRIS. Se incubaron a 37°C por 90 minutos y se determinó la absorbencia de la hemoglobina liberada a 570 nm en un espectrofotómetro.

5.5.13 Efecto citopático

Para medir la capacidad de las amibas para destruir la monocapa de células epiteliales MDCK, se cosecharon trofozoítos de *E. histolytica* en fase exponencial de las diferentes cepas a evaluar. Se lavaron las células con TYI-33 sin suero y se colocaron 1×10^5 amibas por pozo conteniendo una monocapa confluyente de células MDCK lavada previamente con medio TYI-33 sin suero. Se aforó a un volumen de 1 ml con medio TYI-33 sin suero en cada uno de los pozos. Se incubó la placa a 37°C durante 30-60 min. Se detuvo la reacción enfriando la placa durante 10 min a 4°C, se lavó dos veces con PBS frío para remover a las amibas, células despegadas y los restos celulares, y se fijaron las células epiteliales remanentes con formaldehído al 4% en PBS. La placa fue lavada dos veces con solución de PBS y se incubó con solución de azul de metileno al 0.1%, se lavó con Tris 50 mM pH 8.0 y se extrajo el colorante incorporado a las células epiteliales con HCl 0.1 M. Se tomaron lecturas a 655 nm en un lector de microplacas. El colorante extraído fue proporcional al número de células que permanecieron intactas después de la interacción con los trofozoítos amibianos (Bracha and Mirelman, 1984).

5.5.14 Efecto citotóxico

Para medir la viabilidad de las células MDCK, se cosecharon trofozoítos de *E. histolytica* en fase exponencial de las diferentes cepas a evaluar. Se lavaron por separado los trofozoítos y las células MDCK, ajustando concentraciones en medio TYI-33 a 8×10^5 cel/mL y 4×10^6 cel/mL, respectivamente. Posteriormente, se colocaron en un mismo tubo Eppendorf, favoreciendo la interacción mediante centrifugación. La mezcla se incubó a 37°C durante 75 minutos. Se eliminó el sobrenadante después de centrifugar durante 10 segundos a máxima velocidad para favorecer la precipitación de las células que fueron finalmente interaccionadas durante 5 minutos a temperatura ambiente con el fluorocromo Hoechst 33258. Las células muertas se cuantificaron en un microscopio de epifluorescencia.

5.6 Métodos de biología molecular

5.6.1 Extracción y precipitación de RNA

Para la obtención de RNA de *E. histolytica*, se empleó el kit Aurum™ Total RNA (BioRad) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, lisar el paquete celular de 2×10^6 trofozoítos con de solución de lisis conteniendo 2-mercaptoetanol, adicionar etanol al 70% y mezclar vigorosamente. Transferir el lisado amibiano a una columna conteniendo una matriz de unión de RNA, lavar con solución de baja astringencia e incubar con DNasa I durante 1h a temperatura ambiente. Lavar con soluciones de diferente astringencia y eluir el RNA con solución de elución previamente calentada a 70°C. Para precipitar el RNA purificado, adicionar acetato de sodio y mantener a 20°C por 8 horas. Colectar mediante por centrifugación durante 15 min a 4°C y lavar el precipitado mediante centrifugación con etanol al 75% en agua tratada con DEPC. Secar el precipitado a temperatura ambiente, transcurridos 10 minutos resuspender en agua tratada con DEPC. A fin de eliminar estructuras secundarias en el RNA, incubar por 10 minutos a 65°C y colocar inmediatamente en hielo. Resuspender nuevamente y cuantificar la concentración de RNA en espectrofotómetro a 260 nm. Almacenar a -70°C.

5.6.2 RT-PCR semicuantitativo

Para la síntesis de la primera cadena de cDNA, se emplearon 3 µg de RNA total, el cual fue transcrito en forma reversa empleando un oligonucleótido iniciador (dNTP) durante 5 min a 65°C y adicionando Transcriptasa Reversa SuperScript II RT (Invitrogen) incubando durante 50 min a 42°C. El cDNA se utilizó como molde para la amplificación por PCR durante 35 ciclos, empleando oligonucleótidos iniciadores específicos para cada gen de SMasa, así como para el gen *ehgapdh*, utilizado como control de expresión de genes constitutivos. Los productos de la reacción de PCR se separaron en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio y se fotografiaron empleando el sistema KODAK Image Station 2000R. El análisis densitométrico de las bandas correspondientes a los productos de amplificación se realizó con el programa Kodak ID Image Analysis Software.

5.6.3 Lipofección de *E. histolytica*

Basado en el método descrito por Mendoza-Macías (Mendoza-Macías et al., 2010) con algunas modificaciones. Colocar 3 X 10⁵ trofozoítos de *E. histolytica* por pozo en una placa de 24 pozos. Incubar durante 6 h a 37 °C en anaerobiosis. Diluir 2.5 µg de DNA en 15 µL de medio de transfección, y adicionar 7.5 µL de reactivo Plus Reagent (Invitrogen). Por otra parte, diluir 5 µL de lipofectamina (Invitrogen) con 40 µL de medio de transfección. Homogenizar las dos mezclas e incubar a temperatura ambiente para la formación de los liposomas conteniendo el plásmido de interés. Cubrir los trofozoítos adheridos a la placa con medio de transfección, y adicionar la mezcla con los liposomas. Sellar la placa e incubar durante 4 horas a 37°C. Transferir los trofozoítos a tubos con 6 mL de TYI-S-33 adicionar 30 µg del antibiótico cefotaxima. 24 horas después, iniciar la selección de los trofozoítos transfectantes mediante la adición de 5 µg de geneticina (G418) por mL de medio de cultivo. Cambiar el medio 24 horas después para establecimiento de cultivos, incrementando la concentración de G418 cada 3er pase bajo el siguiente esquema: 10, 20, 30, 40, y 48 µg/mL de G418 (para silenciamiento) y 10, 15 y 30 µg/mL de G418 para sobreexpresión.

5.7 Análisis estadísticos y bioinformáticos

5.7.1 Análisis bioinformático de posibles sitios de fosforilación en las nSMasas

El estudio fue realizado mediante el software en línea NetPhos 2.0 Server. DISPHOS 1.3 Server, para la localización de probables sitios de fosforilación de las proteínas EhnSM1, EhnSM2 y EhnSM3. Este servidor predice sitios de fosforilación de serina, treonina o tirosina en proteínas eucarióticas. Se realizan predicciones genéricas y específicas de cinasas. Se introdujo la secuencia de aminoácidos de cada una de las proteínas y mediante el logarítmico del servidor, éste mostró el número de sitios probables de fosforilación así como su asociación a residuos de T, S o Y.

5.7.2 Análisis bioinformáticos de posibles sitios de palmitoilación en las nSMasas.

El estudio fue realizado mediante el software en línea *@CSS-palm.prediction*, con el objetivo de saber si las nSMasas de *E. histolytica* poseían residuos relacionados con la palmitoilación, y de esta manera analizar más a fondo este mecanismo por medio de la acción de inhibidores de este proceso como el 2-Br palmitoilato .

5.7.3 Análisis estadísticos

Para las lecturas de actividad de nSMasa así como para los resultados de viabilidad celular se realizaron análisis simples de comparación entre las desviaciones estándar de cada una de las muestras.

Para las actividades biológicas, los datos se analizaron con el software BIAS 10.12, (GeBioM, Münster, Germany). Como los datos no se distribuyeron normalmente, la prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para todas las diferencias de grupo. Si el valor p de la prueba de Kruskal-Wallis era $p \leq 0.05$, se utilizó la comparación Conover-Iman y posteriormente se llevó a cabo la corrección Bonferroni-Holm. El nivel de significancia fue $p \leq 0.05$.

6. Resultados

6.1. Cepas transfectantes de *E. histolytica* sobreexpresantes y silenciadas en los genes *ehnsm1*, *ehnsm2* y *ehnsm3*

Con la finalidad de evaluar la función de las nSMasas en *E. histolytica* se utilizaron una batería de cepas transfectadas para sobreexpresar o silenciar las nSMasas analizadas previamente en el grupo de trabajo (Mendoza Macías, 2010). De manera general las cepas sobreexpresantes se generaron usando la cepa HM1:IMMS y el plásmido base phex-HA (Figura 3A). Los genes *ehnsm1*, *ehnsm2* y *ehnsm3* fueron clonados en el plásmido para producir las proteínas EhnSM1-HA, EhnSM2-HA, y EhnSM3-HA respectivamente, con una etiqueta de hemaglutina, en la región C-terminal. Mientras que para obtener las cepas silenciadas se utilizó la cepa G3 de *E. histolytica* que tiene silenciado el amebaporo (*eh-ap-a*) y el plásmido pSAP2Gunma (Figura 4A), el cual contiene un fragmento de 400 pb (nucleótidos 1-400) de los marcos de lectura para los genes *ehnsm1* y *ehnsm2*. La verificación de la construcción correcta para cada plásmido se realizó mediante PCR y secuenciación.

En el presente trabajo se evaluó la producción de las proteínas etiquetadas mediante ensayos de inmunodetección. Este ensayo se realizó utilizando anticuerpos policlonales contra las nSMasas y monoclonales anti-HA. El anticuerpo policlonal anti-nSM1 detecta una proteína de 37 kDa en todas las cepas evaluadas que corresponde a la nSMasa1 endógena y una banda adicional de 42 kDa solamente en la cepa sobreexpresante EhnSM1-HA que corresponde a la nSMasa1HA exógena (**Figura 3B**). El anticuerpo anti nSMasa2-3 reconoce a las proteínas nativas de 38 kDa que corresponden a las nSMasa2 y nSMasa3, estas bandas se observan tanto en la cepa control como en las tres transfectantes. Se observa una banda adicional de 43 kDa en las cepas EhnSM2-HA y EhnSM3-HA que corresponden a las nSMasas etiquetadas exógenas. La producción de las proteínas etiquetadas se corroboró utilizando un anticuerpo monoclonal contra la etiqueta HA (**Figura 3B**).

Para evaluar el silenciamiento de los genes *ehnsm1*, *ehnsm2* y *ehnsm3* en las cepas G3-GS EhnSM1 y G3-GS Ehnsm2-3, obtenidas por Mendoza-Macias 2010, se determinó el nivel de expresión de los genes que codifican para las nSMasas mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativo, empleando oligonucleótidos específicos para amplificar cada uno de los genes *ehnms1*, *ehnsm2* y *ehnsm3*. Para realizar un análisis semicuantitativo, los niveles del transcrito correspondiente se normalizaron con los niveles de transcrito del gen *gapdh* utilizado como control la cepa G3. La **Figura 4B** muestra una disminución significativa (alrededor del 90%) en la banda de amplificación que corresponde al transcrito del gen *ehnsm1* de la cepa G3-GS EhnSM1 y un aumento de este transcrito en la cepa G3-GS EhnSM2-3. La expresión de los genes *ehnsm2* y *ehnsm3* no presentas cambio significativo en la cepa EhnSM1. Sin embargo, en la cepa G3-GS EhnSM2-3 existe una disminución del 50% y 70% de estos, *ehnsm2* y *ehnsm3* respectivamente. En todos los casos los niveles de expresión del gen *gapdh* (de expresión constitutiva) son comparables entre la cepa control y la transfectante silenciada.

6.2. Determinación de la actividad de nSMasa en cepas HM1, G3 y transfectantes.

Con la finalidad de medir la actividad de nSMasa en las transfectantes obtenidas, se implementó un método directo usando como sustrato a la esfingomielina marcada radiactivamente en el carbono 3 de la cadena de la esfingomielina. Para la validación del método, se utilizó como control una nSMasa comercial de *Bacillus cereus*, la cual se incluyó como control, y un homogenado total de la cepa silvestre HM1 de *E. histolytica* (**Figura 5**).

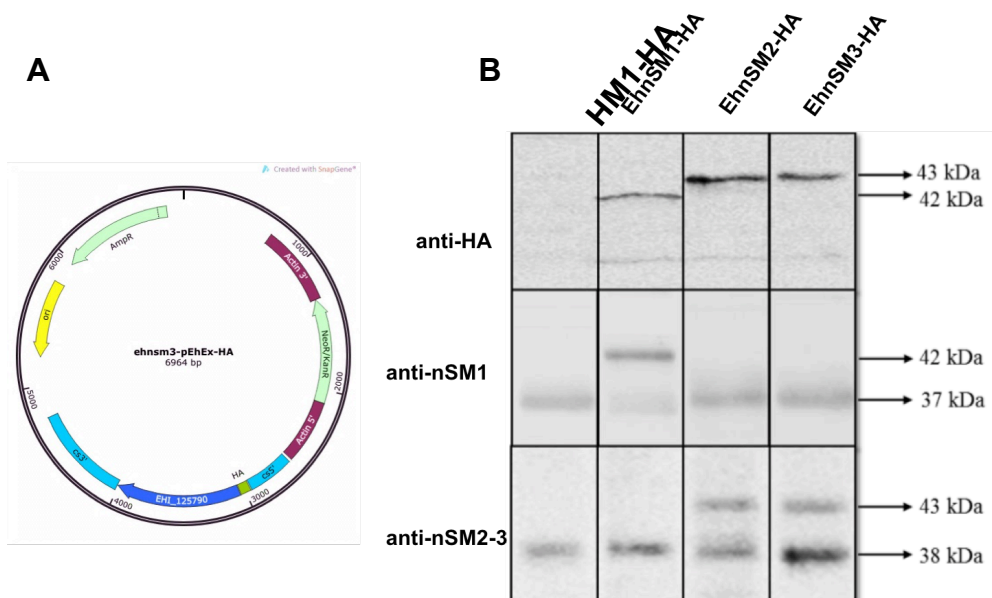


Figura 3. Inmunodetección de las nSMasas etiquetadas en las cepas sobreexpresantes de *E. histolytica*. **A)** Mapa del plásmido ehnm3-pEhex-HA empleado para la sobreexpresión del gen *ehnm3* en *E. histolytica* con la etiqueta HA. Contiene el gen *neo* flanqueado por las UTRs 5' y 3' del gen de actina y confiere resistencia a neomicina y sus análogos. **B)** Inmunodetección de nSMasas de *E. histolytica* de las cepas EhnSM1-HA, EhnSM2-HA y EhnSM3-HA. Homogenados totales se analizaron por Western blot empleando anticuerpos producidos contra las proteínas rEhnSM1, rEhnSM3 y contra la etiqueta HA. Las transfectantes analizadas fueron: EhnSM1-HA, EhnSM2-HA y EhnSM3-HA. Como control se usó la cepa parental transfectada con el plásmido vacío (HM1-HA). En todos los casos se tiñeron las membranas con rojo de Ponceau y no se observaron diferencias significativas en la cantidad de proteína para cada condición.

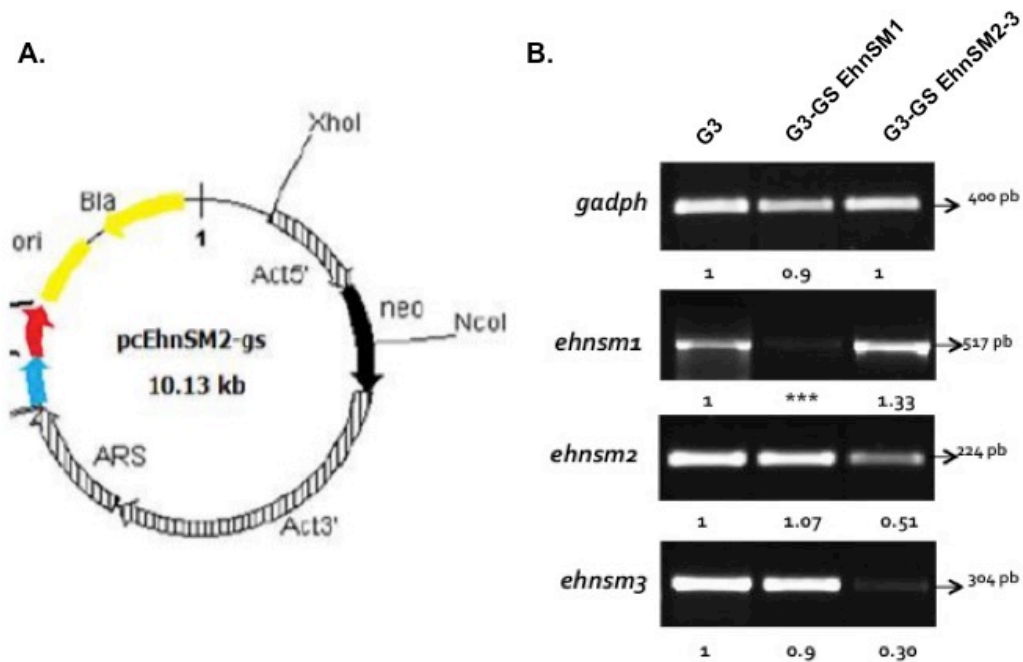


Figura 4. Niveles de expresión de los genes *ehnsM1*, *ehnsM2* y *ehnsM3* en los trofozoítos de *E. histolytica* de las cepas silenciadas G3-GS EhnSM1 y G3-GS EhnSM2-3. A) Mapa del plásmido representativo pcEhnSM2-GS empleado para el silenciamiento del gen *ehnsM3* en *E. histolytica*. B) Análisis de los niveles de transcrito de los genes *ehnsM1*, *ehnsM2* y *ehnsM3* en las cepas G3 (control), G3-GS EhnSM1 y G3-GS EhnSM2-3 de *E. histolytica*, mediante RT-PCR semicuantitativo empleando para la normalización el gen *gapdh*.

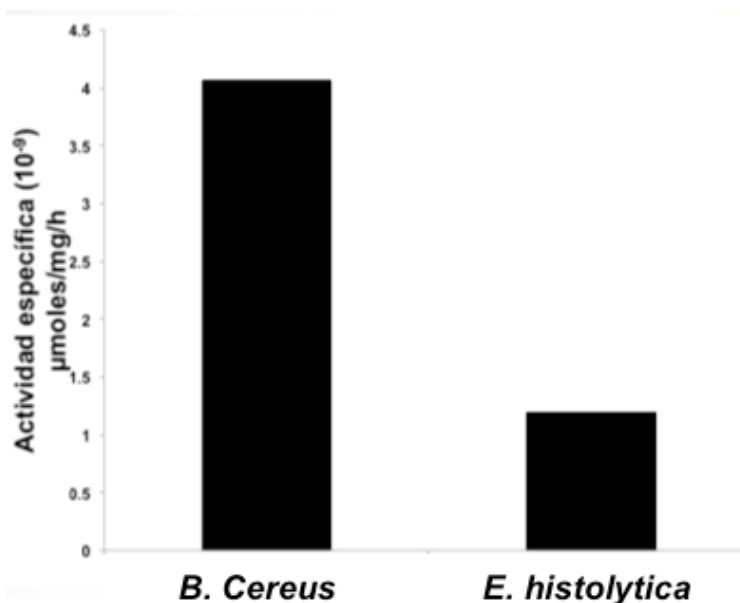


Figura 5. Actividad de nSMasa de *E. histolytica* (HM1) y *B. cereus*. Determinación de la actividad de SMasa neutra en homogenado total de *E. histolytica* y nSMasa comercial de *B. cereus*, para la validación de la metodología de medición de actividad de nSMasa empleando como sustrato a la esfingomielina marcada radiactivamente. Se calculó la actividad de nSMasa como micromoles de esfingomielina hidrolizada por 1 mg de proteínas totales por hora, expresado como actividad específica.

Se evaluó el efecto de la concentración de proteína, tiempo de incubación y presencia de iones sobre la actividad de nSMasa. Para la concentración de proteína se analizaron concentraciones de 100 a 400 μg (**Figura 6A**), observándose que a partir de 200 μg ya no hay aumento de la actividad. Tres tiempos de incubación fueron analizados, 2, 3 y 5 horas (**Figura. 6B**). Como se muestra en el gráfico la actividad enzimática se ve afectada por el tiempo de incubación, a mayor tiempo de incubación la actividad enzimática aumenta, de acuerdo con este resultado, para el resto de los ensayos el tiempo a evaluarse fue de 5 horas. Continuando con la estandarización de la metodología, se analizó el efecto de dos iones Mn^{2+} y Zn^{2+} (**Figura. 6C**), los cuales fueron reportados en trabajos previos (Mendoza-Macías et al., 2010). Se observó, en concordancia con lo reportado por el grupo de trabajo que el Mn^{2+} estimula la actividad, encontrándose un aumento de 1.5 veces.

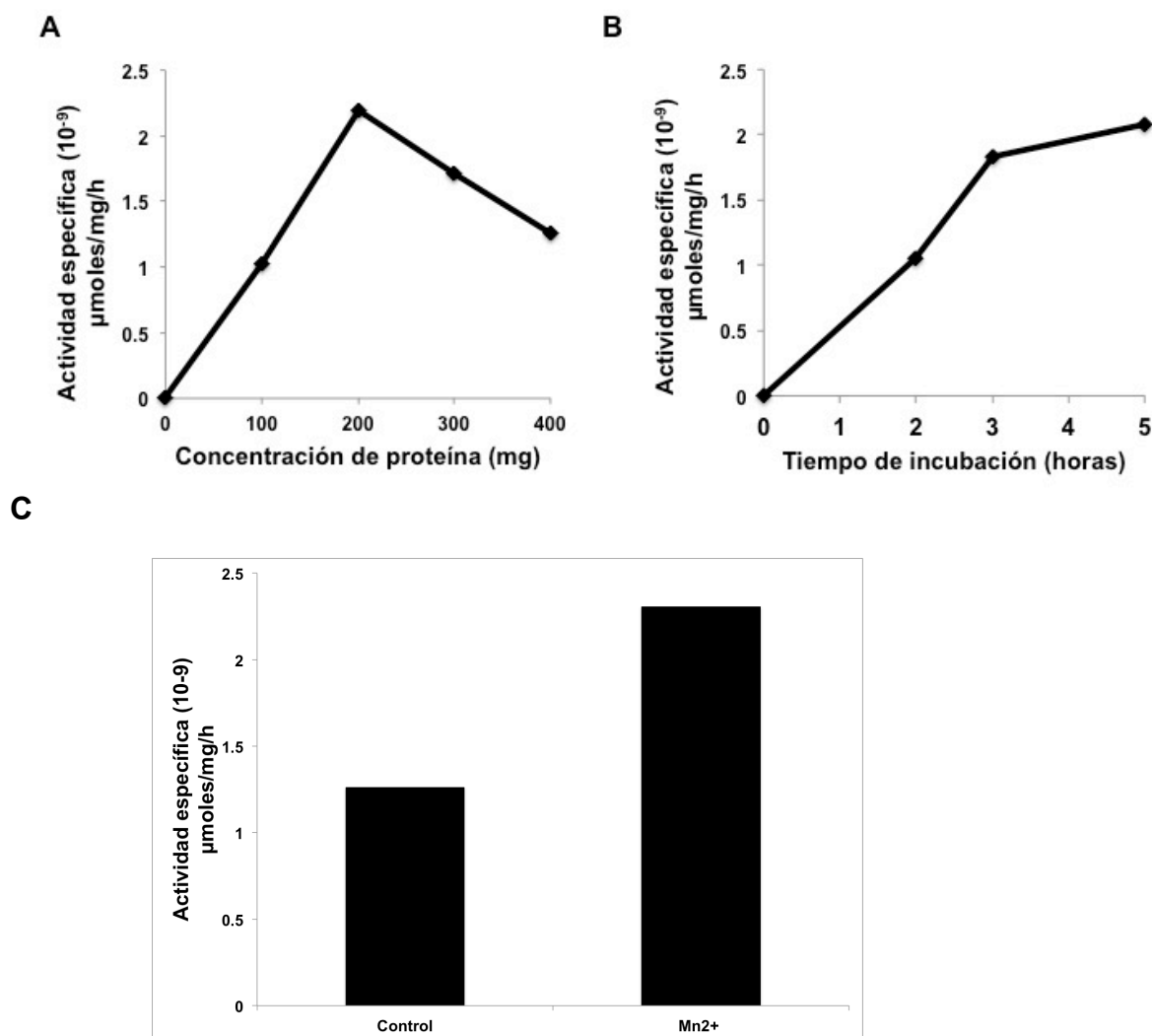


Figura 6. Efecto de la concentración de sustrato, del tiempo de incubación y del manganeso en la actividad de nSMasa en homogenados totales de *E. histolytica* (HM1). A. Actividad de nSMasa de la cepa HM1, bajo diferentes concentraciones de proteína. **B.** Efecto del tiempo de incubación a 37°C sobre la actividad de nSMasa de la cepa HM1. **C.** Efecto del Mn²⁺ en la actividad de nSMasa de *E. histolytica*. Se calculó la actividad de nSMasa como micromoles de esfingomiélna hidrolizada por 1 mg de proteínas totales por hora, expresado como actividad específica.

Se analizó la actividad de nSMasa en las fracciones celulares de la cepa HM1. Con los datos de este experimento, se pudo observar que aproximadamente el 90% de la actividad de nSMasa en *E. histolytica* se asocia a la fracción membranal (Figura 7).

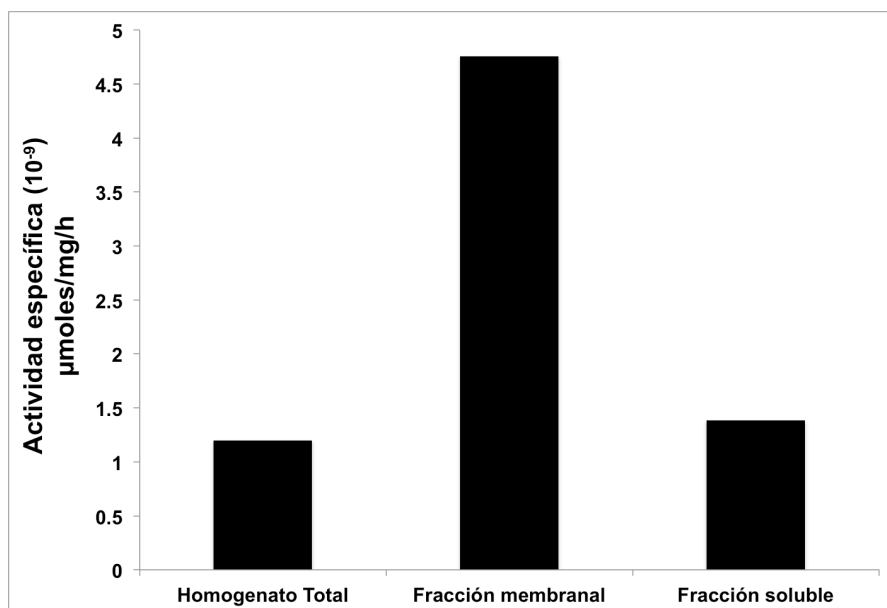


Figura 7. Actividad de nSMasa en fracciones celulares de *E. histolytica*. Se obtuvieron fracciones celulares, fracción membranal y fracción soluble, de la cepa HM1 y se determinó la actividad de nSMasa presente en cada fracción. Se calculó la actividad de nSMasa como micromoles de esfingomielina hidrolizada por 1 mg de proteínas totales por hora y expresado como actividad específica.

Posterior a la medición de actividad en la cepa silvestre, se analizó la actividad en las cepas silenciadas y sobreexpresantes en los genes que codifican para las nSMasas, esto con el objetivo de analizar si las proteínas recombinantes tenían actividad de nSMasa y si la actividad de nSMasa se ve afectada con el silenciamiento de los genes. Lisados totales de cada cepa se compararon con la cepa HM1-HA. Se observó un aumento en la actividad de las tres cepas sobreexpresantes en comparación con el control. Por otro lado, las cepas silenciadas en los genes de nSMasas, presentaron una disminución en su actividad con respecto al control (Figura 8). Estos resultados nos muestran por

una parte que las proteínas recombinantes son activas, y por otro lado se podrán analizar por separado las características propias de cada enzima relacionados con su virulencia y su localización.

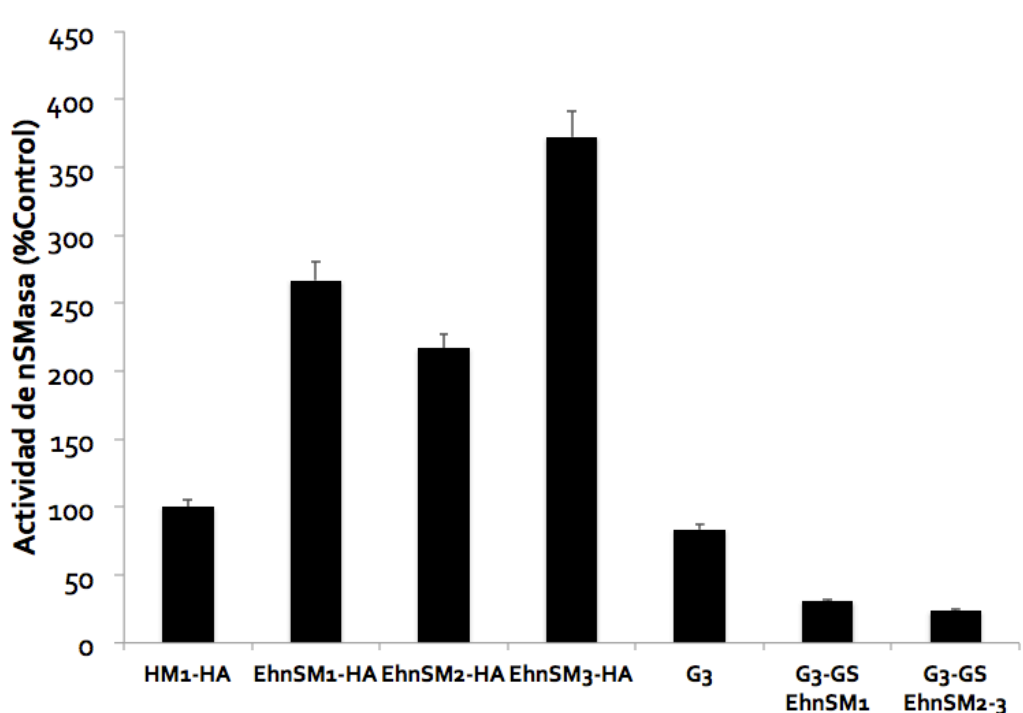


Figura 8. Determinación de actividad de nSMasa en cepas sobreexpresantes y silenciadas en los genes que codifican para nSMasas de *E. histolytica*. Cepas de *E. histolytica* que sobreexpresan nSMasas recombinantes etiquetadas con HA (EhnSM1-HA, EhnSM2-HA y EhnSM3-HA). HM1-HA es la cepa parental que se usó como control. Cepas de *E. histolytica* silenciadas en los genes de nSMasas, G3-GS EhnSM1 (*ehnsm1*) y G3-GS EhnSM2-3 (*ehnsm2* y *ehnsm3*). La cepa parental para el silenciamiento fue la G3. Se calculó la actividad de nSMasa como micromoles de esfingomielina hidrolizada por 1 mg de proteínas totales por hora y expresado como un porcentaje de los valores del control, el cual presentó una actividad basal de 9×10^{-12} $\mu\text{mol/mg/h}$.

6.3 Efecto del H₂O₂ y choque térmico sobre la viabilidad celular y actividad de nSMasa en las cepas HM1-HA (control) y EhnSM3-HA (sobreexpresante *ehnSM3*) de *E. histolytica*

Se ha reportado que la generación de ceramida, principal producto de la hidrólisis de esfingomielina por SMasas, está asociada a diferentes estímulos como el estrés oxidativo generado por H₂O₂, radiación UV-C y choque térmico, generando respuestas celulares como apoptosis y proliferación celular, entre otras (Clarke and Hannun, 2006). Para determinar el posible papel de las nSMasas en respuestas a daño por estrés oxidativo en *E. histolytica*, se evaluó el efecto de estos agentes sobre la viabilidad y la actividad de nSMasa de las cepas HM1-HA y EhnSM3-HA, así como el nivel de expresión de los genes *ehnsm1*, *ehnsm2* y *ehnms3* en estas mismas cepas.

Se evaluó el efecto de los inductores de estrés oxidativo como lo son el H₂O₂ y choque térmico en la viabilidad de los trofozoítos de la cepa HM1-HA y EhnSM3-HA de *E. histolytica*. Se evaluaron diferentes concentraciones de H₂O₂ (0.2, 0.4, 0.8, 1.2 y 1.6 mM) por 30 minutos y se evaluó la viabilidad empleando el colorante vital azul de tripano. La viabilidad de las amibas tratadas, disminuyó un 13% a concentraciones superiores a 0.4 mM para la cepa HM1-HA, mientras que la cepa EhnSM3-HA presentó una disminución de 10%, la diferencia entre estas cepas se acentuó más a concentraciones de 1.2 mM y 1.6 mM, observándose una diferencia de 14% entre la cepa HM1 y EhnSM3-HA (**Figura 9A**).

Por otro lado, se analizó la viabilidad de las cepas HM1-HA y EhnSM3-HA de *E. histolytica* en respuesta al choque térmico. Comparando ambas cepas a partir de las 6 horas a 42°C se observa una mayor viabilidad (>12%) de la cepa EhnSM3-HA con respecto a la cepa control EhnSM3-HA (**Figura 9B**).

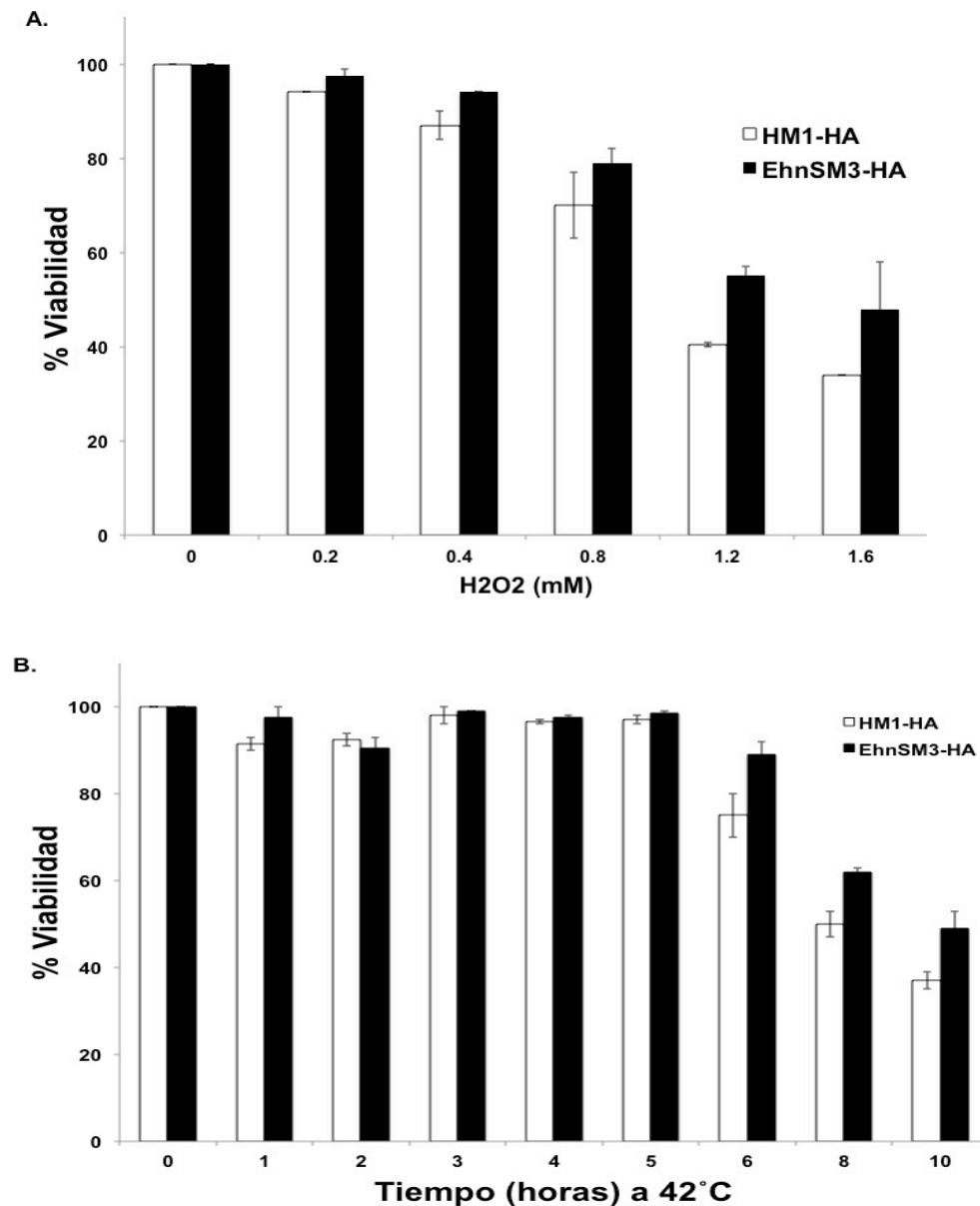


Figura 9. Viabilidad celular de la cepas HM1-HA y EhnSM3-HA en respuesta a H₂O₂ y choque térmico. A. Trofozoítos de la cepa HM1-HA y EhnSM3-HA de *E. histolytica* fueron estimulados durante 30 minutos con concentraciones entre 0.2 y 1.6 mM de H₂O₂. **B.** Viabilidad celular de las cepas HM1-HA y EhnSM3-HA en respuesta al choque térmico. Trofozoítos de la cepa HM1 de *E. histolytica* fueron incubados a 42°C a diferentes períodos de tiempo entre 0 y 10 horas. En ambos casos, se determinó su viabilidad mediante la exclusión de azul de tripano.

6.3.1 Actividad de nSMasa en trofozoítos estimulados con H₂O₂.

Con los resultados obtenidos en la sección anterior, se procedió a analizar el efecto del H₂O₂ a nivel de actividad enzimática, trofozoítos de *E. histolytica* cepas HM1-HA y EhnSM3-HA, fueron expuestos a 0.4 mM de H₂O₂ durante 30 minutos, posterior a este tiempo se midió la actividad de nSMasa.

En condicione basales se observó un incremento evidente de la cepa EhnSM3-HA con respecto a su control HM1-HA. Sin embargo, posterior al estímulo sólo en la cepa control existió un incremento alrededor de 5 veces sobre los niveles basales. Mientras que la cepa EhnSM3-HA no muestra diferencia entre los trofozoítos tratados y los no tratados (**Figura 10**).

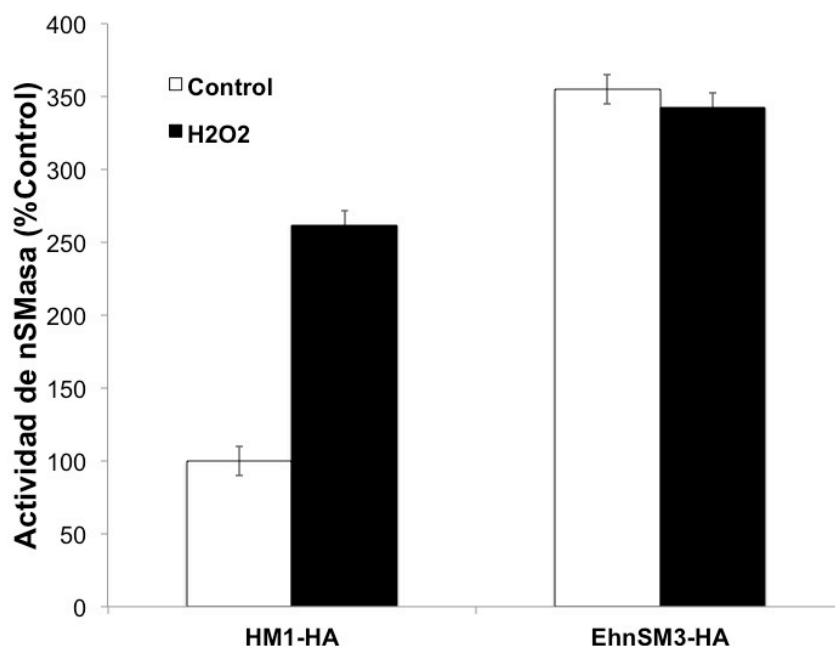


Figura 10. Actividad de nSMasa de la cepas HM1-HA y EhnSM3-HA de *E. histolytica* en respuesta al peróxido de hidrogeno. A. Determinación de la actividad de SMasa de la cepas HM1-HA y EhnSM3-HA en presencia de 0.4 mM de peróxido de hidrógeno durante 30 minutos.

6.3.2 Expresión de los genes *ehnsm1*, *ehnsm2* y *ehnsm3*, posterior a la estimulación con peróxido de hidrógeno

Para evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la actividad de nSMasa, se aisló RNA y se sintetizó cDNA de las células previamente expuestas al H₂O₂, bajo las mismas condiciones en que se determinó la actividad. Se analizó el nivel de expresión de los genes que codifican para las nSMasas mediante PCR. Para las amibas expuestas a peróxido de hidrógeno, el análisis por RT-PCR mostró que los genes *ehnsm2* y *ehnsm3* incrementan sus niveles de expresión mientras que el gen *ehnsm1* disminuye para la cepa HM1. Por otra parte, la cepa EhnSM3-HA no presentó cambios significativos en ninguno de los genes (**Figura 11**).

6.4 Localización celular de la proteína EhnSM3

Para corroborar la actividad de nSMasas asociada a la fracción membranal, se realizó la inmunodetección de las nSMasas en diferentes fracciones celulares de *E. histolytica* en las cepas sobreexpresantes y en la HM1-HA usada como control. Empleando los anticuerpos anti EhnSM1, se detectó en el homogenado total y en la fracción membranal, de todas las cepas evaluadas, una banda de 37 kDa que corresponde al tamaño reportado para la EhnSM1, y únicamente para la cepa EhnSM1-HA se observó una segunda banda presente en el homogenado total como en la fracción membranal de aproximadamente 41 kDa, la cual corresponde a la proteína etiquetada con HA.

Asimismo, con los anticuerpos dirigidos contra la EhnSM3, se detectó una doble banda entre 38-39 kDa, en el homogenado total y en la fracción membranal, lo que indica que las EhnSM2 y EhnSM3 se detectan con el anticuerpo anti nSM3 y se encuentran distribuidas en la fracción membranal. Una segunda banda de 42 kDa en la cepa EhnSM2-HA y de 43 kDa en la cepa EhnSM3-HA, son detectadas de igual forma, estas bandas corresponden a las proteínas recombinantes presentes en estas cepas.

Finalmente, para corroborar que las bandas entre 41-43 kDa, reconocidas anteriormente por los anticuerpos contra las nSMasas, corresponden a las

proteínas etiquetadas, se realizaron ensayos de inmunodetección con anticuerpo monoclonal contra la etiqueta HA. Los datos de este análisis mostraron que las tres proteínas etiquetadas se localizan en la fracción membranal (**Figura 12**).

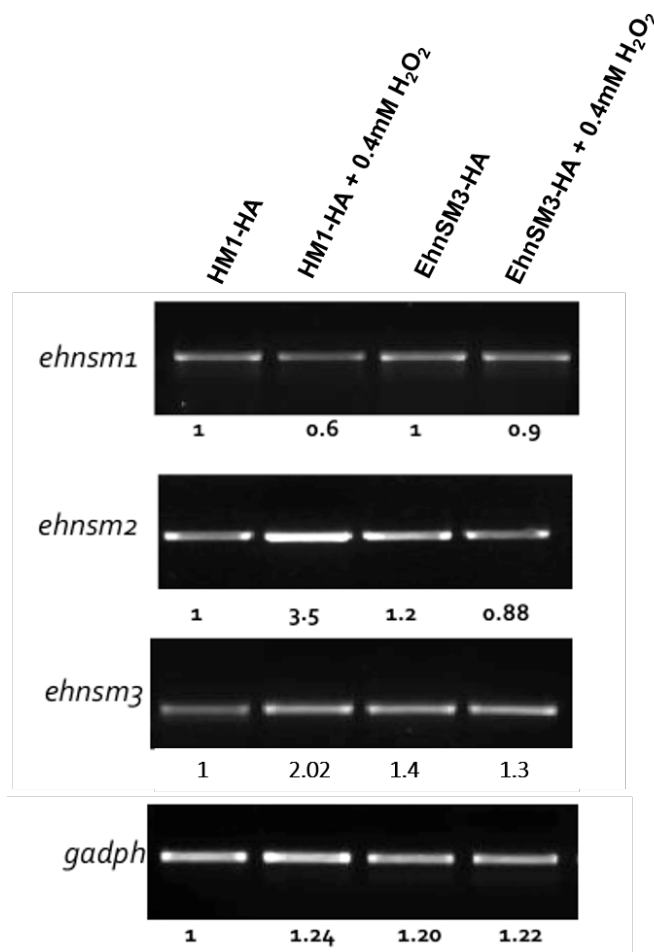


Figura 11. Efecto del peróxido de hidrógeno en la expresión de los genes *ehns1*, *ehns2* y *ehns3*. Niveles de mensajero para los genes *ehns1*, *ehns2* y *ehns3*, mediante RT-PCR semicuantitativo empleando para la normalización el gen *gadph* en los trofozoítos de la cepa HM1-HA y EhnSM3-HA, estimulados con H₂O₂ 0.4 mM. Para determinar su localización subcelular de la proteína EhnSM3, se realizaron ensayos de inmunolocalización empleando microscopía confocal de la cepa EhnSM3-HA usando anticuerpos comerciales dirigidos contra la etiqueta HA. Se observó que la proteína EhnSM3 se localiza en la membrana plasmática bajo condiciones basales, confirmando así los resultados previamente obtenidos por inmunodetección y por la actividad de nSMasa en fracciones celulares (**Figura 13**).

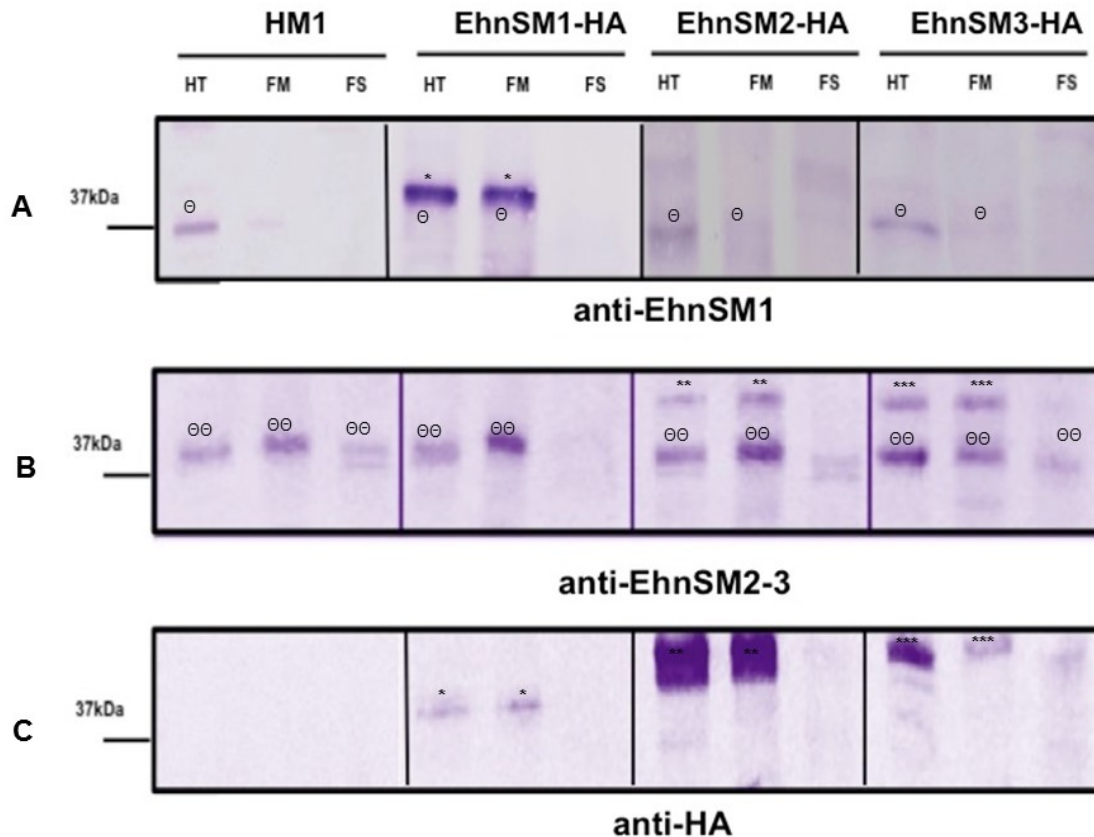


Figura 12. Inmunodetección en homogenados totales y fracciones celulares de nSMasas de *E. histolytica* en cepas sobreexpresantes. Fracciones celulares de las cepas sobreexpresantes en los genes *ehnsm1* (EhnSM1-HA), *ehnsm2* (EhnSM2-HA) y *ehnsm3* (EhnSM3-HA), cepa control HM1. **A.** Inmunodetección utilizando el anticuerpo contra la proteína EhnSM1. **B.** Inmunodetección utilizando el anticuerpo contra la nSMasa2-3. **C.** Inmunodetección utilizando el anticuerpo contra la etiqueta HA. HT, homogenado total; FM, fracción membranal; FS, fracción soluble. Proteínas nativas $^{\ominus}$ EhnSM1 (37 kDa), $^{\ominus\ominus}$ EhnSM2 (38 kDa) y $^{\ominus\ominus}$ EhnSM3 (39 kDa), proteínas recombinantes *EhnSM1-HA (41 kDa), **EhnSM2-HA (42 kDa) y ***EhnSM3-HA (43 kDa).

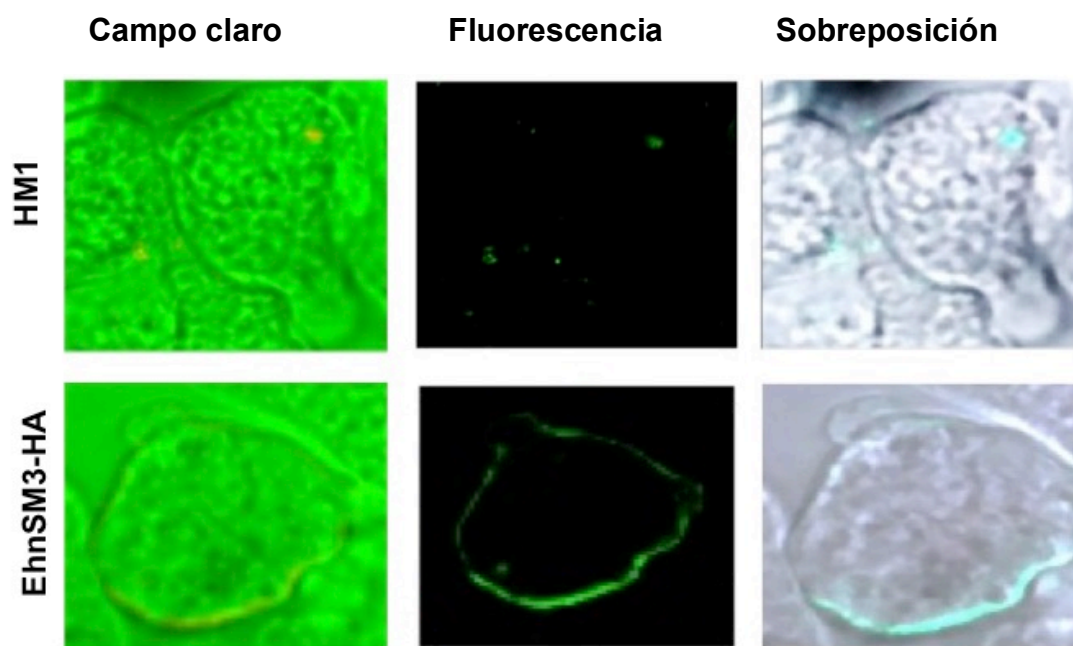


Figura 13. Inmunolocalización de la proteína EhSM3-HA. Inmunolocalización mediante microscopía confocal usando un primer anticuerpo contra la etiqueta HA y un segundo anticuerpo acoplado a Alexa Flour-488, con longitud de onda de excitación de 490 nm y emisión 525 nm. Cepa EhnSM3-HA y la cepa control HM1-HA.

6.5 Regulación de la actividad y localización de las nSMasas de *E. histolytica*, mediante modificaciones postraduccionales

6.5.1 Fosforilación de nSMasas como probable mecanismo de regulación de la actividad de nSMasa

Como se observa en los resultados anteriores, el estrés oxidativo causado por el peróxido de hidrógeno o el choque térmico, afecta los niveles de actividad de nSMasa, así como los niveles de transcrito de los genes que codifican para las nSMasas, sin embargo, el mecanismo por el cual esta vía es activada es desconocido. Algunos estudios en mamíferos reportan que la fosforilación juega un papel importante en la regulación de la actividad. Tomando en cuenta esto, se realizaron análisis bioinformáticos, utilizando el programa en línea [®]Netphospho 2.3, esto con la finalidad de saber si estas enzimas poseían sitios probables de

fosforilación, para ser considerado este proceso como candidato a regular su actividad enzimática. Los resultados obtenidos mediante este análisis bioinformático se reportan en la Tabla 4, la cual muestra que las tres nSMasas presentan al menos cinco sitios posibles de fosforilación.

Proteína	Gen Id	Posibles sitios de fosforilación		
		T	S	Y
EhnSM1	EHI_007460	6	4	3
EhnSM2	EHI_178990	4	5	5
EhnSM3	EHI_125790	4	4	4

Tabla 4. Sitios factibles de fosforilación en nSMasas de *E. histolytica*. Estudio realizado mediante el software en línea NetPhos 2.0 Server. DISPHOS 1.3 Server, para la localización de probables sitios de fosforilación de las proteínas EhnSM1, EhnSM2 y EhnSM3, en los aminoácidos tirosina (Y), serina (S) y treonina (T). EH_00760, EH_178990 y EHI_125790, números de identificación de los genes *ehnsm1*, *ehnsm2* y *ehnsm3*, respectivamente.

Posterior al análisis bioinformático, se llevó a cabo la purificación de proteínas fosforiladas a partir de homogenados totales de *E. histolytica*. Mediante ensayos de inmunodetección se analizaron si las nSMasas se encuentran en la porción de proteínas fosforiladas o en el grupo de proteínas no fosforiladas. Estos ensayos revelaron que las tres esfingomielinasas se asocian principalmente a la porción de proteínas fosforiladas (**Figura 14**).

6.5.2 Palmitoilación de nSMasas.

El análisis bioinformático de las secuencias de las nSMasas reveló que no son proteínas membranales, pero permiten la formación de horquillas- β que facilitan el anclaje de proteínas a la membrana (Mendoza Macías, 2010). En el presente trabajo se utilizó el programa en línea @CSS-*palm.prediction*, con el objetivo de saber si estas enzimas poseían residuos relacionados con la palmitoilación que le permitieran su anclaje a membrana. Mediante este análisis se encontró que

únicamente la proteína EhnSM1 presenta dos cisteínas potencialmente palmitoilables (Figura 15).

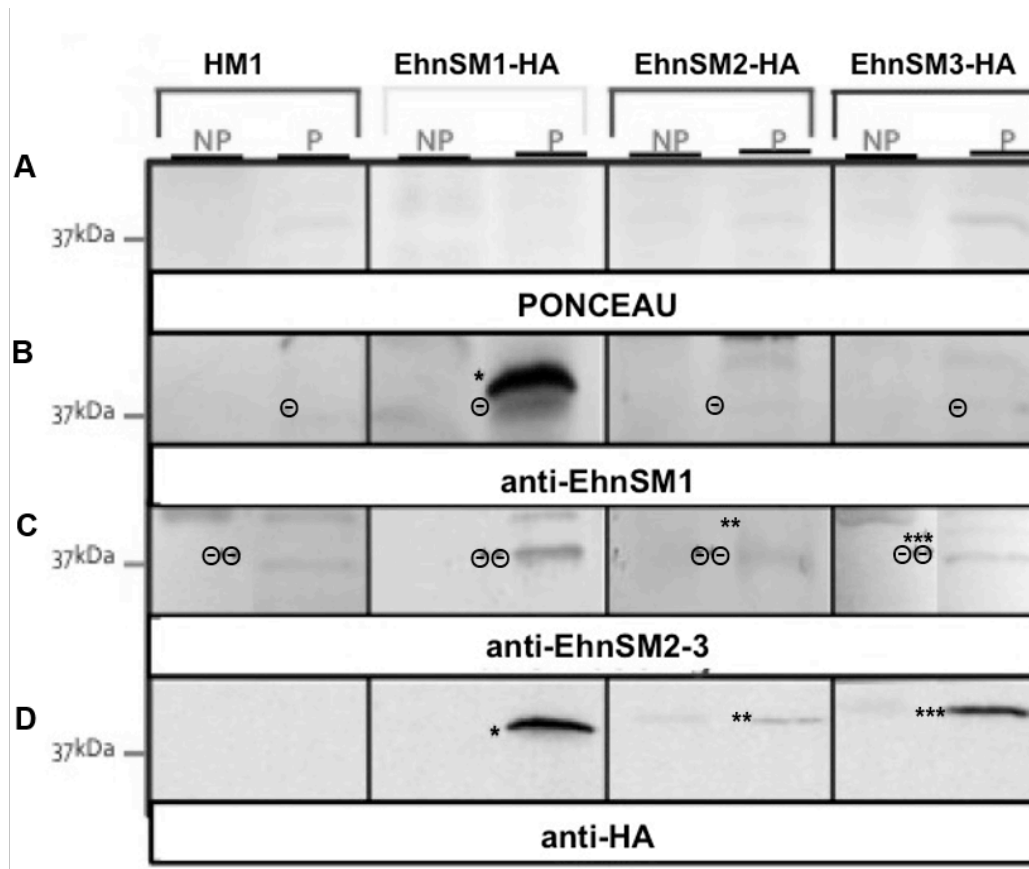


Figura 14. Inmunodetección de nSMases fosforiladas en la cepas sobreexpresantes de *E. histolytica*. Previo a la inmunodetección, se separaron las proteínas fosforiladas y no fosforiladas de homogenados totales de cada una de las cepas mediante columnas de afinidad. Posteriormente, se hicieron ensayos de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales para la proteína EhnSM1 (segundo bloque horizontal) y para las proteínas EhnSM2 y EhnSM3 (tercer bloque horizontal), así como con anticuerpos monoclonales para las proteínas etiquetadas con HA (cuarto bloque). NP, proteínas no fosforiladas. P, proteínas fosforiladas. Proteínas nativas $^{\ominus}$ EhnSM1 (37 kDa), $^{\ominus\ominus}$ EhnSM2 (38 kDa) y $^{\ominus\ominus}$ EhnSM3 (39 kDa), proteínas recombinantes *EhnSM1-HA (41 kDa), **EhnSM2-HA (42 kDa) y ***EhnSM3-HA (43 kDa).

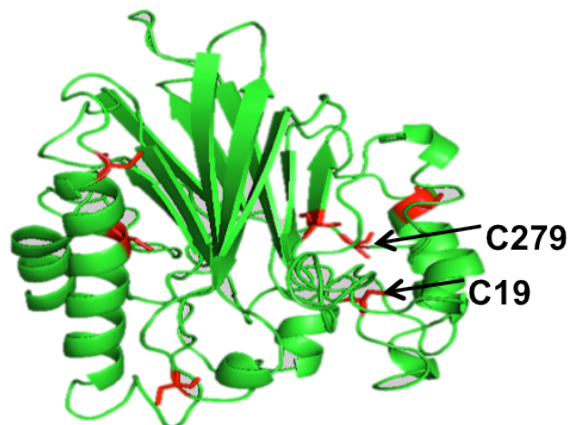


Figura 15. Estructura predicha para la proteína EhnSM1, relacionado con los sitios potenciales de palmitoilación. Se realizó el análisis bioinformático de la secuencia del gen *ehnsm1* en el programa ©CSS-*palm.prediction*, y se encontró que las cisteínas 19 y 279 son potencialmente sitios de palmitoilación.

Se utilizó el 2-Br palmitoilato, un inhibidor del proceso de palmitoilación, para evaluar si este mecanismo participa en la asociación de las nSMasas a la membrana plasmática. Trofozoítos de las cepas sobreexpresantes, así como de la cepa control HM1 fueron tratados con concentraciones entre 25 y 100 μM del inhibidor durante 1 hora y 5 horas de incubación. El efecto del inhibidor se analizó mediante ensayos de inmunodetección de las nSMasas en cada una de las fracciones celulares de trofozoítos tratados con 2-Br palmitoilato, y de trofozoítos tratados con DMS como control.

Sin embargo, bajo ninguna de las condiciones se identificó un cambio en la localización de las nSMasas, sugiriendo que la palmitoilación no es el mecanismo responsable de la localización membranal de estas enzimas (**Figura 16**).

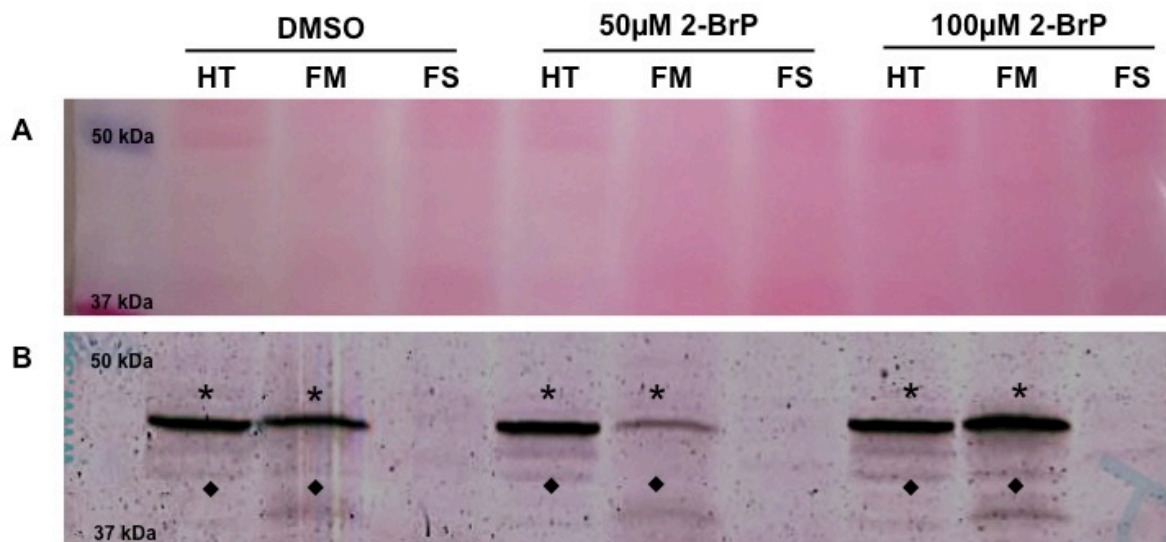


Figura 16. Efecto del 2-Br palmitoilato en la localización de nSMasas de las cepas sobreexpresantes de *E. histolytica*. Imagen representativa del efecto del inhibidor de palmitoilación 2-Br palmitoilato (2-BrP) en la localización de las nSMasas en la cepa sobreexpresante EhnSM1-HA y HM1 parental de *E. histolytica*. **A.** Tinción de Ponceau como control de carga. **B.** inmunodetección utilizando anticuerpo anti-nSMasa1. HT, homogenado total; FM, fracción membranal; FS, fracción soluble. Proteína nativa *EhnSM1, proteína recombinante *EhnSM1-HA. DMSO, células control, tratadas con dimetil sulfóxido, 50 μ M 2BrP y 100 μ M 2BrP, células expuestas a concentración de 50 y 100 μ M de 2-Br palmitoilato.

6.6 Análisis de la participación de las nSMasas en la virulencia *in vitro* de *E. histolytica*

La virulencia de *Entamoeba histolytica* resulta de complejas interacciones del hospedero y el parásito, implicando múltiples factores de ambos, lo que provoca respuestas de defensa por parte del hospedero y resistencia del parásito al estrés causado por las reacciones y los entornos durante la invasión tisular (Faust and Guillen, 2012). Entre los factores de *E. histolytica* que intervienen en la virulencia se encuentran la adhesión a la membrana, la lisis celular, la fagocitosis y la digestión de las células ingeridas, que permiten su supervivencia en el interior del huésped y promueven o realizan el daño celular (Anaya-Velázquez and Padilla-

Vaca, 2011). Por estas razones, se consideró importante el análisis de las diferentes actividades biológicas relacionadas con este parásito, actividad hemolítica, efecto citotóxico, y el efecto citopático,

La capacidad citolítica que posee *E. histolytica* es el mayor determinante de virulencia de este parásito (Ravdin and Guerrant, 1982), se sabe que los extractos amibianos tienen actividad hemolítica sobre células de mamífero (Prasad et al., 1982; Lopez-Revilla y Said-Fernandez, 1980), la cual se localiza mayoritariamente en una fracción vesicular llamada P30, donde se reporta la mayor actividad de fosfolipasa del parásito (Said-Fernández and López-Revilla, 1982; Vargas-Villarreal, 1985). *E. histolytica* también presenta citotoxicidad para una diferentes tipos celulares, incluidos los neutrófilos, linfocitos T, macrófagos y una variedad de líneas de cultivo de tejidos (Ralston and Petri, 2011).

Teniendo como fundamento esta información, tomando en cuenta la clasificación bioquímica de la nSMasas como parte de la familia de fosfolipasas C y aunado a los reportes en bacterias como factores hemolíticos importantes (Flores-Díaz et al., 2016), analizar el efecto del silenciamiento o sobreexpresión de las nSMasas sobre la citotoxicidad de las amibas, puede contribuir significativamente al entendimiento de la patogenicidad y virulencia del parásito.

La **Figura 17A** muestra que la cepa EhnSM3-HA incrementa 2.2 veces el efecto hemolítico en comparación con su parental HM1-HA, la cepa G3-GS EhnSM2-3 disminuye 2.8 veces su efecto en comparación con la cepa control G3, mientras que el resto de las cepas transfectantes no muestran diferencias significativas. Resultados similares se observaron al interaccionar células MDCK con las cepas transfectantes de *E. histolytica*, en la cual se observa un aumento de 1.8% para la cepa EhnSM3-HA y una disminución del 1.3% para la cepa G3-GS EhnSM2-3 (**Figura 17B**).

En conjunto estos dos resultados dan indicio que la proteína EhnSM3 puede contribuir a la lisis celular y al daño a la membrana celular como se reporta en los homólogos bacterianos (Walev et al., 1996; Huseby et al., 2007; Oda et al., 2012; Doll et al., 2013).

El objetivo principal de la invasión de *E. histolytica* es el epitelio del colon, donde sólo los trofozoítos invasores de *E. histolytica* pueden desencadenar el proceso de daño tisular (Ralston and Petri, 2011; Ralston et al., 2014), por lo tanto se evaluó la capacidad de *E. histolytica* para destruir monocapas celulares. Las líneas celulares transfectantes que sobreexpresan los genes *ehnsm1* o *ehnsm2* mostraron un mayor efecto citopático mientras que el comportamiento por silenciamiento de estos genes sólo se ve afectado para el gen *ehnsm2* (**Figura 17C**). De manera notable, se observó que no hay efecto de la sobreexpresión o silenciamiento del gen *ehnsm3*. Estos resultados plantean la hipótesis de la posible participación de las nSMasas ya sea directa o indirectamente en la destrucción de las monocapas celulares.

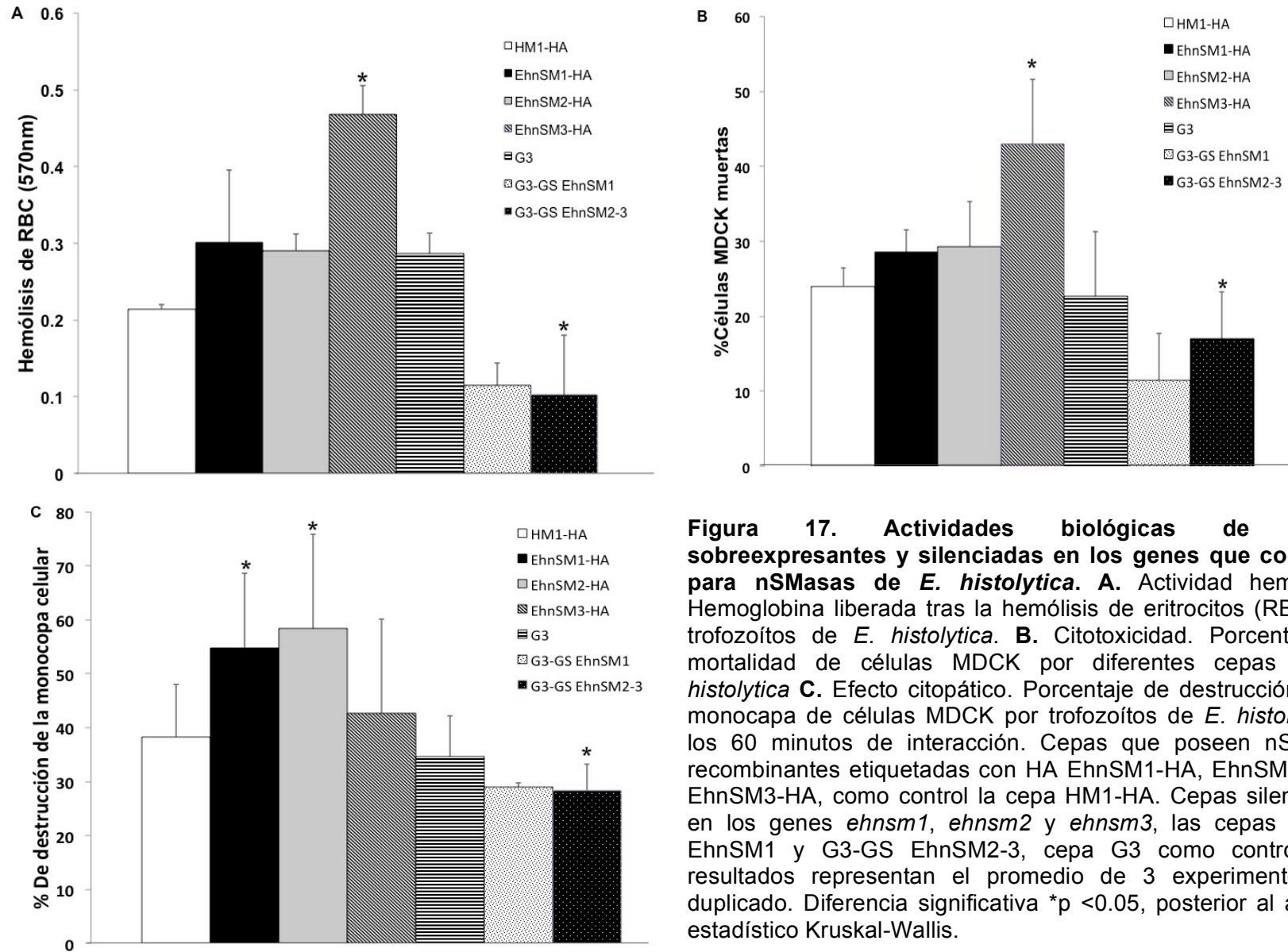


Figura 17. Actividades biológicas de cepas sobreexpresantes y silenciadas en los genes que codifican para nSMasas de *E. histolytica*. **A.** Actividad hemolítica. Hemoglobina liberada tras la hemólisis de eritrocitos (RBC) por trofozoítos de *E. histolytica*. **B.** Citotoxicidad. Porcentaje de mortalidad de células MDCK por diferentes cepas de *E. histolytica*. **C.** Efecto citopático. Porcentaje de destrucción de la monocapa de células MDCK por trofozoítos de *E. histolytica* a los 60 minutos de interacción. Cepas que poseen nSMasas recombinantes etiquetadas con HA EhnSM1-HA, EhnSM2-HA y EhnSM3-HA, como control la cepa HM1-HA. Cepas silenciadas en los genes *ehnsm1*, *ehnsm2* y *ehnsm3*, las cepas G3-GS EhnSM1 y G3-GS EhnSM2-3, cepa G3 como control. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos por duplicado. Diferencia significativa * $p < 0.05$, posterior al análisis estadístico Kruskal-Wallis.

7. DISCUSIÓN

Las esfingomielinasas son enzimas involucradas en diferentes procesos celulares relacionados con la proliferación celular, apoptosis, lisis celular y respuesta a estrés, en mamíferos (Hannun and Obeid, 2008); mientras que en bacterias son consideradas factores de virulencia (Openshaw et al., 2005). Estas enzimas participan en la síntesis de esfingolípidos, moléculas que se encuentran distribuidas en todos los animales, plantas, en algunos organismos procariotes y virus, como componentes de membranas, lipoproteínas y otras estructuras biológicas importantes (Rotolo et al., 2005; Hannun and Obeid, 2008; Tam et al., 2010).

En *E. histolytica* poco se sabe del metabolismo de esfingolípidos y de su posible participación en la señalización celular. Las amibas sintetizan varios esfingolípidos como esfingomielina, inositol fosfato ceramida y etanolamida-fosfato ceramida (Mclaughlin and Meerovitch, 1975; Aley et al., 1980). Al igual que en las células de mamíferos, posee estructuras ricas en esfingomielina en la membrana, las cuales están asociadas con la adhesión a células blanco y pinocitosis (Laughlin et al., 2004; Mittal et al., 2008). Las nSMasas y otras fosfolipasas son factores de virulencia bien conocidos en bacterias (Flores-Díaz et al., 2016).

En el grupo de trabajo se han realizado estudios que muestran que este parásito posee nueve genes que codifican para esfingomielinasas, tres para nSMasas y seis para aSMasas (Mendoza Macías, 2010). Estos genes se expresan en condiciones basales y las nSMasas recombinantes presentan actividad enzimática (Mendoza-Macías et al., 2010). Sin embargo, se desconoce si las nSMasas juegan un papel en la virulencia o en la señalización celular de *E. histolytica*.

La utilización de cepas transfectantes, a últimas fechas se ha vuelto una herramienta transcendental para la evaluación de la función de las proteínas, ya sea sobreexpresándolas o inhibiendo su expresión; por lo cual utilizamos las construcciones obtenidas en el grupo de trabajo. Se utilizaron tres cepas transfectantes de *E. histolytica* que expresan cada una de las nSMasas con una

etiqueta de hemaglutinina (HA), y dos transfectantes silenciadas, una en los genes *ehnsm2* y *ehnsm3* y la segunda en el gen *ehnsm1* (Mendoza Macías, 2010).

La validación de las cepas sobreexpresantes se realizó mediante la inmunodetección del epítipo HA en homogenados celulares, para las cepas EhnSM1-HA, EhnSM2-HA y EhnSM3-HA en las cuales se observó la presencia de la proteína recombinante en todos los homogenados totales. Después del fraccionamiento celular esta misma proteína se encontró que se asocia principalmente a la fracción membranal. La estrategia de sobreexpresión de genes para el estudio de su función y localización se ha utilizado en diversos modelos (Mahon et al., 2003; Park et al., 2001, 2017; Shi et al., 2017). En *E. histolytica* mediante esta estrategia se han identificado ocho proteínas, que afectan la patogenicidad de este parásito (Meyer et al., 2016). De manera similar se encontró que la sobreexpresión de cisteín peptidasas confiere patogenicidad a un clon de *Entamoeba histolytica* no patógeno (Matthiesen et al., 2013).

Por otra parte, para las cepas silenciadas se retomaron las construcciones realizadas por Mendoza-Macías (2010) para el silenciamiento del gen *ehnsm3*, sin embargo, también se silenció en un 50% el gen *ehnsm2* debido a que presentan un 87% de homología entre estos genes y de esta manera se obtuvo la cepa G3-GS EhnSM2-3. El fundamento de este silenciamiento es epigenético, para la cual se empleó la cepa G3 de *E. histolytica* que está silenciada en el gen *eh-ap-a* del amebaporo (Bracha et al., 2003). En esta cepa es posible silenciar un gen adicional, como ha sido reportado para los genes *eh-cp5* y *ehlg1* (Bracha et al., 2006). La virulencia en la cepa G3 está parcialmente afectada, pero es posible evaluar el fenotipo de las amibas que tienen silenciado un gen adicional y así determinar la contribución de la molécula de interés. Hasta la fecha se sigue investigando el mecanismo exacto de silenciamiento de este sistema, sin embargo se ha descrito una modificación en la cromatina, debido a una dimetilación de histonas mediado por RNAi, producto de la secuencia promotora del gen *eh-ap-a* contenida en el plásmido y de 87 pb de la región 5' del elemento SINE1 localizado

inmediatamente río arriba del promotor del gen del amebaporo, ocurriendo entonces el silenciamiento tanto del transgen como del gen cromosómico, dicha modificación permanece en las generaciones de trofozoítos sucesivas cuando se ha perdido el plásmido (Bracha et al., 2006, 2003; Zhang et al., 2011; Foda and Singh, 2015).

La obtención de estas cepas transfectantes para el análisis de la función de cada una de las nSMasas de *E. histolytica* fueron herramientas sustanciales para el desarrollo del presente proyecto utilizadas en los diferentes análisis experimentales mediante la medición de su actividad enzimática, localización y efecto sobre la virulencia del parásito.

Una de las metodologías más utilizadas para la cuantificación de actividad de esfingomielinasa es mediante el sistema Amplex Red Sphingomyelinase Assay kit, método colorimétrico descrito y empleado en diferentes investigaciones (Petrache et al., 2005; Ramu et al., 2014; Robciuc et al., 2014). Se trata de un ensayo acoplado a enzimas, el cual es uno de los grandes inconvenientes que presenta esta metodología; la actividad de esfingomielinasa es monitoreada indirectamente por la 10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazina, mediante una cascada enzimática (Technologies, 2006) en la cual participan diferentes metabolitos los cuales podrían interferir con algunas de las condiciones a probar dentro del trabajo de investigación. Por lo anterior, en el presente proyecto se decidió utilizar un método directo que utiliza ^{14}C esfingomielina marcada como sustrato, la cual es hidrolizada por la nSMasa en ^{14}C fosfocolina, siendo ésta la que se extrae y se cuantifica (Vargas-villarreal et al., 2003). Por lo anterior, fue importante estandarizar el método de determinación de la actividad de nSMasa, utilizando una nSMasa comercial purificada de *Bacillus cereus*. Estos valores pueden reportarse como actividad específica ($\mu\text{moles de SMasa/mg de proteína/tiempo}$) (González-Salazar et al., 2013) o como porcentaje con respecto al control (%Control) (Katussevani et al., 2000). Se ajustaron las condiciones de pH, concentración de proteína, tiempo de incubación y efecto de cationes divalentes. La alta concentración de proteína y

los tiempos de incubación prolongados son una característica en común para la actividad de SMasa de varios parásitos (González-Salazar et al., 2013). El estímulo observado con Mn^{2+} es una característica de las nSMasas de *E. histolytica* (Mendoza-Macías et al., 2010).

Otros métodos basados en medición de metabolitos marcados ^{14}C utilizan un sistema de cromatografía en capa fina (TLC) mientras que el usado en el presente trabajo se basa en un sistema de ensayo de micela mixta (Wiegmann et al., 1994), presentando como principal ventaja, el manejo de residuos radiactivos en cantidades mínimas. La sensibilidad, la precisión y la simplicidad de las determinaciones enzimáticas mediante la metodología estandarizada hacen de esta una excelente alternativa para los análisis de medición de actividad de nSMasa en homogenados totales y fracciones celulares, tanto en condiciones basales como condiciones experimentales.

Existe una relación directa entre aumento y disminución de la actividad de nSMasa en cepas transfectantes, como resultado de la sobreexpresión y silenciamiento de los genes que codifican para las nSMasas de *E. histolytica*. Lo anterior en comparación con sus cepas control HM1-HA para las primeras y G3 con el plásmido vacío para las segundas, sugiriendo que las nSMasas exógenas etiquetadas con HA producidas por las transfectantes son activas.

El fraccionamiento de los compartimentos celulares facilita el análisis para resolver cualquier pregunta de investigación relacionada con proteínas (Rockstroh et al., 2011). Los resultados de la medición de actividad en fracciones celulares de la cepa HM1 muestran un aumento en la actividad de nSMasa en la fracción membranal, con respecto al homogenado total y a la fracción soluble. El aumento de actividad con respecto al homogenado total es debido al enriquecimiento de proteínas ocasionado por la centrifugación diferencial. Con respecto a la fracción soluble sugiere que las nSMasas se localizan en la membrana celular tal como se ha descrito bajo las mismas condiciones de fraccionamiento en *Plasmodium*

falciparum, incluso sugiere que el mecanismo de acción de estas enzimas sea muy similar entre ellos ya que en ambos casos la actividad de nSMasa se asocia a la membrana plasmática y es estimulada por Mn^{2+} (Hanada et al., 2000).

El papel de los esfingolípidos, en particular la ceramida, se relaciona con respuestas celulares al estrés, diferenciación celular y apoptosis en eucariotes incluyendo mamíferos y levaduras (Clarke and Hannun, 2006). Diversos inductores de estrés oxidativo, como el peróxido de hidrógeno, luz ultravioleta, radiación ionizante y choque térmico, se han reportado como activadores de SMasas, involucrando a estas enzimas en la traducción de señales vía la ceramida (Jana & Pahan, 2007; Castillo et al., 2007; Y. Hannun & Obeid, 2008). Los estudios sugieren que el papel de estas enzimas, está estrechamente relacionado con la regulación celular, desempeñando un papel crítico en las respuestas al estrés (Goldkorn et al., 1998) estableciéndose una clara conexión entre las nSMasas y el estrés oxidativo (Mansat-de Mas et al., 1999; Laurent and Jaffrézou, 2001).

Se ha reportado que una diferencia importante entre las amibas virulentas y las no virulentas es su capacidad de manejar el estrés oxidativo durante el proceso de invasión al huésped (Vicente et al., 2009; Padilla-Vaca and Anaya-Velázquez, 2010).

Por lo anterior se evaluó la participación de las nSMasas de *E. histolytica* en respuestas a estrés oxidativo inducido por H_2O_2 o choque térmico, tomando como referencia las cepas HM1-HA y EhnSM3-HA en base a los resultados de actividad de nSMasa y actividades biológicas (sección más adelante). La viabilidad celular fue mayor en trofozoítos de la cepa EhnSM3-HA en comparación con la cepa parental HM1-HA, sugiriendo la participación de la proteína EhnSM3 en la resistencia al estrés. Esta información complementa los datos previamente reportados en el grupo de trabajo (Mendoza Macías, 2010) que muestran que el silenciamiento de este gen disminuye la viabilidad celular de los trofozoítos

expuestos al H_2O_2 .

Estos resultados contrastan con lo reportado en la literatura donde se ha demostrado que agentes inductores de estrés oxidativo, activan diferencialmente a las SMasas de tipo ácido y neutro para producir ceramida e inducir apoptosis (Castillo et al., 2007; Jana and Pahan, 2007). Sin embargo podrían vincularse con resultados previos dentro del grupo de trabajo, donde se encontró que bajo las mismas condiciones de estrés, no existen células apoptóticas (Zárate García, 2011). Las diferencias entre el comportamiento de las nSMasas de *E. histolytica* y las células de mamífero en respuesta al estrés oxidativo sin duda están relacionadas estrechamente con la cantidad de sustrato presente en cada célula, por lo tanto es de interés investigar los niveles de esfingomiélin y ceramida intracelular en la amiba y de esta manera establecer un vínculo entre estos resultados, la actividad de estas enzimas y las respuestas biológicas que su actividad conlleva.

La actividad de la nSMasa2 de mamífero, es modulada por el estrés oxidativo. En presencia de humo de tabaco aumenta la actividad de esta enzima en células del epitelio bronquial humano (HBE1) (Filosto et al., 2010). Por lo anterior, se evaluó la actividad de nSMasa de los trofozoítos de la cepa HM1-HA y EhnSM3-HA expuestos al H_2O_2 .

Los trofozoítos de la cepa HM1-HA tratados con H_2O_2 , muestran un incremento de más de 5 veces por encima de los niveles de actividad en comparación con los trofozoítos sin tratamiento, resultados similares fueron obtenidos en el grupo de trabajo en la cepa G3 (Zárate García, 2011). Mientras que la cepa EhnSM3-HA, presenta niveles similares de actividad antes y después del tratamiento. Estos datos sugieren indirectamente, que las nSMasas están relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo, ya que por una parte la viabilidad celular disminuye conforme aumenta la concentración del agente oxidante, y por otra la actividad de la nSMasa aumenta en presencia de éste para la cepa HM1-HA mientras que para

la cepa EhnSM3-HA no cambia.

Lo anterior posiblemente es debido a que las amibas al estar en condiciones de estrés encienden un mecanismo de protección, incrementando su actividad con el objeto de abatir el estrés, por lo que en la cepa HM1-HA existe un incremento en los niveles de actividad. Por otro lado, la cepa EhnSM3-HA no muestra un incremento en su actividad por efecto del H_2O_2 , a pesar de presentar mayor viabilidad celular con respecto al control (datos previamente descritos) lo que sugiere que el gen *ehnsm3* extra que posee, le confiere una mayor resistencia ante el estrés ambiental, siendo innecesario que se encienda un mecanismo para abatir las condiciones desfavorables en las que el parásito se encuentra en presencia del H_2O_2 . Un mecanismo similar ha sido descrito en células de oligodendrocitos humanos, en las cuales se reportó una activación diferencial de nSMasas en respuesta al H_2O_2 , y en las cuales la inhibición por antisentido de estas nSMasas abatió el efecto inductor de la apoptosis por este tratamiento (Jana and Pahan, 2007).

Recientemente, se ha reportado que la expresión del gen para la nSMasa3 en el ser humano es regulado por daño al DNA y por el estrés no genotóxico (Corcoran et al., 2008). En el parásito *Giardia lamblia* se ha asociado la mayor expresión de los genes de SMasas durante el proceso de enquistamiento (Hernandez et al., 2008). En *Entamoeba invadens*, un patógeno de reptiles, en donde se ha estudiado el proceso de enquistamiento, también se ha reportado la participación de productos del metabolismo de esfingolípidos durante el proceso de diferenciación (Carbon et al., 2009). Por lo anterior, se evaluó la expresión de genes que codifican para las SMasas neutras en respuesta al peróxido de hidrógeno. En un trabajo previo del laboratorio se reportó la sobreexpresión a nivel de mRNA del gen *ehnsm3*, en respuesta al peróxido de hidrógeno, en trofozoítos de las cepas G3 y G3-GS EhnSM1, lo que sugiere que la sobreexpresión a nivel de mRNA del gen *ehnsm3* se presenta sólo en los trofozoítos que se encuentran en condiciones que comprometen su supervivencia, como situaciones extremas de

estrés oxidativo (Zárate García, 2011).

Con estos resultados se propone que la capacidad que mostraron los trofozoítos de *E. histolytica* de responder y adaptarse a estímulos externos es un determinante de la virulencia del parásito, el cual puede estar relacionado con la resistencia al H₂O₂ observada en las amibas transfectantes. El presente trabajo sugiere la participación de las nSMasas en el metabolismo de *E. histolytica*, en respuesta a estrés oxidativo, por lo tanto, su posible relación en la diferenciación celular (enquistamiento), proliferación o apoptosis.

Como se mencionó anteriormente, existen reportes acerca de SMasas de células epiteliales del tracto respiratorio humano, activadas por el estrés oxidativo; se sabe que esta actividad va acompañada de un incremento en el nivel de fosforilación de la enzima. La activación de estas enzimas se ha atribuido a una modificación postraduccional de la fosforilación llevada a cabo por las proteín cinasas p38 o PKC y la fosfatasa calcineurina, lo que indicaría un posible mecanismo de activación de las nSMasas (Filosto et al., 2010; Levy et al., 2009). Lo anterior, en conjunto con los análisis bioinformáticos que muestran que las nSMasas de *E. histolytica* poseen probables sitios de fosforilación, nos permite postular la posible participación del mecanismo de fosforilación en la regulación de las SMasas de la amiba. Para ello fue necesario determinar si las nSMasas de *E. histolytica* estaban o no fosforiladas, por lo que se llevaron a cabo ensayos para purificar proteínas fosforiladas así como realizar inmunodetecciones, a partir de homogenados totales de la cepa HM1-HA y de cada una de las tres cepas sobreexpresantes EhnSM1-HA, EhnSM2-HA y EhnSM3-HA. Los resultados muestran que tanto las proteínas nativas como las recombinantes, están fosforiladas. En el futuro, será relevante analizar si la actividad de nSMasa se ve o no afectada por la presencia de inhibidores de cinasas, las cuales en teoría evitarían la fosforilación de las nSMasas, y si su actividad es regulada por este proceso, esto se verá reflejado en una disminución en los niveles de actividad. De manera complementaria se podría analizar el efecto del estrés oxidativo sobre los

niveles de fosforilación, los cuales pueden modificarse por la presencia de agentes inductores de estrés (Filosto et al., 2010).

Para conocer a detalle cómo estas enzimas llevan a cabo su acción, es indispensable conocer a que nivel subcelular actúan. Se sabe que la actividad de las nSMasas puede presentarse en diferentes compartimentos celulares desde el retículo endoplasmático (Grammatikos et al., 2007) hasta en las membranas y el citoplasma (Levade and Jaffrézou, 1999). Se obtuvieron fracciones celulares de la cepa HM1 y se determinó la actividad en cada fracción. Los resultados muestran que aproximadamente el 90% de la actividad de nSMasa en *E. histolytica* se asocia a la fracción membranal. Mediante ensayos de fraccionamiento celular e inmunodetección de las cepas HM1-HA y las sobreexpresantes se encontró que estas proteínas están asociadas principalmente a la membrana plasmática, lo cual fue corroborado mediante técnicas de microscopía confocal para la cepa EhnSM3-HA.

Con esta información surge la pregunta sobre la interacción de estas enzimas con la esfingomielina que es su sustrato y que se localiza principalmente en la cara externa de la membrana plasmática. Las nSMasas de otros eucariotes poseen extensiones ya sea en el C- o N-terminal, y regiones predichas membranales, lo que localiza a estas proteínas en las membranas y promueve la catálisis interfacial. En contraste, las nSMasas bacterianas, carecen de regiones membranales y son proteínas secretadas (Openshaw et al., 2005). Ninguna de las secuencias amibianas predichas para las nSMasas poseen un motivo de interacción con la membrana plasmática. El análisis de la estructura cristalina de las nSMasas de *L. ivanovii* y *B. cereus*, las cuales son proteínas no membranales, reveló una región hidrofóbica tipo B-horquilla localizada en la región carboxilo terminal que sobresale hacia la parte soluble y que posee dos residuos aromáticos que son importantes en la interacción de estas enzimas con las membranas (Openshaw et al., 2005; Ago et al., 2006).

Del alineamiento de las secuencias a nivel de aminoácidos, así como del análisis de la predicción de la estructura terciaria de las nSMasas (Mendoza-Macías et al., 2010), esta región tipo B-horquilla está conservada en todas las nSMasas amibianas, sugiriendo un mecanismo similar de interacción potencial con la membrana plasmática. Sin embargo, es posible preguntarse cómo es que estas proteínas pueden ser transportada a la membrana si el análisis bioinformático de su superficie (datos no mostrados) revela que son proteínas extremadamente hidrofílicas. En el presente trabajo, se planteó la hipótesis de que este comportamiento podría ser realizado a través de un mecanismo de palmitoilación, alterándose el estado hidrofílico de las nSMasas proporcionando así la hidrofobicidad suficiente para que pudiesen anclarse a la membrana (Corvi et al., 2011). Este mecanismo ha sido descrito como responsable de regular la localización en membrana de la nSMasa2 de mamífero (Tani and Hannun, 2007). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la localización membranal de las nSMasas no se ve afectada por inhibidores de la palmitoilación, descartándose este mecanismo como regulador de su localización, dejando abierta la posibilidad de la participación de otros mecanismos de lipidación de proteínas u otro proceso independiente de modificaciones en sus propiedades hidrofílicas, como la fosforilación ya que se ha visto, por ejemplo, que el TNF-alfa induce la translocación de la una SMasa a la membrana plasmática en un mecanismo dependiente de MAPK (Clarke et al., 2007).

La virulencia de *E. histolytica* es un proceso multifactorial, en el que están involucrados factores tanto del hospedero como de la amiba. Entre los factores del parásito, se encuentran el amebaporo, las cisteín proteasas y las lectinas (Anaya-Velázquez and Padilla-Vaca, 2011); sin embargo no se descarta la participación de otras moléculas en este proceso. Algunas de estas moléculas candidatas son las esfingomielinasas (SMasas), las cuales podrían participar como factores de virulencia al igual que las SMasas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Leptospira interrogans* y *Listeria ivanovii* que producen daño a la membrana (Yamada, 1988; Projan et al., 1989; Segers et al., 1990; González-Zorn

et al., 1999), comportándose como determinantes de virulencia o participando en procesos del metabolismo del parásito como diferenciación o regulación del ciclo celular, al igual que en *Giardia lamblia*, *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma brucei* (Hanada et al., 2000; Hernandez et al., 2008; Young and Smith, 2010).

Con la finalidad de poder dilucidar la posible participación de las SMasas en la virulencia de *E. histolytica*, se realizaron ensayos *in vitro* que permitieran caracterizar fenotípicamente los trofozoítos transfectantes, evaluándose mecanismos relacionados con la virulencia del parásito, tales como su capacidad de lisar células MDCK y glóbulos rojos así como la destrucción de monocapas celulares.

La amiba es considerada como una de las células con mayor capacidad citotóxica en la naturaleza, numerosos experimentos *in vitro* han demostrado que *E. histolytica* produce moléculas que causan citólisis como son las fosfolipasas y amebaporos, por lo que su capacidad de lisar células es una de las principales diferencias entre las cepas virulentas y no virulentas de *E. histolytica* (Olivos-García et al., 2009; 2011). El presente trabajo muestra que la sobreexpresión o silenciamiento del gen *ehnsm3*, de manera indirecta, ocasiona un aumento o disminución respectivamente de la capacidad lítica sobre diferentes células, aunado a otros resultados del grupo de trabajo que muestran un aumento en la expresión de genes de los tres amebaporos, pero no de los genes que codifican para cisteín proteasa 5, adhesina 112 ni de las subunidades ligeras y pesadas de la lectina Gal/GalNAc. Estos resultados muestran una posible similitud en el comportamiento de la proteína Ehnsm3 con respecto a algunas nSMasas bacterianas como la β -toxina en *B. cereus* (Oda et al., 2012; Doll et al., 2013). Se plantean dos alternativas para la participación del gen *ehnsm3*, en el efecto lítico de *E. histolytica*, por una parte actúa mediante un mecanismo dependiente de contacto el cual es resultado de la sinergia entre la acción de los amebaporos y el efecto directo de la EhnSM3, o participa como un mediador en la inducción de la expresión de los genes del amebaporo.

No hay evidencia experimental previa en *E. histolytica* de la participación de nSMasas en la destrucción de monocapas celulares, sin embargo es bien sabido que las cisteín proteasas (Ankri et al., 1999), la lectina Gal/GalNAc (Ravdin et al., 1985) y la adhesina 112 (Hernández-Nava et al., 2017) participan en la actividad citopática de *E. histolytica*. En el grupo de trabajo se encontró que la expresión de aquellos genes no se ven afectados en ninguna de las cepas sobreexpresantes evaluadas en este trabajo. Sin embargo, sí existe un incremento del transcrito del amebaporo B en la cepa EhnSM2-HA, aparentemente el producto de este gen no es el responsable de la destrucción de la monocapa puesto que el mismo efecto citopático se observa en la cepa EhnSM1-HA en la cual el nivel de expresión del amebaporo no se ve afectado. Estos resultados, en conjunto con los obtenidos con las pruebas *in vitro*, sugieren que los genes *ehnsm1* y *ehnsm2* están más relacionados con efectos citopáticos y el gen *ehnsm3* con los efectos citotóxicos.

Los dominios ricos en esfingomielina denominados "rafts" pueden funcionar como sustrato para desencadenar diferentes vías de transducción de señales (Dobrowsky, 2000). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las nSMasas pueden ser moléculas responsables de la activación o desactivación de otras moléculas tales como los amebaporos, los cuales son responsables del daño a la célula huésped.

Aunque se desconoce exactamente cómo actúan o cómo se regulan las nSMasas de *E. histolytica*, se aportaron bases para comprender el mecanismo de acción. Por primera vez se establece que las nSMasas de este parásito están fosforiladas, y que de manera indirecta afectan la virulencia del parásito ya que responden a estímulos externos. Sin embargo, es necesario profundizar en el estudio de estas enzimas para entender el mecanismo exacto por el cual actúan y poder establecer una relación directa entre niveles de fosforilación, actividad enzimática, su respuesta al estrés y virulencia, y de esta manera describir la función específica de cada una de las tres proteínas dentro del parásito, las cuales aparentemente a pesar de ser de la misma familia actúan de manera diferencial.

8. CONCLUSIONES

- Se implementó un método para la medición de la actividad de esfingomielinasa neutra en *E. histolytica*.
- La sobreexpresión de los genes *ehnsm1*, *ehnsm2* y *ehnsm3* en la cepa HM1 de *E. histolytica* genera las proteínas etiquetadas correspondientes y un aumento en la actividad.
- El silenciamiento de los genes *ehnsm1*, *ehnsm2* y *ehnsm3* en la cepa G3, disminuye la expresión de los genes y la actividad total de las nSMasas.
- La viabilidad celular de la cepa EhnSM3-HA es mayor que la cepa control HM1, en presencia de choque térmico y peróxido de hidrógeno, el cual incrementa la actividad de nSMasa únicamente en la cepa control.
- Las proteínas EhnSM1, EhnSM2 y EhnSM3 se encuentran fosforiladas, y su asociación a la membrana no es mediada por palmitoilación.
- La EhnSM3 de *E. histolytica*, localizada en la membrana plasmática, participa en el daño de las células blanco como un factor de virulencia

9. PERSPECTIVAS

- Analizar el efecto del peróxido de hidrógeno en el nivel de fosforilación y, localización de las nSMasas.
- Cuantificar niveles de ceramida en las cepas transfectantes con respecto a la cepa parental.
- Estudiar el efecto sobre la actividad de nSMasa, localización y fosforilación del estrés oxidativo mediado por el choque térmico y radiación UV.
- Analizar otros probables mecanismos responsables de la localización
- membranal de las nSMasas como sitios de GPI, meristilación o prenilación.
- Analizar la participación de las nSMasas en la virulencia in vivo de *Entamoeba histolytica*.

10. REFERENCIAS

- Adagu, I.S., Nolder, D., Warhurst, D.C., Rossignol, J.-F.**, 2002. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 103–111. doi:10.1093/jac/49.1.103
- Ago, H., Oda, M., Takahashi, M., Tsuge, H., Ochi, S., Katunuma, N., Miyano, M., Sakurai, J.**, 2006. Structural basis of the sphingomyelin phosphodiesterase activity in neutral sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *J. Biol. Chem.* 281, 16157–16167. doi:10.1074/jbc.M601089200
- Ahn, K.-H., Kim, S.-K., Choi, J.-M., Jung, S.-Y., Won, J.-H., Back, M.-J., Fu, Z., Jang, J.-M., Ha, H.-C., Kim, D.-K.**, 2013. Identification of Heat Shock Protein 60 as a Regulator of Neutral Sphingomyelinase 2 and Its Role in Dopamine Uptake. *PLoS One* 8, e67216. doi:10.1371/journal.pone.0067216
- Aley, S.B., Scott, W. A, Cohn, Z. A**, 1980. Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 152, 391–404.
- Anaya-Velázquez, F., Martínez-Palomo, A., Tsutsumi, V., & González-Robles, A.** 1985. Intestinal invasive amebiasis: an experimental model in rodents using axenic or monoxenic strains of *Entamoeba histolytica*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 34(4), 723-730.
- Anaya-Velazquez, F., Padilla-Vaca, F.**, 1992. Effect of intestinal bacteria on the virulence of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 23, 183–185.
- Anaya-Velázquez, F., Padilla-Vaca, F.**, 2011. Virulence of *Entamoeba histolytica*: a challenge for human health research. *Future Microbiol.* 6, 255–258. doi:10.1111/j.1365-2761.2005.00643.x
- Ankri, S., Stolarsky, T., Bracha, R., Mirelman, D., Ankri, S., Stolarsky, T., Bracha, R., Padilla-Vaca, F., Mirelman, D.**, 1999. Antisense Inhibition of Expression of Cysteine Proteinases Affects *Entamoeba histolytica* -Induced Formation of Liver Abscess in Hamsters Antisense Inhibition of Expression of Cysteine Proteinases Affects *Entamoeba histolytica* -Induced Formation of Liver A 67, 421–423.
- Barrios-Ceballos, M.P., Martínez-Gallardo, N.A., Anaya-Velázquez, F., Mirelman, D., Padilla-Vaca, F.**, 2005. A novel protease from *Entamoeba histolytica* homologous to members of the family S28 of serine proteases. *Exp. Parasitol.* 110, 270–275. doi:10.1016/j.exppara.2005.02.022
- Bobak, D.A.**, 2006. Use of nitazoxanide for gastrointestinal tract infections: Treatment of protozoan parasitic infection and beyond. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 8, 91–95. doi:10.1007/s11908-006-0003-y
- Bracha, R., Mirelman, D.**, 1984. Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. *J. Exp. Med.* 160, 353–68. doi:10.1084/jem.160.2.353
- Bracha, R., Nuchamowitz, Y., Anbar, M., Mirelman, D.**, 2006. Transcriptional silencing of multiple genes in trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog.* 2, 431–441. doi:10.1371/journal.ppat.0020048
- Bracha, R., Nuchamowitz, Y., Mirelman, D.**, 2003. Transcriptional Silencing of an Amoebapore Gene in *Entamoeba histolytica*: Molecular Analysis and Effect on Pathogenicity Transcriptional Silencing of an Amoebapore Gene in *Entamoeba histolytica*: Molecular Analysis and Effect on Pathogenicity. *Eukaryot Cell* 2, 295–305. doi:10.1128/EC.2.2.295
- Bracha, R., Nuchamowitz, Y., Mirelman, D.**, 2002. Amoebapore is an important virulence factor of *Entamoeba histolytica*. *J. Biosci* 27, 579–587. doi:10.1007/BF02704851
- Bradford, M.M.**, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Braga, L.L., Ninomiya, H., McCoy, J.J., Eacker, S., Wiedmer, T., Pham, C., Wood, S., Sims, P.J., Petri, W. A.**, 1992. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* 90, 1131–1137. doi:10.1172/JCI115931
- Burda, P.C., Roelli, M.A., Schaffner, M., Khan, S.M., Janse, C.J., Heussler, V.T.**, 2015. A Plasmodium phospholipase is involved in disruption of the liver stage parasitophorous vacuole membrane. *PLoS Pathog.* 11, e1004760. doi:10.1371/journal.ppat.1004760
- Castillo, S.S., Levy, M., Thaikoottathil, J. V., Goldkorn, T.**, 2007. Reactive nitrogen and oxygen species activate different sphingomyelinases to induce apoptosis in airway epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 313, 2680–2686. doi:10.1016/j.yexcr.2007.04.002
- Cedillo-Rivera, R., Chayez, B., Gonzalez-Robles, A., Tapia, A., Yopez-Mulw, L.**, 2002. In Vitro Effect of Nitazoxanide Against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* Trophozoites. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49, 201–208.
- Cerbon, J., Olguin, T., Alvarez-Grave, P.R., López-Sánchez, R.C.**, 2009. *Entamoeba invadens*: Sphingolipids metabolic regulation is the main component of a PKC signaling pathway in controlling cell growth and proliferation. *Exp. Parasitol.* 122, 106–111. doi:10.1016/j.exppara.2009.02.011
- Chan, J.P., Brown, J., Hark, B., Nolan, A., Servello, D., Hrobuchak, H., Staab, T.A.**, 2017. Loss of sphingosine kinase alters life history traits and locomotor function in *Caenorhabditis elegans*. *Front. Genet.* 8, 1–16. doi:10.3389/fgene.2017.00132

- Charron, G., Wilson, J., Hang, H.C.**, 2009. Chemical tools for understanding protein lipidation in eukaryotes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 382–391. doi:10.1016/j.cbpa.2009.07.010
- Clarke, C.J., Hannun, Y. A.**, 2006. Neutral sphingomyelinases and nSMase2: Bridging the gaps. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1758, 1893–1901. doi:10.1016/j.bbmem.2006.06.025
- Clarke, C.J., Mediwala, K., Jenkins, R.W., Sutton, C.A., Tholanikunnel, B.G., Hannun, Y.A.**, 2011. Neutral sphingomyelinase-2 mediates growth arrest by retinoic acid through modulation of ribosomal S6 kinase. *J. Biol. Chem.* 286, 21565–21576. doi:10.1074/jbc.M110.193375
- Clarke, C.J., Truong, T.G., Hannun, Y. A.**, 2007. Role for neutral sphingomyelinase-2 in tumor necrosis factor ??-stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) in lung epithelial cells: p38 MAPK is an upstream regulator of nSMase2. *J. Biol. Chem.* 282, 1384–1396. doi:10.1074/jbc.M609216200
- Cone, R.A.**, 2009. Barrier properties of mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 75–85. doi:10.1016/j.addr.2008.09.008
- Corcoran, C. a, He, Q., Ponnusamy, S., Ogretmen, B., Huang, Y., Sheikh, M.S.**, 2008. Neutral sphingomyelinase-3 is a DNA damage and nongenotoxic stress-regulated gene that is deregulated in human malignancies. *Mol. Cancer Res.* 6, 795–807. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-2097
- Corvi, M., Berthiaume, L., de Napoli, M.**, 2011. Protein palmitoylation in protozoan parasites. *Front. Biosci.* 3, 1067–1079. doi:10.2741/211
- Degroote, S., Wolthoorn, J., Van Meer, G.**, 2004. The cell biology of glycosphingolipids. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 375–387. doi:10.1016/j.semcdb.2004.03.007
- Diamond, L.**, 1983. Lumen dwelling protozoa: Entamoeba, trichomonads and Giardia., *In vitro cultivation of protozoan parasites.* CRC Press,.
- Diamond, I.S., Clark, C.G.**, 1993. A Redescription of Entamoeba Histolytica Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) Separating It From Entamoeba Dispar Brumpt, 1925. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40, 340–344. doi:10.1111/j.1550-7408.1993.tb04926.x
- Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnick, C.C.**, 1978. A new medium for the axenic cultivation of entamoeba histolytica and other entamoeba. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 431–432. doi:10.1016/0035-9203(78)90144-X
- Dickson, R.C., Sumanasekera, C., Lester, R.L.**, 2006. Functions and metabolism of sphingolipids in Saccharomyces cerevisiae. *Prog. Lipid Res.* 45, 447–465. doi:10.1016/j.plipres.2006.03.004
- Dirección General de Epidemiología**, 2016. Veinte principales causas de enfermedad Nacional , por grupos de edad Estados Unidos Mexicanos 2016 Población General [WWW Document]. URL http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2016/principales/nacional/grupo_edad.pdf (accessed 3.17.18).
- Dobrowsky, R.T.**, 2000. Sphingolipid signalling domains. Floating on rafts or buried in caves? *Cell. Signal.* 12, 81–90. doi:10.1016/S0898-6568(99)00072-8
- Doll, V.M., Ehling-Schulz, M., Vogelmann, R.**, 2013. Concerted Action of Sphingomyelinase and Non-Hemolytic Enterotoxin in Pathogenic Bacillus cereus. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0061404
- Dotson, P.P., Karakashian, A.A., Nikolova-Karakashian, M.N.**, 2015. Neutral sphingomyelinase-2 is a redox sensitive enzyme: role of catalytic cysteine residues in regulation of enzymatic activity through changes in oligomeric state. *Biochem. J.* 465, 371–82. doi:10.1042/BJ20140665
- Eichinger, D.**, 2001. Encystation in parasitic protozoa. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 421–426. doi:10.1016/S1369-5274(00)00229-0
- Eller, M.S., Ostrom, K., Gilchrest, B.A.**, 1996. DNA damage enhances melanogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1087–92. doi:10.1073/pnas.93.3.1087
- Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A.**, 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: From molecules to disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 318–331. doi:10.1128/CMR.13.2.318-331.2000
- Faust, D.M., Guillen, N.**, 2012. Virulence and virulence factors in Entamoeba histolytica, the agent of human amoebiasis. *Microbes Infect.* 14, 1428–1441. doi:10.1016/j.micinf.2012.05.013
- Feig, L.A., Urano, T., Cantor, S.**, 1996. Evidence for a Ras/Ral signaling cascade. *Trends Biochem. Sci.* 21, 438–441. doi:10.1016/S0968-0004(96)10058-X
- Fernandes, M.C., Cortez, M., Flannery, A.R., Tam, C., Mortara, R. a, Andrews, N.W.**, 2011. Trypanosoma cruzi subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *J. Exp. Med.* 208, 909–921. doi:10.1084/jem.20102518
- Filosto, S., Ashfaq, M., Chung, S., Fry, W., Goldkorn, T.**, 2012. Neutral sphingomyelinase 2 activity and protein stability are modulated by phosphorylation of five conserved serines. *J. Biol. Chem.* 287, 514–522. doi:10.1074/jbc.M111.315481
- Filosto, S., Fry, W., Knowlton, A. a., Goldkorn, T.**, 2010. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) is a phosphoprotein regulated by calcineurin (PP2B). *J. Biol. Chem.* 285, 10213–10222. doi:10.1074/jbc.M109.069963

- Flores-Díaz, M., Monturiol-Gross, L., Naylor, C., Alape-Girón, A., Flieger, A., 2016. Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 597–628. doi:10.1128/MMBR.00082-15
- Foda, B.M., Singh, U., 2015. Dimethylated H3K27 is a repressive epigenetic histone mark in the protist *Entamoeba histolytica* and is significantly enriched in genes silenced via the RNAi pathway. *J. Biol. Chem.* 290, 21114–21130. doi:10.1074/jbc.M115.647263
- Frederick, J.R., Petri, W.A., 2005. Roles for the galactose-/N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba* in parasite virulence and differentiation. *Glycobiology* 15. doi:10.1093/glycob/cwj007
- Futerman, A.H., Hannun, Y.A., 2004. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* 5, 777–782. doi:10.1038/sj.embor.7400208
- Gandhi, B.M., Gupta, H., Irshad, M., Chawala, T.C., Tandon, B.N., 1986. Cell-mediated immunity in amoebic liver abscess. *J. Trop. Med. Hyg.* 89, 163–166.
- Ghosh, A.S., Dutta, S., Raha, S., 2010. Hydrogen peroxide-induced apoptosis-like cell death in *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Int.* 59, 166–172. doi:10.1016/j.parint.2010.01.001
- Goldkorn, T., Balaban, N., Shannon, M., Chea, V., Matsukuma, K., Gilchrist, D., Wang, H., Chan, C., 1998. H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 2, 3209–20.
- Gómez, J.C., Cortés, J.A., Cuervo, S.I., López, M.C., 2007. Amebiasis intestinal. *Asoc. Colomb. Infectología* 11, 36–45.
- González-Salazar, F., Garza-González, J.N., Hernandez-Luna, C.E., Mata-Cárdenas, B.D., Carranza-Rosales, P., Castro-Garza, J.E., Hernández-García, M.E., Vargas-Villarreal, J., 2013. Sphingomyelinase activity of trichomonas vaginalis extract and subfractions. *Biomed Res. Int.* 2013. doi:10.1155/2013/679365
- González-Vázquez, M.C., Carabarin-Lima, A., Baylon-Pacheco, L., Rasales-Encina, J.L., 2012. De amibas y amebiasis: *Entamoeba histolytica*. *Elementos* 87, 13–18.
- González-Zorn, B., Domínguez-Bernal, G., Suárez, M., Riplo, M.T., Vega, Y., Novella, S., Vázquez-Boland, J.A., 1999. The smcL gene of *Listeria ivanovii* encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. *Mol. Microbiol.* 33, 510–523. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01486.x
- González Ríos, J.A., 2011. Análisis de esfingomielinasas recombinantes de *E. histolytica* e implementación de un ensayo basado en un biosensor colorimétrico. Universidad de Guanajuato.
- Grammatikos, G., Teichgräber, V., Carpinteiro, A., Trarbach, T., Weller, M., Hengge, U.R., Gulbins, E., 2007. Overexpression of acid sphingomyelinase sensitizes glioma cells to chemotherapy. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 1449–1456. doi:10.1089/ars.2007.1673
- Grether-Beck, S., Bonizzi, G., Schmitt-Brenden, H., Felsner, I., Timmer, a, Sies, H., Johnson, J.P., Piette, J., Krutmann, J., 2000. Non-enzymatic triggering of the ceramide signalling cascade by solar UVA radiation. *EMBO J.* 19, 5793–5800. doi:10.1093/emboj/19.21.5793
- Guo, X., Barroso, L., Becker, S.M., Lyerly, D.M., Vedvick, T.S., Reed, S.G., Petri, W.A., Houpt, E.R., 2009. Protection against intestinal amebiasis by a recombinant vaccine is transferable by T cells and mediated by gamma interferon. *Infect. Immun.* 77, 3909–3918. doi:10.1128/IAI.00487-09
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2006. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1–14. doi:10.1042/bj2190001
- Hanada, K., Mitamura, T., Fukasawa, M., Magistrado, P.A., Nishijima, Horii, T., Nishijima, M., 2000. *Plasmodium falciparum*. *Science* (80-.). 677, 97–98.
- Hanada, K., Palacpac, N.M.Q., Magistrado, P. a, Kurokawa, K., Rai, G., Sakata, D., Hara, T., Horii, T., Nishijima, M., Mitamura, T., 2002. *Plasmodium falciparum* phospholipase C hydrolyzing sphingomyelin and lysocholinephospholipids is a possible target for malaria chemotherapy. *J. Exp. Med.* 195, 23–34. doi:10.1084/jem.20010724
- Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2011. Many ceramides. *J. Biol. Chem.* 286, 27855–27862. doi:10.1074/jbc.R111.254359
- Hannun, Y. a, Obeid, L.M., 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 139–150. doi:10.1038/nrm2329
- Haque, R., Huston, C.D., Hughes, M., Houpt, E., Petri Jr, W.A., 2003. Current concepts Amebiasis. *N. Engl. J. Med.* 46, 1565–1573.
- Hassan, H.M., Fridovich, I., 1979. Intracellular production of superoxide peroxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Biochem. Biophys.* 196, 385–395. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(79)90289-3
- Hernández-Nava, E., Cuellar, P., Nava, P., Chávez-Munguía, B., Schnoor, M., Orozco, E., Betanzos, A., 2017. Adherens junctions and desmosomes are damaged by *Entamoeba histolytica*: Participation of

- EhCPADH complex and EhCP112 protease. *Cell. Microbiol.* 19. doi:10.1111/cmi.12761
- Hernandez, Y., Shpak, M., Duarte, T.T., Mendez, T.L., Maldonado, R. a., Roychowdhury, S., Rodrigues, M.L., Das, S.**, 2008. Novel role of sphingolipid synthesis genes in regulating giardial encystation. *Infect. Immun.* 76, 2939–2949. doi:10.1128/IAI.00116-08
- Hunter, T.**, 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80, 225–236. doi:10.1016/0092-8674(95)90405-0
- Huseby, M., Shi, K., Kent Brown, C., Digre, J., Mengistu, F., Keun, S.S., Bohach, G.A., Schlievert, P.M., Ohlendorf, D.H., Earhart, C.A.**, 2007. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 8719–8726. doi:10.1128/JB.00741-07
- Ichi, I., Kamikawa, C., Nakagawa, T., Kobayashi, K., Kataoka, R., Nagata, E., Kitamura, Y., Nakazaki, C., Matsura, T., Kojo, S.**, 2009. Neutral sphingomyelinase-induced ceramide accumulation by oxidative stress during carbon tetrachloride intoxication. *Toxicology* 261, 33–40. doi:10.1016/j.tox.2009.04.040
- Jaffrezou, J.-P., Alain, P.B., Moisand, A., Levade, T., Laurent, G.**, 2001. Activation of a nuclear sphingomyelinase in radiation- induced apoptosis. *FASEB J.* 15, 123–133.
- Jana, A., Pahan, K.**, 2007. Oxidative stress kills human primary oligodendrocytes via neutral sphingomyelinase: Implications for multiple sclerosis. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2, 184–193. doi:10.1007/s11481-007-9066-2
- Jana, A., Pahan, K.**, 2004. Fibrillar amyloid-?? peptides kill human primary neurons via NADPH oxidase-mediated activation of neutral sphingomyelinase: Implications for Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 279, 51451–51459. doi:10.1074/jbc.M404635200
- Jenkins, R.W., Canals, D., Hannun, Y. A.**, 2009. Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell. Signal.* 21, 836–846. doi:10.1016/j.cellsig.2009.01.026
- Kalmar, B., Greensmith, L.**, 2009. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 310–318. doi:10.1016/j.addr.2009.02.003
- Katussevani, B., Krut, O., Wiegmann, K., Kreder, D., Micheli, M., Schäfer, R., Sickman, A., Schmidt, W.E., Schröder, J.M., Meyer, H.E., Sandhoff, K., Krönke, M.**, 2000. Purification and characterization of a magnesium-dependent neutral sphingomyelinase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 275, 7641–7647. doi:10.1074/jbc.275.11.7641
- Katzwinkel-Wladarsch, S., Loscher, T., Rinder, H.**, 1994. Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 115–118.
- Keene, W.E., Hidalgo, M.E., Orozco, E., McKerrow, J.H.**, 1990. *Entamoeba histolytica*: Correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. *Exp. Parasitol.* 71, 199–206. doi:10.1016/0014-4894(90)90022-5
- Kim, H.-J., Hwang, N.R., Lee, K.-J.**, 2007. Heat shock responses for understanding diseases of protein denaturation. *Mol. Cells* 23, 123–131.
- Komatsu, M., Y, T.T., Abe, T., Takahashi, I.**, 2001. Evidence for the association of ultraviolet-C and H₂O-induced apoptosis with acid sphingomyelinase activation 1533, 47–54.
- Kondo, T., Matsuda, T., Tashima, M., Umehara, H., Domae, N., Yokoyama, K., Uchiyama, T., Okazaki, T.**, 2000. Suppression of heat shock protein-70 by ceramide in heat shock-induced HL-60 cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 8872–8879. doi:10.1074/jbc.275.12.8872
- Laemmli, U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi:10.1038/227680a0
- Laughlin, R.C., MCGUGAN, G.C., POWELL, R.R., WELTER, B.H., TEMESVARI, L. A.**, 2004. Involvement of Raft-Like Plasma Membrane Domains of *Entamoeba histolytica* in Pinocytosis and Adhesion Involvement of Raft-Like Plasma Membrane Domains of *Entamoeba histolytica* in Pinocytosis and Adhesion 72, 5349–5357. doi:10.1128/IAI.72.9.5349
- Laughlin, R.C., Temesvari, L.A.**, 2005. Cellular and molecular mechanisms that underlie *Entamoeba histolytica* pathogenesis: Prospects for intervention. *Expert Rev. Mol. Med.* 7, 1–19. doi:10.1017/S1462399405009622
- Laurent, G., Jaffrézou, J.**, 2001. Signaling pathways activated by daunorubicin. *Blood J.* 98, 913–924. doi:10.1182/blood.V98.4.913
- Leippe, M., Andra, J., Muller-Eberhard, H.J.**, 1994. Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 2602–2606. doi:10.1073/pnas.91.7.2602
- Leippe, M., Tannich, E., Nickel, R., van der Goot, G., Pattus, F., Horstmann, R.D., Müller-Eberhard, H.J.**, 1992. Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *EMBO J.* 11, 3501–6.
- Levade, T., Jaffrézou, J.-P.**, 1999. Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why?11With the participation of Nathalie Andrieu-Abadie, Nathalie Augé, Bruno Ségui, Emmanuelle Uro-Coste, Robert

- Savlayre, INSERM Unit 466, Laboratoire de Biochimie, Maladies Métaboliques, Institut Loui. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1438, 1–17. doi:10.1016/S1388-1981(99)00038-4
- Levy, M., Khan, E., Careaga, M., Goldkorn, T.**, 2009. Neutral sphingomyelinase 2 is activated by cigarette smoke to augment ceramide-induced apoptosis in lung cell death., *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. doi:10.1152/ajplung.00031.2009
- Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U.C.M., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R.P., Mann, B.J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., Willhoeft, U., Bhattacharya, A., Chillingworth, T., Churcher, C., Hance, Z., Harris, B., Harris, D., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Squares, R., Whitehead, S., Quail, M. a, Rabbinowitsch, E., Norbertczak, H., Price, C., Wang, Z., Guillén, N., Gilchrist, C., Stroup, S.E., Bhattacharya, S., Lohia, A., Foster, P.G., Sicheritz-Ponten, T., Weber, C., Singh, U., Mukherjee, C., El-Sayed, N.M., Petri, W. a, Clark, C.G., Embley, T.M., Barrell, B., Fraser, C.M., Hall, N.**, 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433, 865–868. doi:10.1038/nature03291
- Lopez-Revilla, R., Said-Fernandez, S.**, 1980. Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: hemolytic activity of trophozoite homogenates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 209–212. doi:10.4269/ajtmh.1980.29.209
- Lorenzi, H.A., Puiu, D., Miller, J.R., Brinkac, L.M., Amedeo, P., Hall, N., Caler, E. V.**, 2010. New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4. doi:10.1371/journal.pntd.0000716
- Luaces, A.L., Barrett, A.J.**, 1988. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* 250, 903–9.
- Lushbaugh, W.B., Hofbauer, A.F., Pittman, F.E.**, 1985. *Entamoeba histolytica*: Purification of Cathepsin B. *Exp. Parasitol.* 59, 328–336.
- MacFarlane, R.C., Shah, P.H., Singh, U.**, 2005. Transcriptional profiling of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Int. J. Parasitol.* 35, 533–542. doi:10.1016/j.ijpara.2005.02.006
- Macfarlane, R.C., Singh, U.**, 2006. Identification of Differentially Expressed Genes in Virulent and Nonvirulent *Entamoeba* Species: Potential Implications for Amebic Pathogenesis Identification of Differentially Expressed Genes in Virulent and Nonvirulent *Entamoeba* Species: Potential Impl 74, 340–351. doi:10.1128/IAI.74.1.340
- MacFarlane, R.C., Singh, U.**, 2006. Identification of Differentially Expressed Genes in Virulent and Nonvirulent. *Infect. Immun.* 74, 340–351. doi:10.1128/IAI.74.1.340
- Magnoni, C., Euclidi, E., Benassi, L., Bertazzoni, G., Cossarizza, A., Seidenari, S., Giannetti, A.**, 2002. Ultraviolet B radiation induces activation of neutral and acidic sphingomyelinases and ceramide generation in cultured normal human keratinocytes. *Toxicol. Vitro.* 16, 349–355. doi:10.1016/S0887-2333(02)00024-3
- Mahon, F.X., Belloc, F., Lagarde, V., Chollet, C., Moreau-Gaudry, F., Reiffers, J., Goldman, J.M., Melo, J. V., Dc, W.**, 2003. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 101, 2368–2373. doi:10.1182/blood.V101.6.2368
- Mansat-de Mas, V., Bezombes, C., Quillet-Mary, a, Bettaïeb, a, D'orgeix, a D., Laurent, G., Jaffrézou, J.P.**, 1999. Implication of radical oxygen species in ceramide generation, c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis induced by daunorubicin. *Mol. Pharmacol.* 56, 867–874. doi:10.1124/mol.56.5.867
- Marchesini, N., Hannun, Y. A.**, 2004. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem. Cell Biol.* 82, 27–44. doi:10.1139/o03-091
- Marie, C., Petri, W.A.**, 2014. Regulation of Virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 493–520. doi:10.1146/annurev-micro-091313-103550
- Marshall, C.**, 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179–185. doi:10.1016/0092-8674(95)90401-8
- Martínez-Palomo, A.**, 1990. Amebiasis, in: Warren, K.S., Mahmoud, A.A.F. (Eds.), *Amebiasis*. McGraw-Hill, Inc., Mexico City, Mexico, p. 1990. doi:19910874759
- Martínez-Palomo, A.**, 1982. The Biology of *Entamoeba histolytica*., in: John Wiley) (Ed.), . *Research Studies Press* (John, Chichester, p. 858509.
- Martínez-Palomo, A., Espinosa Cantellano, M.**, 1998. Intestinal amoebae., in: D, C.F.K.J.W. (Ed.), *Intestinal Amoebae*. Topley & Wilson's *Microbiology and Microbial Infection*., London: Arnold, pp. 157–177.
- Matthiesen, J., Bär, A.K., Bartels, A.K., Marien, D., Ofori, S., Biller, L., Tannich, E., Lotter, H., Bruchhaus, I.**, 2013. Overexpression of specific cysteine peptidases confers pathogenicity to a nonpathogenic *Entamoeba histolytica* clone. *MBio* 4, 1–11. doi:10.1128/mBio.00072-13
- McLaughlin, J., Aley, S.**, 1985. The Biochemistry and Functional Morphology of the *Entamoeba*. *J. Protozool.* 32, 221–240.
- McLaughlin, J., Meerovitch, E.**, 1975. The surface membrane and cytoplasmic membranes of *Entamoeba*

- invadens (rodhain 1934)-I. Gross chemical and enzymatic properties. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* 52, 477–486. doi:10.1016/0305-0491(75)90222-9
- Mendez, T.L., De Chatterjee, A., Duarte, T., De Leon, J., Robles-Martinez, L., Das, S.,** 2015. Sphingolipids, Lipid Rafts, and Giardial Encystation: The Show Must Go On. *Curr. Trop. Med. Reports* 2, 136–143. doi:10.1007/s40475-015-0052-0
- Mendoza-Macías, C.L., Barrios-Ceballos, M.P., Anaya-Velázquez, F., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., Padilla-Vaca, F.,** 2010. Entamoeba histolytica: Molecular cloning and characterization of a novel neutral sphingomyelinase. *Exp. Parasitol.* 125, 279–285. doi:10.1016/j.exppara.2010.02.001
- Mendoza-Macías, C.L., Barrios-Ceballos, M.P., de la Peña, L.P.C., Rangel-Serrano, A., Anaya-Velázquez, F., Mirelman, D., Padilla-Vaca, F.,** 2009. Entamoeba histolytica: Effect on virulence, growth and gene expression in response to monoxenic culture with Escherichia coli O55. *Exp. Parasitol.* 121, 167–174. doi:10.1016/j.exppara.2008.10.011
- Mendoza Macías, C.L.,** 2010. Caracterización bioquímica y molecular de esfingomielinasas de Entamoeba histolytica. Universidad de Guanajuato.
- Meyer, M., Fehling, H., Matthiesen, J., Lorenzen, S., Schuldt, K., Bernin, H., Zaruba, M., Lender, C., Ernst, T., Itrich, H., Roeder, T., Tannich, E., Lotter, H., Bruchhaus, I.,** 2016. Overexpression of Differentially Expressed Genes Identified in Non-pathogenic and Pathogenic Entamoeba histolytica Clones Allow Identification of New Pathogenicity Factors Involved in Amoebic Liver Abscess Formation. *PLoS Pathog.* 12, 1–27. doi:10.1371/journal.ppat.1005853
- Mirelman, D.,** 1988. Ameba-Bacterial Relationship in Amebiasis. *Amebiasis. Human Infection by Entamoeba histolytica* 1988.
- Mittal, K., Welter, B.H., Temesvari L.A.,** 2008. Entamoeba histolytica: Lipid rafts are involved in adhesion of trophozoites to host extracellular matrix components. *Microscopy* 120, 127–134. doi:10.1016/j.exppara.2008.06.003. Entamoeba
- Moran, P., Rico, G., Ramiro, M., Olvera, H., Ramos, F., Gonzalez, E., Valadez, A., Curiel, O., Melendro, E.I., Ximenez, C.,** 2002. Defective production of reactive oxygen intermediates (ROI) in a patient with recurrent amoebic liver abscess. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67, 632–635.
- Mustelin, T., Abraham, R.T., Rudd, C.E., Alonso, A., Merlo, J.J.,** 2002. Protein tyrosine phosphorylation in T cell signaling. *Front Biosci* 7, 918–969. doi:10.2741/A821
- Nair, G., Rebolledo, M., Clinton White, A., Crannell, Z., Rebecca Richards-Kortum, R., Elizabeth Pinilla, A., Ramírez, J.D., Consuelo López, M., Castellanos-Gonzalez, A.,** 2015. Detection of entamoeba histolytica by recombinase polymerase amplification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93, 591–595. doi:10.4269/ajtmh.15-0276
- Oda, M., Hashimoto, M., Takahashi, M., Ohmae, Y., Seike, S., Kato, R., Fujita, A., Tsuge, H., Nagahama, M., Ochi, S., Sasahara, T., Hayashi, S., Hirai, Y., Sakurai, J.,** 2012. Role of sphingomyelinase in infectious diseases caused by Bacillus cereus. *PLoS One* 7, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0038054
- Ogretmen, B., Hannun, Y.A.,** 2004. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer* 4, 604–616. doi:10.1038/nrc1411
- Olivos-garcía, A., Saavedra, E., Nequiz, M.,** 2011. Amibiasis : mecanismos moleculares de la patogenicidad de Entamoeba histolytica. *Rev. Fac. Med. UNAM* 54, 10–19.
- Olivos-García, A., Saavedra, E., Ramos-Martínez, E., Nequiz, M., Pérez-Tamayo, R.,** 2009. Molecular nature of virulence in Entamoeba histolytica. *Infect. Genet. Evol.* 9, 1033–1037. doi:10.1016/j.meegid.2009.04.005
- Openshaw, A.E. a, Race, P.R., Monzó, H.J., Vázquez-Boland, J.A., Banfield, M.J.,** 2005. Crystal structure of SmcL, a bacterial neutral sphingomyelinase C from Listeria. *J. Biol. Chem.* 280, 35011–35017. doi:10.1074/jbc.M506800200
- Orozco, E., Gharaibeh, R., Riverón, A.M., Delgadillo, D.M., Mercado, M., Sánchez, T., Gómez Conde, E., Vargas, M.A., López-Revilla, R.,** 1997. A novel cytoplasmic structure containing DNA networks in Entamoeba histolytica trophozoites. *Mol. Gen. Genet.* 254(3), 250–257.
- Padilla-Vaca, F., Anaya-Velázquez, F.,** 2010. Insights into Entamoeba histolytica virulence modulation. *Infect. Disord. Drug Targets* 10, 242–250. doi:10.2174/187152610791591638
- Padilla-Vaca, F., Ancri, S., Bracha, R., Koole, L.A., Mirelman, D.,** 1999. Down regulation of entamoeba histolytica virulence by monoxenic cultivation with Escherichia coli O55 is related to a decrease in expression of the light (35-kilodalton) subunit of the Gal/GalNAc lectin. *Infect. Immun.* 67, 2096–2102.
- Park, J.M., Park, C.J., Lee, S.B., Ham, B.K., Shin, R., Paek, K.H.,** 2001. Overexpression of the tobacco Tsi1 gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell* 13, 1035–1046. doi:10.2307/3871362
- Park, S.K., Hong, J.Y., Arslan, F., Kanneganti, V., Patel, B., Tietsort, A., Tank, E.M.H., Li, X., Barmada, S.J., Liebman, S.W.,** 2017. Overexpression of the essential Sis1 chaperone reduces TDP-43 effects on toxicity and proteolysis. *PLoS Genet.* 13, 1–26. doi:10.1371/journal.pgen.1006805

- Patwardhan, G.A., Beverly, L.J., Siskind, L.J.**, 2016. Sphingolipids and mitochondrial apoptosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 48, 153–168. doi:10.1126/science.1249098. Sleep
- Petrache, I., Natarajan, V., Zhen, L., Medler, T.R., Richter, A.T., Cho, C., Hubbard, W.C., Berdyshev, E. V., Tudor, R.M.**, 2005. Ceramide upregulation causes pulmonary cell apoptosis and emphysema-like disease in mice. *Nat. Med.* 11, 491–498. doi:10.1038/nm1238
- Petri Jr, W.A.**, 2002. Pathogenesis of amebiasis. *Curr. Opin. Microbiol.* 443–447.
- Prasad, A.K., Das, S.R., Sagar, P.**, 1982. Haemolysis: An in vitro model to investigate tissue necrotic activity of *Entamoeba histolytica*. *Indian J. Exp. Biol.* 20, 721–725.
- Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., Moghazeh, S.L., Eisner, W., Novick, R.P.**, 1989. Nucleotide sequence: the beta-hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 17, 3305.
- Pruett, S.T., Bushnev, A., Hagedorn, K., Adiga, M., Haynes, C.A., Sullards, M.C., Liotta, D.C., Merrill, A.H.**, 2008. Biodiversity of sphingoid bases (“sphingosines”) and related amino alcohols. *J. Lipid Res.* 49, 1621–1639. doi:10.1194/jlr.R800012-JLR200
- Ralston, K.S., Petri, W. A.**, 2011. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol.* 27, 254–263. doi:10.1016/j.pt.2011.02.006
- Ralston, K.S., Soiga, M.D., Mackey-Lawrence, N.M., Somlata, Bhattacharya, Alok Petri Jr., W.A., Du, J., Zhong, X., Feng, S., Patel, D.J., Jacobsen, S.E., Angeles, L., Program, S.B., Angeles, L., Angeles, L., Angeles, L., Angeles, L.**, 2014. Trophocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion. *Nature* 21, 64–72. doi:10.1038/nsmb.2735.The
- Ramírez-Montiel, F.B.**, 2015. Caracterización de la actividad de esfingomielinasa ácida secretada por *Entamoeba histolytica*. Universidad de Guanajuato.
- Ramu, Y., Xu, Y., Shin, H.G., Lu, Z.**, 2014. Counteracting suppression of CFTR and voltage-gated K⁺ channels by a bacterial pathogenic factor with the natural product tannic acid. *Elife* 3, e03683. doi:10.7554/eLife.03683
- Ravdin, J.I., Guerrant, R.L.**, 1982. A Review of the Parasite Cellular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Amebiasis. *Rev. Infect. Dis.* 4, 1185–1207. doi:10.1093/clinids/4.6.1185
- Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Salata, R.A., Guerrant, R.L., Hewlett, E.L.**, 1985. N-acetyl-d-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. I. Partial purification and relation to amoebic virulence in vitro. *J. Infect. Dis.* 151, 804–815. doi:10.1093/infdis/151.5.804
- Robciuc, A., Rantañaki, A.H., Jauhiainen, M., Holopainen, J.M.**, 2014. Lipid-modifying enzymes in human tear fluid and corneal epithelial stress response. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 16–24. doi:10.1167/iovs.13-12577
- Rockstroh, M., Müller, S., Jende, C., Kerzhner, A., Von Bergen, M., Tamm, J.M.**, 2011. Cell fractionation - an important tool for compartment proteomics. *J. Integ. OMICS* 1, 135–143. doi:10.5584/jiomics.v1i1.52
- Rosenbaum, R.M., Wittner, M.**, 1970. Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to helical bodies. *J. Cell Biol.* 45, 367–382. doi:10.1083/jcb.45.2.367
- Rossignol, J.F., Ayoub, a, Ayers, M.S.**, 2001. Treatment of diarrhea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* or *E. dispar*: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *J. Infect. Dis.* 184, 381–384. doi:10.1086/322038
- Rotolo, J. a., Zhang, J., Donepudi, M., Lee, H., Fuks, Z., Kolesnick, R.**, 2005. Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 26425–26434. doi:10.1074/jbc.M414569200
- Said-Fernández, S., López-Revilla, R.**, 1982. Subcellular distribution and stability of the major hemolytic activity of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Parasitol. Res.* 67, 249–254. doi:10.1007/BF00927659
- Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Nakada-Tsukui, K., Leippe, M., Nozaki, T.**, 2004. Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 279, 49497–49507. doi:10.1074/jbc.M403987200
- Schemarova, I. V.**, 2006. The role of tyrosine phosphorylation in regulation of signal transduction pathways in unicellular eukaryotes. *Curr. Issues Mol. Biol.* 8, 27–49.
- Schieven, G.L., Kirihara, J.M., Gilliland, L.K., Uckun, F.M., Ledbetter, J. A.**, 1993. Ultraviolet radiation rapidly induces tyrosine phosphorylation and calcium signaling in lymphocytes. *Mol. Biol. Cell* 4, 523–530.
- Segers, R.P. a M., Van Der Drift, a., De Nijs, a., Corcione, P., Van Der Zeijst, B. a M., Gaastra, W.**, 1990. Molecular analysis of a sphingomyelinase C gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Infect. Immun.* 58, 2177–2185.
- Sepúlveda, B., Treviño-García Manzo**, 1986. Clinical manifestations and diagnosis of amebiasis. Elsevier, Amsterdam.
- Shah, P.H., MacFarlane, R.C., Bhattacharya, D., Matese, J.C., Demeter, J., Stroup, S.E., Singh, U.**, 2005. Comparative genomic hybridizations of *Entamoeba* strains reveal unique genetic fingerprints that

- correlate with virulence. *Eukaryot. Cell* 4, 504–515. doi:10.1128/EC.4.3.504-515.2005
- Shamseddine, A.A., Airola, M. V., Hannun, Y.A.**, 2015. Roles and regulation of neutral sphingomyelinase-2 in cellular and pathological processes. *Adv. Biol. Regul.* 57, 24–41. doi:10.1016/j.jbior.2014.10.002
- Shi, Y., Jiang, X., Zhang, L., Pu, H., Hu, X., Zhang, W., Cai, W., Gao, Y., Leak, R.K., Keep, R.F., Bennett, M.V.L., Chen, J.**, 2017. Endothelium-targeted overexpression of heat shock protein 27 ameliorates blood–brain barrier disruption after ischemic brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E1243–E1252. doi:10.1073/pnas.1621174114
- Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M.C., Flannery, A., He, X., Schuchman, E., Tabas, I., Andrews, N.W.**, 2010. Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *J. Cell Biol.* 189, 1027–1038. doi:10.1083/jcb.201003053
- Tani, M., Hannun, Y. A.**, 2007. Neutral sphingomyelinase 2 is palmitoylated on multiple cysteine residues: Role of palmitoylation in subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 282, 10047–10056. doi:10.1074/jbc.M611249200
- Tanyuksel, M., Jr, W. a P., Petri, W. A.**, 2003. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 1–18. doi:10.1128/CMR.16.4.713
- Technologies, M.P.I. detection**, 2006. Amplex® Red Sphingomyelinase Assay Kit.
- Törnquist, K., Malm, A. M., Pasternack, M., Kronqvist, R., Björklund, S., Tuominen, R., Slotte, J.P.**, 1999. Tumor necrosis factor- α , sphingomyelinase, and ceramide inhibit store-operated calcium entry in thyroid FRTL-5 cells. *J. Biol. Chem.* 274, 9370–7.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.**, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350–4354. doi:10.1073/pnas.76.9.4350
- Turkeltaub, J. A., McCarty III, T. R., & Hotez, P. J.** 2015. The intestinal protozoa: emerging impact on global health and development. *Current opinion in gastroenterology*, 31(1), 38-44.
- Vargas-Villarreal, J.**, 1985. CARACTERIZACION DE LA PRINCIPAL ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA DE ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Vargas-Villarreal, J., Mata-Cárdenas, B. D., Deslauriers, M., Quinn, F. D., Castro-Garza, J., Martínez-Rodríguez, H. G., & Said-Fernández, S.**, 2003. Identification of acidic, alkaline, and neutral sphingomyelinase activities in *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Cardiovasc Pathol*; 9(6), 225-230
- Vargas-villarreal, J., Mata-cárdenas, B.D., Deslauriers, M., Quinn, F.D., Castro-garza, J., Martínez-rodríguez, H.G., Said-fernández, S., Investigación, C. De, Mexicano, I., Biología, D. De**, 2003. Authors' Contribution: 9.
- Vargas-Villarreal, J., Palacios-Corona, R., Hernández-Luna, C., Mata-Cárdenas, B.D., Torres de la Cruz, V.M., Cortés-Gutiérrez, E.I., González-Salazar, F., Garza-González, J.N., Escobedo-Guajardo, B.L., Said-Fernández, S.**, 2010. Entamoeba histolytica: Soluble and membrane-associated neutral sphingomyelinase-C and other unidentified esterase activity. *Exp. Parasitol.* 125, 394–399. doi:10.1016/j.exppara.2010.03.010
- Variyam, E.P.**, 2007. Luminal host-defense mechanisms against invasive amebiasis. *Trends Parasitol.* 23, 108–111. doi:10.1016/j.pt.2007.01.006
- Verghese, J., Abrams, J., Wang, Y., Morano, K.A.**, 2012. Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 115–158. doi:10.1128/MMBR.05018-11
- Verkerke, H.P., Petri Jr., W.A., Marie, C.S.**, 2012. The Dynamic Interdependence of Amebiasis, Innate Immunity and Undernutrition. *Semin. Immunopathol.* 34, 771–785. doi:10.1007/s00281-012-0349-1
- Vicente, J.B., Ehrenkauf, G.M., Saraiva, L.M., Teixeira, M., Upinder, S.**, 2009. Entamoeba histolytica modulates a complex repertoire of novel genes in response to oxidative and nitrosative stress: implications for amebic pathogenesis. *Cell Microbiol.* 25, 713–724. doi:10.1097/MCA.000000000000178
- Vines, R.R., Ramakrishnan, G., Rogers, J.B., Lockhart, L.A., Mann, B.J., Petri, W.A.**, 1998. Regulation of adherence and virulence by the Entamoeba histolytica lectin cytoplasmic domain, which contains a beta2 integrin motif. *Mol. Biol. Cell* 9, 2069–2079.
- Walev, I., Weller, U., Strauch, S., Foster, T., Bhakdi, S., Walev, I., Weller, U., Strauch, S., Foster, T.**, 1996. Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. Selective Killing of Human Monocytes and Cytokine Release Provoked by Sphingomyelinase (Beta-Toxin) of *Staphylococcus aureus* 64, 2974–2979.
- Walker, D.M., Oghumu, S., Gupta, G., McGwire, B.S., Drew, M.E., Satoskar, A.R.**, 2013. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 1245–1263. doi:10.1007/s00018-013-1491-1
- Wiegmann, K., Schütze, S., Machleidt, T., Witte, D., Krönke, M.**, 1994. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 78, 1005–1015. doi:10.1016/0092-

8674(94)90275-5

- World Health Organization**, 1997. The World Health Report 1997--conquering suffering, enriching humanity., World health forum. doi:10.1590/S1020-49891997001200018
- Wu, J., Nilsson, A., Jönsson, B. a G., Stenstad, H., Agace, W., Cheng, Y., Duan, R.-D.**, 2006. Intestinal alkaline sphingomyelinase hydrolyses and inactivates platelet-activating factor by a phospholipase C activity. *Biochem. J.* 394, 299–308. doi:10.1042/BJ20051121
- Yabu, T., Shiba, H., Shibasaki, Y., Nakanishi, T., Imamura, S., Touhata, K., Yamashita, M.**, 2015. Stress-induced ceramide generation and apoptosis via the phosphorylation and activation of nSMase1 by JNK signaling. *Cell Death Differ.* 22, 258–273. doi:10.1038/cdd.2014.128
- Yamada, A.**, 1988. Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for sphingomyelinase of *Bacillus cereus*. *Eur. J. Biochem.* FEBS 175, 213–220.
- Young, S. a., Smith, T.K.**, 2010. The essential neutral sphingomyelinase is involved in the trafficking of the variant surface glycoprotein in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* 76, 1461–1482. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07151.x
- Zárate García, C.**, 2011. Análisis de la relación entre las esfingomielinasas, el estrés oxidativo y el proceso apoptótico en *Entamoeba histolytica*. Universidad de Guanajuato.
- Zeidan, Y.H., Hannun, Y. A.**, 2007. Activation of acid sphingomyelinase by protein kinase C γ -mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 282, 11549–11561. doi:10.1074/jbc.M609424200
- Zeidan, Y.H., Wu, B.X., Jenkins, R.W., Obeid, L.M., Hannun, Y. A.**, 2008. A novel role for protein kinase C δ -mediated phosphorylation of acid sphingomyelinase in UV light-induced mitochondrial injury. *FASEB J.* 22, 183–193. doi:10.1096/fj.07-8967com
- Zhang, H., Alramini, H., Tran, V., Singh, U.**, 2011. Nucleus-localized antisense small RNAs with 5'-polyphosphate termini regulate long term transcriptional gene silencing in *Entamoeba histolytica* G3 strain. *J. Biol. Chem.* 286, 44467–44479. doi:10.1074/jbc.M111.278184
- Zhang, O., Wilson, M.C., Xu, W., Hsu, F.F., Turk, J., Kuhlmann, F.M., Wang, Y., Soong, L., Key, P., Beverley, S.M., Zhang, K.**, 2009. Degradation of host sphingomyelin is essential for *Leishmania* virulence. *PLoS Pathog.* 5. doi:10.1371/journal.ppat.1000692
- Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., Kelly, S., Allegood, J.C., Liu, Y., Peng, Q., Ramaraju, H., Sullards, M.C., Cabot, M., Merrill, A.H.**, 2006. Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: Lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1758, 1864–1884. doi:10.1016/j.bbamem.2006.08.009