

# UACM

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

---

*Nada humano me es ajeno*

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Inducción de daño al ADN y evaluación de la expresión génica  
de la maquinaria de reparación por escisión de bases (BER)  
cuando se somete a estrés oxidativo a *Entamoeba histolytica***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO  
EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

**DAVID HERNÁNDEZ ÁLVAREZ**

Directora de tesis

**Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga**

Ciudad de México, marzo de 2016.

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

UACM3 TDY365

## COMITÉ TUTORAL

### DIRECTORA

*Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga*

Profesora Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

### CO-DIRECTORA

*Dra. Abigail Betanzos Fernández*

Catedrática CONACyT. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular  
Centro de Investigación y de Estudios avanzados del IPN

### ASESORES

*Dr. José de Jesús Olivares*

Profesor Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

*Dr. Mario Cesar López Camarillo*

Profesor Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

*Dra. Itzel López Rosas*

Catedrática CONACyT  
Colegio de post-graduados Campus Campeche

## LECTORES DE TESIS

*Dr. José de Jesús Olivares*

Profesor Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

*Dr. Mario Cesar López Camarillo*

Profesor Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

*Dr. Armando Luna López*

Investigador. Instituto Nacional de Geriátría

*Dr. Luis Gabriel Bricba de Castro*

Investigador. Langebio

Cinvestav-IPN

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM, así mismo contó con el valioso apoyo de la Dra. Abigail Betanzos Fernández del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN.

Agradezco a CONACYT por la beca (No. de registro 486203) otorgada para realizar mis estudios de Maestría.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto número 222956 de la convocatoria de Ciencia Básica y del Proyecto UACM-SECITI número PI2011-57R/SECITI060/2013.

A la **Dra. Elisa** por su compromiso en mi formación académica desde el primer día en que llegue a su laboratorio, por su paciencia, sus consejos y sobre todo por alterar mi “zona de confort” al que estaba acostumbrado, lo cual ha fomentado en mí el gran interés por la ciencia y tener mayores expectativas en el ámbito académico.

A la **Dra. Abigail** por su disposición en todo momento, por sus grandes aportaciones y por todas las atenciones prestadas para la culminación de este trabajo.

A la **Dra. Esther Orozco** modelo a seguir, por permitirme laborar en su grupo de investigación y por su disposición para la realización de este proyecto.

Al **Dr. Armando Luna** por sus asesorías en este trabajo, sus acertados comentarios y valiosas enseñanzas.

Al **Dr. Luis Briebe** por su apoyo académico, por su gran experiencia y por sus atinados comentarios que han servido para la realización de la presente investigación.

A la **Dra. Itzel López** por todo su apoyo, su tiempo y sus comentarios que han enriquecido este trabajo.

Al **M. en C. Helios Cárdenas** por su paciencia, por el tiempo de trabajo compartido, por todas esas horas de debate y por transmitirme su experiencia.

Al **Dr. Francisco Rendón** por estar siempre dispuesto a brindarme su apoyo tanto en el ámbito académico como en el personal y por todas esas horas de trabajo que fueron más amenas y divertidas con su compañía.

A la **Dra. Guillermina** por el apoyo, sus comentarios y el tiempo que me brindó para la realización de este trabajo.

Al **M. en C. Eduardo Carrillo** por su apoyo en los experimentos de microscopía confocal.

Al **M. en C. Alí Fores** por su apoyo en los experimentos de qPCR.

Y a todos mis amigos **Vanessa, Edgar, Mariana, Francisco, Ricardo, Nayelli, Hugo, Montse, Cecy, Kenji, Brenda, Olga, Rubí, Jonathan, Alma, Wendy, Isaac, Raúl, Edén, Gil, Dan y Carlos** que con su compañía hicieron menos largas las horas de trabajo.

## **DEDICATORIA**

*A mi esposa **Graciela Gavía** por alentarme a seguir construyendo nuestros sueños. Te amo y agradezco el apoyo que me has brindado durante estos 15 años.*

*A mi hijo **David Hernández** por ser la base de todos esos sueños. Te amo, eres mi orgullo y la razón para seguir adelante.*

*A mi padre **Francisco Hernández** sinónimo de sabiduría, honestidad y humanidad. Gracias por enseñarme a jugar "El juego de la vida".*

*A mi madre **Ma. Esther Álvarez** por su fortaleza y por infundir en mí que todo se consigue a base de esfuerzo. Gracias mamá por tu apoyo.*

*A mis suegros **Guillermo y Graciela** por enseñarme a dar todo sin condiciones, gracias por todo su apoyo.*

*A mis hermanos **Alejandra, Omar y Willy** por todos esos momentos de alegría, los quiero mucho.*

<b>Índice</b>	Pág.
<b>Abreviaturas</b>	i
<b>Índice de Figuras</b>	ii
<b>Índice de Tablas</b>	iv
<b>Resumen</b>	v
<b>Abstract</b>	vi
<b>I. Introducción</b>	
1. Generalidades de <i>Entamoeba histolytica</i>	1
1.1. Epidemiología	1
1.2. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	1
1.3. Mecanismos patogénicos de <i>E. histolytica</i> y mecanismos de defensa del huésped	4
1.4. Genoma de <i>E. histolytica</i>	7
2. Estrés oxidativo y mecanismos de reparación del ADN	9
2.1. Oxígeno	9
2.2. ERO y radicales libres	10
2.3. Estrés oxidativo, sistema de defensa antioxidante y daño al ADN	11
2.4. Mecanismos de reparación del ADN	14
2.5. Mecanismo de Reparación por Escisión de Bases (BER)	18
2.5.1. Proteínas que participan en la vía BER	19
3. Antecedentes particulares del proyecto	27
<b>II. Justificación</b>	30
<b>III. Hipótesis y objetivos</b>	31

1. Hipótesis	31
2. Objetivos	31
2.1. Objetivo General	31
2.2. Objetivos Particulares	31
<b>IV. Estrategia experimental</b>	
1. Cultivo in-vitro de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	32
2. Grupos Experimentales	33
3. Cinética de viabilidad y crecimiento de trofozoítos	33
4. Identificación del aducto 8-OhdG	34
5. Búsquedas de sus ortólogos de la vía BER en <i>H. sapiens</i> , <i>S. cerevisiae</i> y otras especies	35
6. Extracción del ADN genómico	36
7. Extracción y purificación de ARN	36
8. Análisis de la expresión génica del Mecanismo de Reparación por Escisión de Bases mediante RT-PCR	37
9. Evaluación de la expresión génica de EhDNALigI y EhPCNA mediante qRT-PCR	42
10. Localización de la EhDNALigI y EhPCNA por Microscopía Confocal	43
<b>V. Resultados</b>	
1. Resistencia de trofozoítos al tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	45
2. Cinética de crecimiento celular	46
3. Cinética de crecimiento post-tratamiento 2.5 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	48
4. Identificación del aducto 8-OHdG por medio de Avidina-FITC	49
5. Formación del aducto 8-OHdG mediante UV	50

6. Formación del aducto 8-OHdG por el tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	51
7. Análisis <i>in-silico</i> de proteínas de la vía BER en <i>E. histolytica</i>	55
8. Dominios estructurales de proteínas de la vía BER	58
9. Comparación de los Dominios estructurales de las proteínas EhMutY, EhNth-like y EhNth de <i>E. histolytica</i> y de Nth de <i>H. sapiens</i>	58
10. Comparación de los Dominios estructurales de las proteínas EhApex y EhFen1 de <i>E. histolytica</i> contra los dominios de Apex y Fen1 de <i>H. sapiens</i>	60
11. Evaluación de la expresión relativa de los ARNm de genes que participan en la vía BER	62
12. Cambios de localización de EhDNALigI y EhPCNA después del tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	68
<b>VI. Discusión</b>	73
<b>VII. Conclusiones</b>	82
<b>VIII. Perspectivas</b>	83
<b>IX. Bibliografía</b>	84

## Abreviaturas

Gal/GalNac	N-acetil-galactosamina
Gal	Galactosa
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
ERN	Especies Reactivas de Nitrógeno
SOD	Superóxido dismutasa
$2O_2^-$	Anión superóxido
$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno
$OH^\cdot$	Radical hidroxilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
SSB	Rompimiento de cadena sencilla
DSB	Rompimiento de doble cadena
8-OHdG	8-hidroxidesoxiguanosina
8-oxodG	8-oxodesoxiguanosina
NHEJ	Reparación por recombinación no homóloga
HR	Reparación por recombinación homóloga
NER	Reparación por Escisión de Nucleótidos
BER	Reparación por Escisión de Bases
AP	Apurínico o Apirimídico
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
UDG	Uracilo ADN glicosilasa
HhH	Hélice-horquilla-hélice

<b>Índice de Figuras</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .	3
<b>Figura 2.</b> Factores de virulencia <i>E. histolytica</i> .	7
<b>Figura 3.</b> Flavoproteína A y rubreritina.	8
<b>Figura 4.</b> Productos de algunas enzimas con función antioxidante.	11
<b>Figura 5.</b> Lesiones en el ADN causadas por ERO.	13
<b>Figura 6.</b> Respuesta al daño en el ADN.	15
<b>Figura 7.</b> Esquema del mecanismo de reparación BER.	19
<b>Figura 8.</b> Esquema de dominios funcionales y estructura terciaria de la proteína OGG de <i>H. sapiens</i> .	21
<b>Figura 9.</b> Esquema de los dominios funcionales y estructura terciaria de la proteína APEX1 de <i>H. sapiens</i> .	22
<b>Figura 10.</b> Esquema de los dominios funcionales de FEN1 de <i>H. sapiens</i> .	22
<b>Figura 11.</b> Esquema de la estructura tridimensional de PCNA.	23
<b>Figura 12.</b> ADN ligasas presentes en organismos eucariontes.	26
<b>Figura 13.</b> Determinación de la actividad de EhDNALigI de <i>E. histolytica</i> .	28
<b>Figura 14.</b> Estructura tridimensional de EhPCNA e incremento en la actividad de ligación de EhDNALigI por EhPCNA.	29
<b>Figura 15.</b> Esquema del diseño experimental.	32
<b>Figura 16.</b> Condiciones de síntesis de cADN.	39
<b>Figura 17.</b> Condiciones de amplificación por PCR de los genes de la vía BER.	40
<b>Figura 18.</b> Ensayo de viabilidad de trofozoítos tratados C, Cys- y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	46
<b>Figura 19.</b> Crecimiento celular de trofozoítos post-tratamiento y con 24 h de recuperación.	47

<b>Figura 20.</b> Cinética de crecimiento de trofozoítos post-tratamiento 2.5 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durante 1h.	49
<b>Figura 21.</b> Identificación del aducto 8-OHdG mediante Avidina-FITC en trofozoítos irradiados con UV.	51
<b>Figura 22.</b> Identificación del aducto 8-OHdG mediante Avidina-FITC producido en trofozoítos tratados con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	52
<b>Figura 23.</b> Identificación del aducto 8-OHdG mediante Avidina-FITC en trofozoítos tratados con 2.5 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y observados a diferentes horas de recuperación.	54
<b>Figura 24.</b> Representación esquemática de los dominios estructurales de las glicosilasas de <i>E. histolytica</i> y de <i>H. sapiens</i> .	60
<b>Figura 25.</b> Representación esquemática de los dominios estructurales de las proteínas EhApex de <i>E. histolytica</i> y de APEX de <i>H. sapiens</i> .	61
<b>Figura 26.</b> Representación esquemática de los dominios estructurales de las proteínas Fen1 de <i>E. histolytica</i> y de <i>H. sapiens</i> .	62
<b>Figura 27.</b> Amplificación de genes de la vía BER a partir de ADNg.	63
<b>Figura 28.</b> Expresión génica de la vía BER en condición basal de cultivo.	64
<b>Figura 29.</b> Cambios en la expresión relativa de genes de la vía BER en trofozoítos.	66
<b>Figura 30.</b> Cambios de expresión relativa mediante qRT-PCR.	68
<b>Figura 31.</b> Localización de EhDNALigI y EhPCNA después del tratamiento con 2.5 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	70
<b>Figura 32.</b> Localización de EhDNALigI y EhPCNA de <i>E. histolytica</i> después del tratamiento con 2.5 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y tiempos de recuperación (1, 3, 6 y 24h).	72

<b>Índice de Tablas</b>	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Principales funciones de las proteínas secretadas/excretadas por los trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	4
<b>Tabla 2.</b> Especies reactivas de oxígeno (ERO)	9
<b>Tabla 3.</b> Proteínas involucradas en los mecanismos de reparación del ADN en eucariontes	17
<b>Tabla 4.</b> ADN glicosilasas de mamíferos	20
<b>Tabla 5.</b> Mezclas y condiciones para la obtención de cADN	40
<b>Tabla 6.</b> Mezcla de reacción PCR	41
<b>Tabla 7.</b> Secuencias de oligonucleótidos, temperaturas de anillamiento, ciclos de amplificación y amplicones para los genes de la vía BER	43
<b>Tabla 8.</b> Secuencias de oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento para la amplificación de <i>ebdnaligI</i> y <i>ebpcna</i>	44
<b>Tabla 9.</b> Proteínas de la vía BER en <i>E. histolytica</i>	57

## Resumen

Durante la invasión a su hospedero *E. histolytica* está expuesta a especies reactivas de oxígeno (ERO) provenientes del sistema inmunológico del huésped. Cuando estas ERO sobrepasan el sistema de defensa antioxidante de este parásito, su estabilidad genómica puede verse comprometida, siendo uno de los principales daños las modificaciones de bases nitrogenadas, las cuales pueden ser reparadas por la vía de Reparación por Escisión de Bases (BER). En el genoma de *E. histolytica* existen genes que codifican para enzimas que participan en la vía de reparación BER. Sin embargo, hasta la fecha sólo se han caracterizado las proteínas EhDNALigI y EhPCNA, las cuales participan en dicha vía. En este trabajo, se evaluó la viabilidad y la capacidad de crecimiento de *E. histolytica* a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posteriormente, se evaluó el daño al ADN a través de la formación del aducto 8-OHdG en respuesta al tratamiento con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Así mismo, se analizaron los niveles de expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la reparación del ADN por la vía BER en condiciones basales y en respuesta al tratamiento con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De igual forma, se determinó la localización de EhDNALigI y EhPCNA mediante microscopía confocal. Se observó que *E. histolytica* expresa los genes de la vía BER en condiciones basales de cultivo, que el tratamiento con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la formación del aducto 8-OHdG y los genes *ehdnaligI* y *ehpcna* modifican su expresión en respuesta al daño inducido al ADN con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalmente, se observó la re-localización de las proteínas EhDNALigI y EhPCNA en el núcleo de trofozoítos de *E. histolytica* en respuesta al tratamiento. Se puede concluir que *E. histolytica* expresa genes que codifican para proteínas involucradas en la vía de reparación BER los cuales le permitirían al parásito reparar daños al ADN cuando es expuesto a ERO. Es interesante que los genes *ehdnaligI* y *ehpcna* aumenten su expresión en respuesta al daño inducido por el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y que las proteínas codificadas por estos genes se relocalicen y co-localicen en regiones tipo *focis*, sugiriendo su participación en la reparación del daño al ADN.

## Abstract

During the invasion of *E. histolytica* to its host, it is exposed to reactive oxygen species (ROS) from the host immune system. When these ROS exceed the antioxidant defense system of the parasite, its genomic stability may be compromised, one of the main damages are the modifications of nitrogenous bases, which can be repaired means by Bases Excision Repair (BER). In the genome of *E. histolytica* there're genes coding for enzymes involved in repair pathway BER. However, so far only they have been characterized the proteins EhDNALigI and EhPCNA which are involved in this pathway. In this work, the viability and growth capacity of *E. histolytica* to different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were evaluated. Subsequently, the DNA damage was evaluated through adduct formation 8-OHdG in responded to treatment with 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Also, the expression levels of genes encoding proteins involved in DNA repair by the BER pathway in basal conditions and in response to treatment with 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were analyzed. Similarly, the locations of EhDNALigI and EhPCNA by confocal microscopy were determined. *E. histolytica* was observed that BER pathway genes expres in basal culture conditions, that treatment with 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces 8-OHdG adduct formation and *ehdnaligI* and *ehpcna* genes alter its expression in response to induced DNA damage by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finally, re-locating of EhPCNA and EhDNALigI proteins was observed in the nucleus of *E. histolytica's* trophozoites in response to treatment. It can be concluded that *E. histolytica* expressed genes coding for proteins involved in the BER repair pathway which would allow repair DNA damage of the parasite when exposed to ROS. Interestingly *ehdnaligI* and *ehpcna* genes increased their expression in response to damage induced by treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the proteins encoded by these genes are re-localized and co-localized in *focis* type regions, suggesting their involvement in the repair of DNA damage.

## **I. Introducción**

### **1. Generalidades de *Entamoeba histolytica***

#### **1.1. Epidemiología**

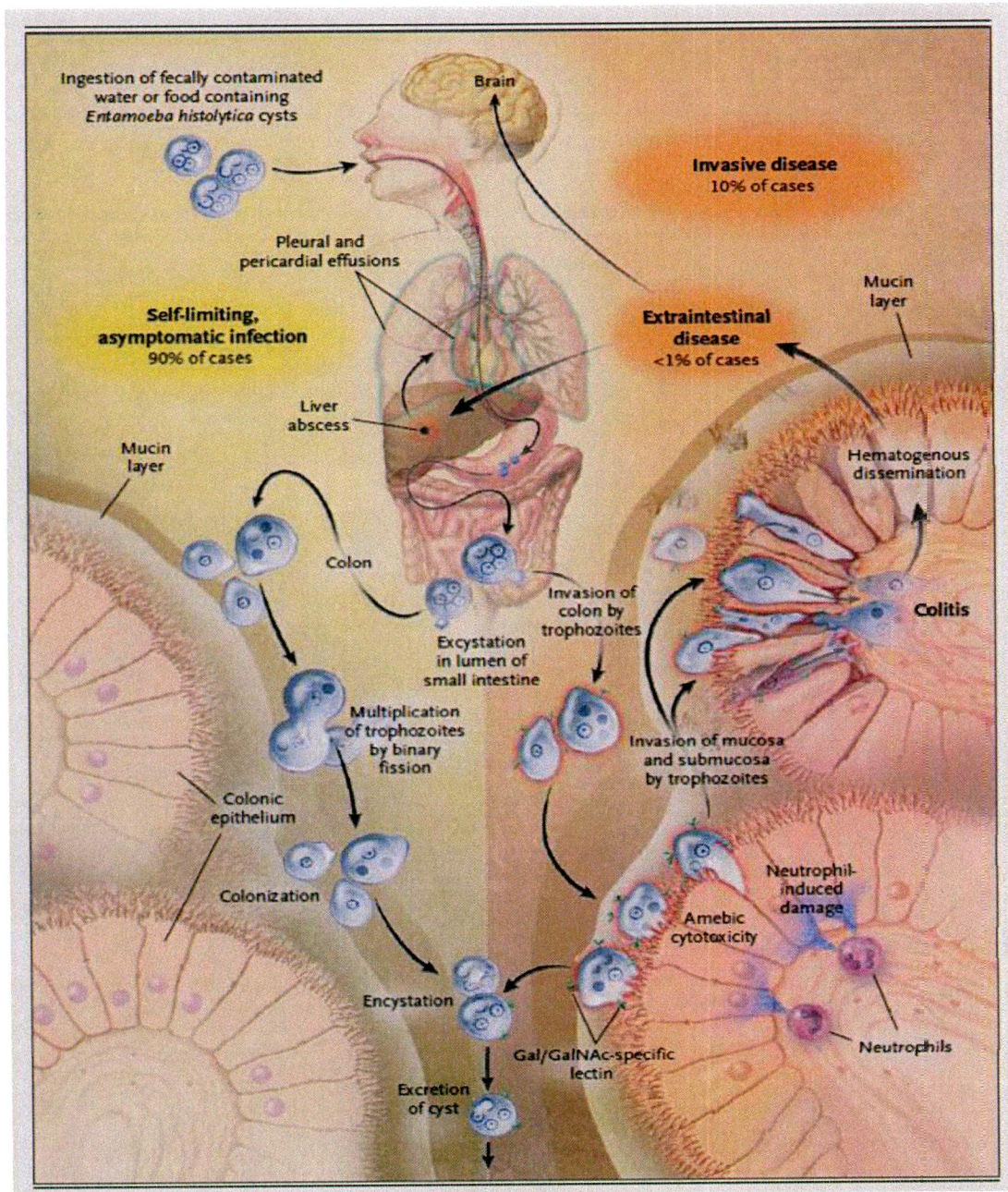
*E. histolytica* es un protozoo parásito, anaerobio, causante de la colitis y amibiasis sistémica, además está involucrado en severos casos de abscesos pulmonares y hepáticos. Se desconoce de forma precisa la prevalencia de la infección por *E. histolytica*, pero se estima que alrededor de unos 50 millones de personas se encuentran infectadas y es causal aproximadamente entre 40,000 - 100,000 muertes anualmente en todo el mundo (Walsh, 1986; Stanley, 2003). Las personas con mayor riesgo de adquirir esta infección son aquellas que viven en áreas con acceso restringido a servicios de agua potable y drenajes inadecuados, lo cual favorece la transmisión vía fecal-oral a través de agua y alimentos contaminados (Stanley, 2003; Haque, 2006).

#### **1.2. Ciclo de vida de *E. histolytica***

*E. histolytica* tiene un ciclo de vida en dos estadios: uno de ellos es como trofozoíto y otro en forma de quiste infeccioso, el cual es resistente al medio si estas condiciones no son muy propicias y se caracteriza por una morfología esférica con pared gruesa llamada pared quística, la resistencia al medio está definida como la capacidad que presentan los organismos de soportar los factores del ambiente que evitan que la población crezca desmesuradamente.

Cuando se encuentran en forma de quiste, pueden ser ingeridos vía oral, viajar por el aparato digestivo y transformarse en trofozoítos, donde en el 90% de los casos, pueden causar una infección asintomática, en el 10% una infección invasiva y en cerca del 1% de estos casos pueden diseminarse a otros órganos, tales como hígado, cerebro y pulmones, generando abscesos (Haque *et al.*, 2003). En la infección invasiva, los trofozoítos se desenquistan dando

lugar a la formación de un protoplasto desnudo tetra nucleado, el cual va a generar 8 trofozoítos, que posteriormente migran al ciego y se adhieren a la mucosa intestinal (Campos *et al.*, 2011; Olivos *et al.*, 2011; Haque, 2003). Esta unión se da a través de lectinas específicas de Galactosa (Gal) y N-acetil-galactosamina (Gal/GalNac) presentes en la superficie de *E. histolytica* (Ravdin, 1989). *E. histolytica* invade la mucosa y submucosa gastrointestinal, generando así las manifestaciones intestinales más frecuentes como la diarrea con sangre y el moco, mejor llamada colitis amebiana. Los trofozoítos pueden enquistarse y salir al ambiente con las heces, contaminar agua y alimentos, infectando otros individuos y completando así su ciclo de vida **(Figura 1)**.



**Fig. 1** Ciclo de vida de *E. histolytica*. *E. histolytica* se encuentra en dos formas: como trofozoíto y como quiste. Cuando se encuentra en forma de quiste puede ser ingerido a través de agua y alimentos contaminados, viajar por el aparato digestivo y alojarse en el íleon donde se desenquista generando 8 trofozoítos los cuales migran al ciego e invaden el epitelio intestinal (amibiasis invasiva). Posteriormente, los trofozoítos pueden enquistarse, salir al medio en las heces y contaminar el agua completando así su ciclo de vida (Haque *et al.*, 2003).

### 1.3. Mecanismos patogénicos de *E. histolytica* y mecanismos de defensa del huésped

Cuando *E. histolytica* coloniza el epitelio intestinal, se presentan una serie de mecanismos patogénicos responsables de su virulencia, lo cual va a determinar su capacidad infecciosa e invasiva (Trejo y Castañon, 2009). *E. histolytica* es un organismo citotóxico para gran variedad de tipos celulares, dentro de los que se incluyen: epitelio intestinal, neutrófilos, linfocitos T, macrófagos, epitelios y una variedad de líneas celulares mantenidas en cultivo como los son MDCK, Caco-2 y CHO (Ralston y Petri, 2011). Dentro de los principales mecanismos patogénicos de *E. histolytica* se encuentra, la producción de moléculas tales como proteasas, amebaporos, fosfolipasas y adhesinas (Campos *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2009) (**Tabla 1**). La adhesión de *E. histolytica* a su célula huésped, es regulada por lectinas específicas que interactúan con el carbohidrato Gal/GalNac (Petri, 1996). La lectina es un heterodímero compuesto de una subunidad ligera de 35-kDa y una pesada de 170-kDa, la subunidad pesada se encuentra embebida en la membrana celular del parásito, mientras que la ligera es extracelular y ambas se encuentran unidas por enlaces disulfuro (Petri, 1996). La subunidad ligera interacciona con sus receptores en la célula blanco, conformados por los carbohidratos Gal y Gal/GalNac (McCoy *et al.*, 1994). Después de la adhesión, los niveles de calcio intracelular se elevan dramáticamente, provocando desfosforilación de proteínas en la célula huésped y contribuyendo a la muerte celular (Ralston y Petri, 2011); ya que la entrada de calcio en el parásito activa factores de transcripción como URE3-BP (proteína de unión al elemento regulador río arriba), que modula la expresión de factores de virulencia como el gen *ferredoxina 1* y *lectina Gal/GalNac* (Gilchrist *et al.*, 2010). También *E. histolytica* activa la apoptosis en la célula huésped, por la activación de la caspasa 3, incluso antes de que se de la fagocitosis de las células (Huston *et al.*, 2003).

# UACM

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

---

*Nada humano me es ajeno*

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Inducción de daño al ADN y evaluación de la expresión génica  
de la maquinaria de reparación por escisión de bases (BER)  
cuando se somete a estrés oxidativo a *Entamoeba histolytica***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO  
EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

**DAVID HERNÁNDEZ ÁLVAREZ**

Directora de tesis

**Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga**

Ciudad de México, marzo de 2016.

## COMITÉ TUTORAL

### DIRECTORA

*Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga*

Profesora Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

### CO-DIRECTORA

*Dra. Abigail Betanzos Fernández*

Catedrática CONACyT. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular  
Centro de Investigación y de Estudios avanzados del IPN

### ASESORES

*Dr. José de Jesús Olivares*

Profesor Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

*Dr. Mario Cesar López Camarillo*

Profesor Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

*Dra. Itzel López Rosas*

Catedrática CONACyT  
Colegio de post-graduados Campus Campeche

## LECTORES DE TESIS

*Dr. José de Jesús Olivares*

Profesor Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

*Dr. Mario Cesar López Camarillo*

Profesor Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

*Dr. Armando Luna López*

Investigador. Instituto Nacional de Geriatria

*Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro*

Investigador. Langebio

Cinvestav-IPN

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM, así mismo contó con el valioso apoyo de la Dra. Abigail Betanzos Fernández del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN.

Agradezco a CONACYT por la beca (No. de registro 486203) otorgada para realizar mis estudios de Maestría.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto número 222956 de la convocatoria de Ciencia Básica y del Proyecto UACM-SECITI número PI2011-57R/SECITI060/2013.

A la **Dra. Elisa** por su compromiso en mi formación académica desde el primer día en que llegue a su laboratorio, por su paciencia, sus consejos y sobre todo por alterar mi “zona de confort” al que estaba acostumbrado, lo cual ha fomentado en mí el gran interés por la ciencia y tener mayores expectativas en el ámbito académico.

A la **Dra. Abigail** por su disposición en todo momento, por sus grandes aportaciones y por todas las atenciones prestadas para la culminación de este trabajo.

A la **Dra. Esther Orozco** modelo a seguir, por permitirme laborar en su grupo de investigación y por su disposición para la realización de este proyecto.

Al **Dr. Armando Luna** por sus asesorías en este trabajo, sus acertados comentarios y valiosas enseñanzas.

Al **Dr. Luis Briebe** por su apoyo académico, por su gran experiencia y por sus atinados comentarios que han servido para la realización de la presente investigación.

A la **Dra. Itzel López** por todo su apoyo, su tiempo y sus comentarios que han enriquecido este trabajo.

Al **M. en C. Helios Cárdenas** por su paciencia, por el tiempo de trabajo compartido, por todas esas horas de debate y por transmitirme su experiencia.

Al **Dr. Francisco Rendón** por estar siempre dispuesto a brindarme su apoyo tanto en el ámbito académico como en el personal y por todas esas horas de trabajo que fueron más amenas y divertidas con su compañía.

A la **Dra. Guillermina** por el apoyo, sus comentarios y el tiempo que me brindó para la realización de este trabajo.

Al **M. en C. Eduardo Carrillo** por su apoyo en los experimentos de microscopía confocal.

Al **M. en C. Alí Fores** por su apoyo en los experimentos de qPCR.

Y a todos mis amigos **Vanessa, Edgar, Mariana, Francisco, Ricardo, Nayelli, Hugo, Montse, Cecy, Kenji, Brenda, Olga, Rubí, Jonathan, Alma, Wendy, Isaac, Raúl, Edén, Gil, Dan y Carlos** que con su compañía hicieron menos largas las horas de trabajo.

## **DEDICATORIA**

*A mi esposa **Graciela Gavía** por alentarme a seguir construyendo nuestros sueños. Te amo y agradezco el apoyo que me has brindado durante estos 15 años.*

*A mi hijo **David Hernández** por ser la base de todos esos sueños. Te amo, eres mi orgullo y la razón para seguir adelante.*

*A mi padre **Francisco Hernández** sinónimo de sabiduría, honestidad y humanidad. Gracias por enseñarme a jugar "El juego de la vida".*

*A mi madre **Ma. Esther Álvarez** por su fortaleza y por infundir en mí que todo se consigue a base de esfuerzo. Gracias mamá por tu apoyo.*

*A mis suegros **Guillermo y Graciela** por enseñarme a dar todo sin condiciones, gracias por todo su apoyo.*

*A mis hermanos **Alejandra, Omar y Willy** por todos esos momentos de alegría, los quiero mucho.*

<b>Índice</b>	Pág.
<b>Abreviaturas</b>	i
<b>Índice de Figuras</b>	ii
<b>Índice de Tablas</b>	iv
<b>Resumen</b>	v
<b>Abstract</b>	vi
<b>I. Introducción</b>	
1. Generalidades de <i>Entamoeba histolytica</i>	1
1.1. Epidemiología	1
1.2. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	1
1.3. Mecanismos patogénicos de <i>E. histolytica</i> y mecanismos de defensa del huésped	4
1.4. Genoma de <i>E. histolytica</i>	7
2. Estrés oxidativo y mecanismos de reparación del ADN	9
2.1. Oxígeno	9
2.2. ERO y radicales libres	10
2.3. Estrés oxidativo, sistema de defensa antioxidante y daño al ADN	11
2.4. Mecanismos de reparación del ADN	14
2.5. Mecanismo de Reparación por Escisión de Bases (BER)	18
2.5.1. Proteínas que participan en la vía BER	19
3. Antecedentes particulares del proyecto	27
<b>II. Justificación</b>	30
<b>III. Hipótesis y objetivos</b>	31

1. Hipótesis	31
2. Objetivos	31
2.1. Objetivo General	31
2.2. Objetivos Particulares	31
<b>IV. Estrategia experimental</b>	
1. Cultivo in-vitro de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	32
2. Grupos Experimentales	33
3. Cinética de viabilidad y crecimiento de trofozoítos	33
4. Identificación del aducto 8-OHdG	34
5. Búsquedas de sus ortólogos de la vía BER en <i>H. sapiens</i> , <i>S. cerevisiae</i> y otras especies	35
6. Extracción del ADN genómico	36
7. Extracción y purificación de ARN	36
8. Análisis de la expresión génica del Mecanismo de Reparación por Escisión de Bases mediante RT-PCR	37
9. Evaluación de la expresión génica de EhDNALigI y EhPCNA mediante qRT-PCR	42
10. Localización de la EhDNALigI y EhPCNA por Microscopía Confocal	43
<b>V. Resultados</b>	
1. Resistencia de trofozoítos al tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	45
2. Cinética de crecimiento celular	46
3. Cinética de crecimiento post-tratamiento 2.5 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	48
4. Identificación del aducto 8-OHdG por medio de Avidina-FITC	49
5. Formación del aducto 8-OHdG mediante UV	50

6. Formación del aducto 8-OHdG por el tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	51
7. Análisis <i>in-silico</i> de proteínas de la vía BER en <i>E. histolytica</i>	55
8. Dominios estructurales de proteínas de la vía BER	58
9. Comparación de los Dominios estructurales de las proteínas EhMutY, EhNth-like y EhNth de <i>E. histolytica</i> y de Nth de <i>H. sapiens</i>	58
10. Comparación de los Dominios estructurales de las proteínas EhApex y EhFen1 de <i>E. histolytica</i> contra los dominios de Apex y Fen1 de <i>H. sapiens</i>	60
11. Evaluación de la expresión relativa de los ARNm de genes que participan en la vía BER	62
12. Cambios de localización de EhDNALigI y EhPCNA después del tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	68
<b>VI. Discusión</b>	73
<b>VII. Conclusiones</b>	82
<b>VIII. Perspectivas</b>	83
<b>IX. Bibliografía</b>	84

## Abreviaturas

Gal/GalNac	N-acetil-galactosamina
Gal	Galactosa
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
ERN	Especies Reactivas de Nitrógeno
SOD	Superóxido dismutasa
$2O_2^-$	Anión superóxido
$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno
OH $^\cdot$	Radical hidroxilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
SSB	Rompimiento de cadena sencilla
DSB	Rompimiento de doble cadena
8-OHdG	8-hidroxidesoxiguanosina
8-oxodG	8-oxodesoxiguanosina
NHEJ	Reparación por recombinación no homóloga
HR	Reparación por recombinación homóloga
NER	Reparación por Escisión de Nucleótidos
BER	Reparación por Escisión de Bases
AP	Apurínico o Apirimídico
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
UDG	Uracilo ADN glicosilasa
HhH	Hélice-horquilla-hélice

<b>Índice de Figuras</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .	3
<b>Figura 2.</b> Factores de virulencia <i>E. histolytica</i> .	7
<b>Figura 3.</b> Flavoproteína A y rubreritina.	8
<b>Figura 4.</b> Productos de algunas enzimas con función antioxidante.	11
<b>Figura 5.</b> Lesiones en el ADN causadas por ERO.	13
<b>Figura 6.</b> Respuesta al daño en el ADN.	15
<b>Figura 7.</b> Esquema del mecanismo de reparación BER.	19
<b>Figura 8.</b> Esquema de dominios funcionales y estructura terciaria de la proteína OGG de <i>H. sapiens</i> .	21
<b>Figura 9.</b> Esquema de los dominios funcionales y estructura terciaria de la proteína APEX1 de <i>H. sapiens</i> .	22
<b>Figura 10.</b> Esquema de los dominios funcionales de FEN1 de <i>H. sapiens</i> .	22
<b>Figura 11.</b> Esquema de la estructura tridimensional de PCNA.	23
<b>Figura 12.</b> ADN ligasas presentes en organismos eucariontes.	26
<b>Figura 13.</b> Determinación de la actividad de EhDNALigI de <i>E. histolytica</i> .	28
<b>Figura 14.</b> Estructura tridimensional de EhPCNA e incremento en la actividad de ligación de EhDNALigI por EhPCNA.	29
<b>Figura 15.</b> Esquema del diseño experimental.	32
<b>Figura 16.</b> Condiciones de síntesis de cADN.	39
<b>Figura 17.</b> Condiciones de amplificación por PCR de los genes de la vía BER.	40
<b>Figura 18.</b> Ensayo de viabilidad de trofozoítos tratados C, Cys- y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	46
<b>Figura 19.</b> Crecimiento celular de trofozoítos post-tratamiento y con 24 h de recuperación.	47

<b>Figura 20.</b> Cinética de crecimiento de trofozoítos post-tratamiento 2.5 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durante 1h.	49
<b>Figura 21.</b> Identificación del aducto 8-OHdG mediante Avidina-FITC en trofozoítos irradiados con UV.	51
<b>Figura 22.</b> Identificación del aducto 8-OHdG mediante Avidina-FITC producido en trofozoítos tratados con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	52
<b>Figura 23.</b> Identificación del aducto 8-OHdG mediante Avidina-FITC en trofozoítos tratados con 2.5 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y observados a diferentes horas de recuperación.	54
<b>Figura 24.</b> Representación esquemática de los dominios estructurales de las glicosilasas de <i>E. histolytica</i> y de <i>H. sapiens</i> .	60
<b>Figura 25.</b> Representación esquemática de los dominios estructurales de las proteínas EhApex de <i>E. histolytica</i> y de APEX de <i>H. sapiens</i> .	61
<b>Figura 26.</b> Representación esquemática de los dominios estructurales de las proteínas Fen1 de <i>E. histolytica</i> y de <i>H. sapiens</i> .	62
<b>Figura 27.</b> Amplificación de genes de la vía BER a partir de ADNg.	63
<b>Figura 28.</b> Expresión génica de la vía BER en condición basal de cultivo.	64
<b>Figura 29.</b> Cambios en la expresión relativa de genes de la vía BER en trofozoítos.	66
<b>Figura 30.</b> Cambios de expresión relativa mediante qRT-PCR.	68
<b>Figura 31.</b> Localización de EhDNALigI y EhPCNA después del tratamiento con 2.5 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	70
<b>Figura 32.</b> Localización de EhDNALigI y EhPCNA de <i>E. histolytica</i> después del tratamiento con 2.5 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y tiempos de recuperación (1, 3, 6 y 24h).	72

<b>Índice de Tablas</b>	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Principales funciones de las proteínas secretadas/excretadas por los trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	4
<b>Tabla 2.</b> Especies reactivas de oxígeno (ERO)	9
<b>Tabla 3.</b> Proteínas involucradas en los mecanismos de reparación del ADN en eucariontes	17
<b>Tabla 4.</b> ADN glicosilasas de mamíferos	20
<b>Tabla 5.</b> Mezclas y condiciones para la obtención de cADN	40
<b>Tabla 6.</b> Mezcla de reacción PCR	41
<b>Tabla 7.</b> Secuencias de oligonucleótidos, temperaturas de anillamiento, ciclos de amplificación y amplicones para los genes de la vía BER	43
<b>Tabla 8.</b> Secuencias de oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento para la amplificación de <i>ehdnaligI</i> y <i>ehpcna</i>	44
<b>Tabla 9.</b> Proteínas de la vía BER en <i>E. histolytica</i>	57

## Resumen

Durante la invasión a su hospedero *E. histolytica* está expuesta a especies reactivas de oxígeno (ERO) provenientes del sistema inmunológico del huésped. Cuando estas ERO sobrepasan el sistema de defensa antioxidante de este parásito, su estabilidad genómica puede verse comprometida, siendo uno de los principales daños las modificaciones de bases nitrogenadas, las cuales pueden ser reparadas por la vía de Reparación por Escisión de Bases (BER). En el genoma de *E. histolytica* existen genes que codifican para enzimas que participan en la vía de reparación BER. Sin embargo, hasta la fecha sólo se han caracterizado las proteínas EhDNALigI y EhPCNA, las cuales participan en dicha vía. En este trabajo, se evaluó la viabilidad y la capacidad de crecimiento de *E. histolytica* a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posteriormente, se evaluó el daño al ADN a través de la formación del aducto 8-OHdG en respuesta al tratamiento con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Así mismo, se analizaron los niveles de expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la reparación del ADN por la vía BER en condiciones basales y en respuesta al tratamiento con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De igual forma, se determinó la localización de EhDNALigI y EhPCNA mediante microscopía confocal. Se observó que *E. histolytica* expresa los genes de la vía BER en condiciones basales de cultivo, que el tratamiento con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la formación del aducto 8-OHdG y los genes *ehdnaligI* y *ehpcna* modifican su expresión en respuesta al daño inducido al ADN con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalmente, se observó la re-localización de las proteínas EhDNALigI y EhPCNA en el núcleo de trofozoítos de *E. histolytica* en respuesta al tratamiento. Se puede concluir que *E. histolytica* expresa genes que codifican para proteínas involucradas en la vía de reparación BER los cuales le permitirían al parásito reparar daños al ADN cuando es expuesto a ERO. Es interesante que los genes *ehdnaligI* y *ehpcna* aumenten su expresión en respuesta al daño inducido por el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y que las proteínas codificadas por estos genes se relocalicen y co-localicen en regiones tipo *foci*, sugiriendo su participación en la reparación del daño al ADN.

## Abstract

During the invasion of *E. histolytica* to its host, it is exposed to reactive oxygen species (ROS) from the host immune system. When these ROS exceed the antioxidant defense system of the parasite, its genomic stability may be compromised, one of the main damages are the modifications of nitrogenous bases, which can be repaired means by Bases Excision Repair (BER). In the genome of *E. histolytica* there're genes coding for enzymes involved in repair pathway BER. However, so far only they have been characterized the proteins EhDNALigI and EhPCNA which are involved in this pathway. In this work, the viability and growth capacity of *E. histolytica* to different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were evaluated. Subsequently, the DNA damage was evaluated through adduct formation 8-OHdG in responded to treatment with 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Also, the expression levels of genes encoding proteins involved in DNA repair by the BER pathway in basal conditions and in response to treatment with 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were analyzed. Similarly, the locations of EhDNALigI and EhPCNA by confocal microscopy were determined. *E. histolytica* was observed that BER pathway genes expres in basal culture conditions, that treatment with 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces 8-OHdG adduct formation and *ebdnaligI* and *ehpcna* genes alter its expression in response to induced DNA damage by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finally, re-locating of EhPCNA and EhDNALigI proteins was observed in the nucleus of *E. histolytica's* trophozoites in response to treatment. It can be concluded that *E. histolytica* expressed genes coding for proteins involved in the BER repair pathway which would allow repair DNA damage of the parasite when exposed to ROS. Interestingly *ebdnaligI* and *ehpcna* genes increased their expression in response to damage induced by treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the proteins encoded by these genes are re-localized and co-localized in *foci* type regions, suggesting their involvement in the repair of DNA damage.

## **I. Introducción**

### **1. Generalidades de *Entamoeba histolytica***

#### **1.1. Epidemiología**

*E. histolytica* es un protozooario parásito, anaerobio, causante de la colitis y amibiasis sistémica, además está involucrado en severos casos de abscesos pulmonares y hepáticos. Se desconoce de forma precisa la prevalencia de la infección por *E. histolytica*, pero se estima que alrededor de unos 50 millones de personas se encuentran infectadas y es causal aproximadamente entre 40,000 - 100,000 muertes anualmente en todo el mundo (Walsh, 1986; Stanley, 2003). Las personas con mayor riesgo de adquirir esta infección son aquellas que viven en áreas con acceso restringido a servicios de agua potable y drenajes inadecuados, lo cual favorece la transmisión vía fecal-oral a través de agua y alimentos contaminados (Stanley, 2003; Haque, 2006).

#### **1.2. Ciclo de vida de *E. histolytica***

*E. histolytica* tiene un ciclo de vida en dos estadios: uno de ellos es como trofozoíto y otro en forma de quiste infeccioso, el cual es resistente al medio si estas condiciones no son muy propicias y se caracteriza por una morfología esférica con pared gruesa llamada pared quística, la resistencia al medio está definida como la capacidad que presentan los organismos de soportar los factores del ambiente que evitan que la población crezca desmesuradamente.

Cuando se encuentran en forma de quiste, pueden ser ingeridos vía oral, viajar por el aparato digestivo y transformarse en trofozoítos, donde en el 90% de los casos, pueden causar una infección asintomática, en el 10% una infección invasiva y en cerca del 1% de estos casos pueden diseminarse a otros órganos, tales como hígado, cerebro y pulmones, generando abscesos (Haque *et al.*, 2003). En la infección invasiva, los trofozoítos se desenquistan dando

lugar a la formación de un protoplasto desnudo tetra nucleado, el cual va a generar 8 trofozoítos, que posteriormente migran al ciego y se adhieren a la mucosa intestinal (Campos *et al.*, 2011; Olivos *et al.*, 2011; Haque, 2003). Esta unión se da a través de lectinas específicas de Galactosa (Gal) y N-acetil-galactosamina (Gal/GalNac) presentes en la superficie de *E. histolytica* (Ravdin, 1989). *E. histolytica* invade la mucosa y submucosa gastrointestinal, generando así las manifestaciones intestinales más frecuentes como la diarrea con sangre y el moco, mejor llamada colitis amebiana. Los trofozoítos pueden enquistarse y salir al ambiente con las heces, contaminar agua y alimentos, infectando otros individuos y completando así su ciclo de vida **(Figura 1)**.

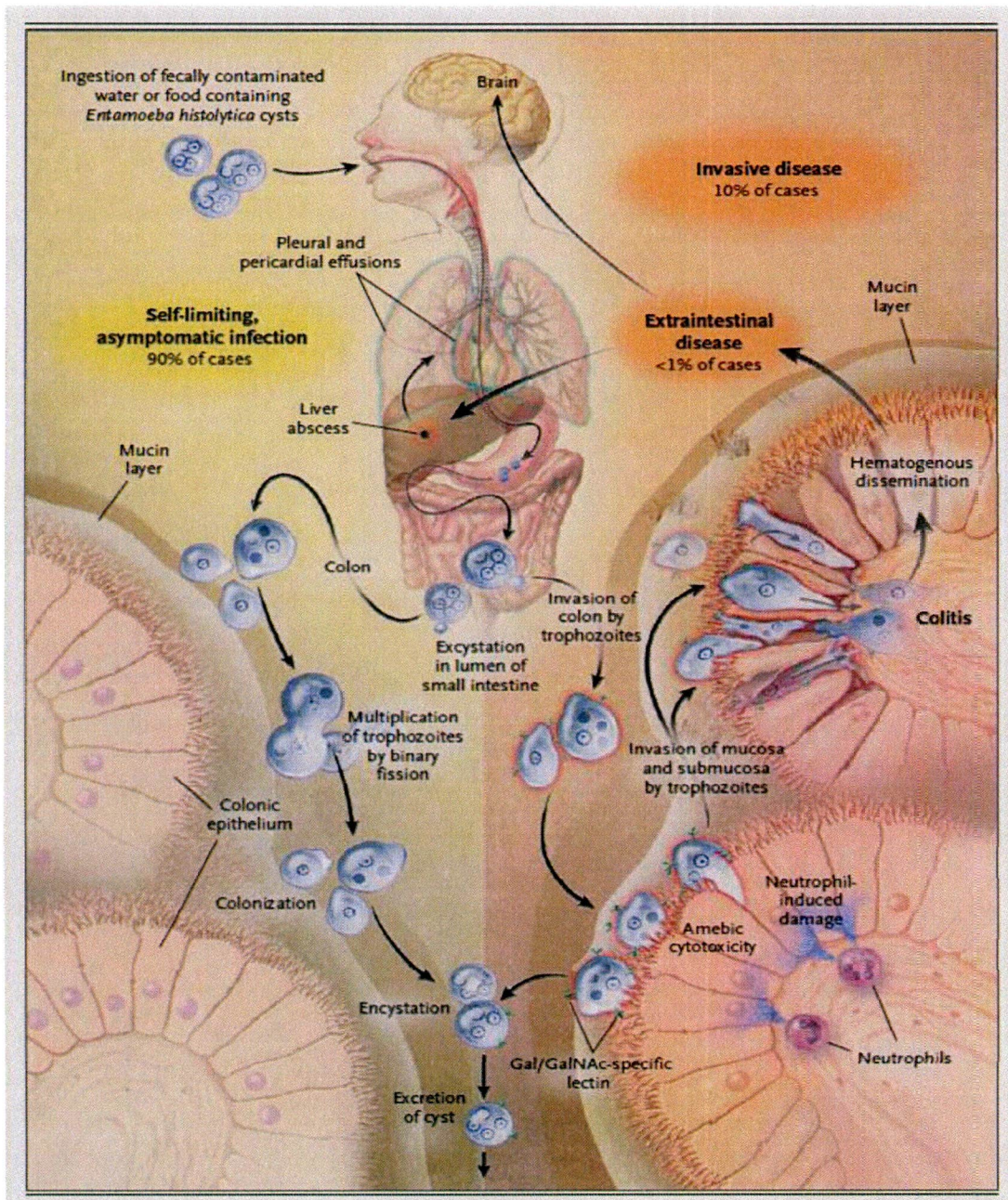


Fig. 1 Ciclo de vida de *E. histolytica*. *E. histolytica* se encuentra en dos formas: como trofozoíto y como quiste. Cuando se encuentra en forma de quiste puede ser ingerido a través de agua y alimentos contaminados, viajar por el aparato digestivo y alojarse en el íleon donde se desenquista generando 8 trofozoítos los cuales migran al ciego e invaden el epitelio intestinal (amibiasis invasiva). Posteriormente, los trofozoítos pueden enquistarse, salir al medio en las heces y contaminar el agua completando así su ciclo de vida (Haque *et al.*, 2003).

### 1.3. Mecanismos patogénicos de *E. histolytica* y mecanismos de defensa del huésped

Cuando *E. histolytica* coloniza el epitelio intestinal, se presentan una serie de mecanismos patogénicos responsables de su virulencia, lo cual va a determinar su capacidad infecciosa e invasiva (Trejo y Castañon, 2009). *E. histolytica* es un organismo citotóxico para gran variedad de tipos celulares, dentro de los que se incluyen: epitelio intestinal, neutrófilos, linfocitos T, macrófagos, epitelios y una variedad de líneas celulares mantenidas en cultivo como los son MDCK, Caco-2 y CHO (Ralston y Petri, 2011). Dentro de los principales mecanismos patogénicos de *E. histolytica* se encuentra, la producción de moléculas tales como proteasas, amebaporos, fosfolipasas y adhesinas (Campos *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2009) (**Tabla 1**). La adhesión de *E. histolytica* a su célula huésped, es regulada por lectinas específicas que interactúan con el carbohidrato Gal/GalNac (Petri, 1996). La lectina es un heterodímero compuesto de una subunidad ligera de 35-kDa y una pesada de 170-kDa, la subunidad pesada se encuentra embebida en la membrana celular del parásito, mientras que la ligera es extracelular y ambas se encuentran unidas por enlaces disulfuro (Petri, 1996). La subunidad ligera interacciona con sus receptores en la célula blanco, conformados por los carbohidratos Gal y Gal/GalNac (McCoy *et al.*, 1994). Después de la adhesión, los niveles de calcio intracelular se elevan dramáticamente, provocando desfosforilación de proteínas en la célula huésped y contribuyendo a la muerte celular (Ralston y Petri, 2011); ya que la entrada de calcio en el parásito activa factores de transcripción como URE3-BP (proteína de unión al elemento regulador río arriba), que modula la expresión de factores de virulencia como el gen *ferredoxina 1* y lectina Gal/GalNac (Gilchrist *et al.*, 2010). También *E. histolytica* activa la apoptosis en la célula huésped, por la activación de la caspasa 3, incluso antes de que se de la fagocitosis de las células (Huston *et al.*, 2003).

Tras la adhesión del trofozoíto con su célula blanco, los amebaporos se insertan en la membrana para lisar la célula. Existen tres isoformas de amebaporos (A, B y C) que consisten en 77 residuos de aminoácidos y se localizan dentro de gránulos citoplasmáticos. La importancia de estas moléculas se determinó cuando se inhibió la expresión de la isoforma A y se observó que la cepa se convirtió en no virulenta (Hecht *et al.*, 2004). Las proteasas son otro grupo de proteínas con actividad proteolítica asociadas a la patogenicidad de éste parásito; estas tienen la capacidad de degradar distintos sustratos tales como: inmunoglobulinas, fracciones del complemento y mucinas que recubren el epitelio intestinal del huésped (Serrano-Luna *et al.*, 2013; Tillack *et al.*, 2007).

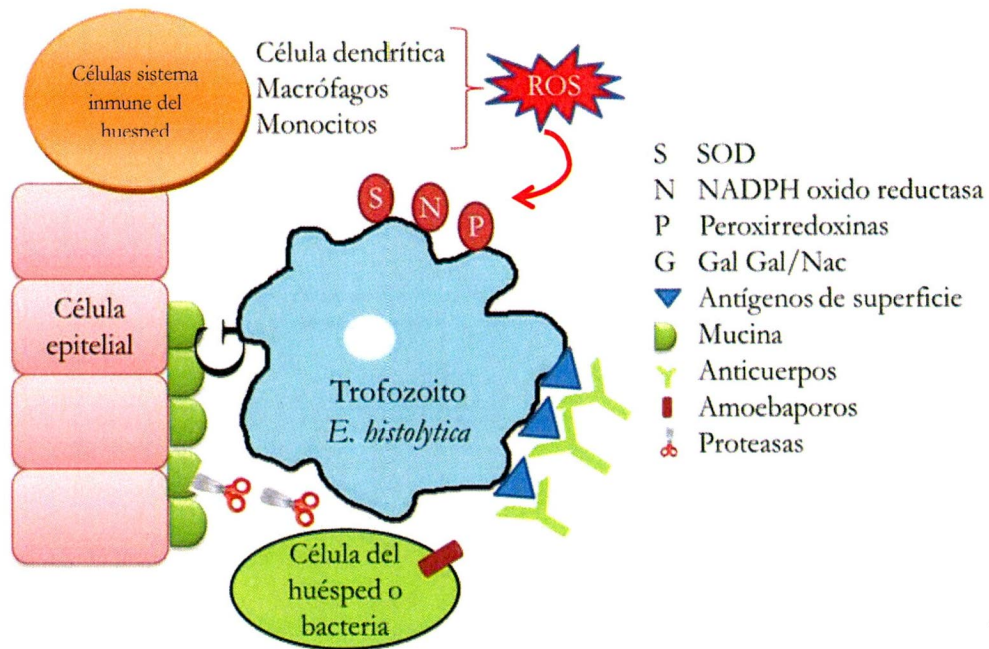
**Tabla 1.** Principales funciones de las proteínas secretadas/excretadas por los trofozoítos de *E. histolytica*

<p><b>Moléculas de Adhesión</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Lectina Gal/GalNAc</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión al epitelio intestinal</li> <li>• Efectos de citólisis y citotoxicidad</li> <li>• Inhibición del complejo ataque a membrana</li> </ul> </li> <li>• <b>EhADH112 (Complejo EhCPADH)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión a células diana</li> <li>• Fagosina</li> </ul> </li> <li>• <b>Proteína de membrana L220</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lectina</li> <li>• Aglutinina → Eritrofagocitosis</li> <li>• Regulador de la proliferación de LT</li> </ul> </li> <li>• <b>Proteína rica en serina (SREHP)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión al epitelio intestinal</li> <li>• Potente inmunógeno</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>Proteínas formadoras de poros</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Amebaporo A, B y C</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzima proteolítica</li> <li>• Asesina las bacterias fagocitadas por el trofozoito</li> <li>• Induce la necrosis de células epiteliales y leucocitos</li> </ul> </li> <li>• <b>Hemolisina III</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lisis de células del hospedero</li> </ul> </li> <li>• <b>Fosfolipasa A</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lisis de leucocitos</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>Enzimas proteolíticas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cisteinas Proteasas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Degradación de IgA e IgG</li> <li>• Degradación de la proteína precursora pro-IL-18</li> <li>• Degradación del C3a y C5a</li> <li>• Actividad ICE → Inducción de la apoptosis</li> </ul> </li> </ul>

(Tomado de Trejo 2009).

Otros mecanismos de supervivencia y virulencia que recientemente han cobrado importancia, se basan en la eficacia de los trofozoítos contra las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN) producidas por el sistema inmunológico del huésped (Gretes *et al.*, 2012). Dentro de las principales moléculas involucradas en la detoxificación de ERO, se encuentran: Superóxido dismutasa (SOD), NADPH oxido reductasa y peroxirredoxinas.

En el huésped *E. histolytica* se encuentra con una serie de respuestas, como son los mecanismos de defensa de primera línea que son reconocidos y activados por diferentes estructuras de superficie o moléculas secretadas por el parásito. El confinamiento y destrucción de los trofozoítos, está caracterizada por el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares, linfocitos, células dendríticas y macrófagos. Los macrófagos, se han asociado con la destrucción directa de los trofozoítos de *E. histolytica*, a través de mecanismos que incluyen la generación de intermediarios de oxígeno, ERO y ERN; activados con el reconocimiento de antígenos de superficie del trofozoíto por receptores tipo Toll (TLR-2 y TLR-4) (Guo *et al* 2007; Espinosa y Martínez, 2000) (**Figura 2**). Junto con los macrófagos, los neutrófilos son considerados parte principal de la respuesta inmune celular contra este parásito. Los macrófagos actúan también como células que desencadenan la respuesta inmune, al generar o inducir citosinas que juegan un papel importante en la activación de otras células, tales como los linfocitos T cooperadores (CD4 +). Estas células se encargan de orquestar la respuesta inmunológica adaptativa contra *E. histolytica* (Pertuz y Flores, 2004).



**Fig. 2 Factores de virulencia de *E. histolytica*.** La imagen muestra diferentes factores de virulencia como: adhesinas, proteasas y amebaporos; así como, la producción de enzimas con función antioxidante (SOD, peroxirredoxinas y NADPH oxido reductasa), cuyo principal papel es convertir las ERO generadas por el sistema inmunológico del huésped en compuestos menos tóxicos (adaptado de Wilson *et al.*, 2012).

#### 1.4. Genoma de *Entamoeba histolytica*

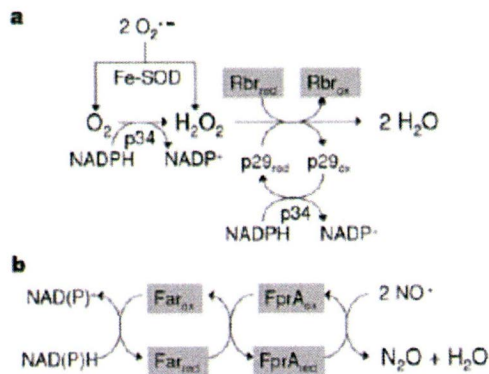
La secuencia del genoma de *E. histolytica* (cepa HM1: IMSS) se publicó en 2005 (Loftus *et al.*, 2005) y posteriormente fue re-ensamblado y re-anotado en 2010 (Lorenzi *et al.*, 2010).

En 2005, se predijo el tamaño del genoma en 23,361,983 pb, con un total de 9,938 genes de un tamaño de 1,17 kb, que comprende el 49% del genoma. En 2010, con la re-anotación del genoma se estimó un tamaño de 20,799,072 pb y el número de genes en 8,201, es decir 17% menos que los reportados en 2005 y con un promedio en tamaño de 1.26 kb. La secuenciación del genoma de *E. histolytica* reveló una variedad de adaptaciones metabólicas compartidas con otros dos patógenos mitocondriales, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*.

Estas adaptaciones incluyen la reducción o eliminación de la mayoría de las vías metabólicas mitocondriales y el uso de enzimas de estrés oxidativo, generalmente asociadas

con procariotas anaeróbicas. En el colon, *E. histolytica* se encuentra en un ambiente anóxico y cuando coloniza el intestino, la tensión de oxígeno aumenta por lo que hacer frente a este cambio, recientemente se considera como un factor de virulencia. La importancia de esta respuesta es subrayada por la redundancia de los mecanismos de detoxificación de oxígeno.

Por ejemplo *E. histolytica* tiene cuatro copias de genes codificantes para flavoproteína, que desintoxica óxidos y óxido nítrico; también contiene genes para rubreritrina, que en las bacterias anaerobias es protectora contra el peróxido de hidrógeno intracelular (Sztukowska *et al.*, 2002) (**Figura 3**). Estas proteínas antioxidantes y de resistencia a estrés nitrosativo también están presentes en otros parásitos unicelulares como *G. lamblia* (con la excepción de rubreritrina) y *T. vaginalis* (Loftus *et al.*, 2005). La mayoría de las vías de biosíntesis de aminoácidos en *E. histolytica* han sido eliminadas, excepto los de serina y cisteína, que probablemente han sido conservadas para la producción de cisteína, principal tiol intracelular, capaz de donar un equivalente de reducción a moléculas como las ERO. Los altos niveles de cisteína en *E. histolytica* pueden compensar la falta de glutatión y sus enzimas asociadas, componentes importantes de la resistencia al estrés oxidativo en muchos organismos (Loftus *et al.*, 2005).



**Fig. 3 Flavoproteína A y rubreritrina.** a) Se observa la participación de NADPH, que tiene la capacidad de convertir el oxígeno molecular ( $O_2$ ) en anión superóxido ( $2O_2^-$ ) y en conjunto con SOD forman peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La Rubreritrina (Rbr) puede convertir el  $H_2O_2$  en agua. B) Las flavoproteínas tipo A (FprA) convierten el óxido nítrico a óxido nitroso (Loftus *et al.*, 2005).

## 2. Estrés oxidativo y mecanismos de reparación del ADN

### 2.1. Oxígeno

Las ERO son derivados de  $O_2$  y este elemento es considerado como sinónimo de vida ya que lo requerimos para respirar, además de ser un elemento imprescindible en el metabolismo de todos los organismos aerobios. También los metabolitos de oxígeno son importantes moléculas microbicidas, generadas por macrófagos, fagocitos y células dendríticas (Ghadirian *et al.*, 1986). Existen muchos informes que indican que el  $O_2$  es tóxico a cualquier concentración, esto debido a que las ERO que se generan tienen la capacidad de reaccionar rápidamente con moléculas o compuestos presentes en el organismo, tales como lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, recientes estudios sugieren que la generación de ERO y ERN son importantes componentes intracelulares reguladores de diversas funciones fisiológicas, como la regulación del tono vascular, la síntesis de insulina, la activación del factor inducible por la hipoxia (HIF por sus siglas en inglés), la proliferación, diferenciación y migración celular (Adelheid y Andrey, 2015). Muchos protozoos parásitos, tales como *E. histolytica*, *G. lamblia*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, y *Plasmodium*, se consideran anaerobios, ya que pueden ser cultivadas *in-vitro* bajo condiciones de tensión de oxígeno reducida. Aunque se ha visto que estos parásitos son aerotolerantes y hasta pueden consumir oxígeno en cierta medida (Rajeev, 1996). Hallazgos recientes indican que las ERO juegan un papel importante en la diferenciación regulada por hierro de promastigote-amastigote en *Leishmania*. La exposición a temperaturas elevadas en *L. infantum*, induce su diferenciación promastigote-amastigote, provocando hiperpolarización de las mitocondrias del parásito, un aumento en la frecuencia respiratoria y un aumento de ERO (Mitra y Andrews, 2013).

## 2.2. ERO y radicales libres

La reducción del oxígeno y la radiación ionizante dan lugar a la formación de ERO. Algunas de estas ERO son radicales libres. Un radical libre es una especie química que presenta al menos un electrón no apareado, el cual tiene la capacidad de asociarse con otras moléculas.

Dentro de las principales ERO que se generan a partir de la reducción del  $O_2$  y la radiación ionizante son: anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singulete ( $O_2^{\bullet}$ ), y radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) (González *et al.*, 2000; Mayor, 2010), siendo este último, el de mayor reactividad y el principal agente mutagénico capaz de oxidar las bases nitrogenadas y los residuos de desoxirribosa del ADN (Lu *et al.*, 2001) (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Especies reactivas de oxígeno (ERO)

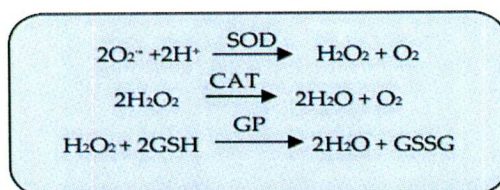
Radicales libres	No radicales
Superóxido $O_2^{\bullet}$	Oxígeno molecular $O_2$
Ion hidroxilo $\bullet OH$	Peróxido de hidrógeno $H_2O_2$
Óxido nítrico $NO$	Peroxinitrito $NO_3$

(Tomado de Bernardini 2008).

### 2.3. Estrés oxidativo, sistema de defensa antioxidante y daño al ADN

En organismos aerobios y aerotolerantes existe un balance entre la producción de ERO y el sistema de defensa antioxidante que mantiene la homeostasis, regulando así el estado redox intracelular. La pérdida de la homeostasis provoca el estado de estrés oxidativo, que puede conducir a la formación de lesiones en la estructura de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que eventualmente induce alteraciones en las funciones metabólicas e inclusive la muerte (Venereo, 2002; López *et al.*, 2003; Marnett, *et al* 2003). Debido a que el ADN sirve de copia permanente del genoma celular, cambios en su estructura tienen más trascendencia que alteraciones en otros componentes celulares como el ARN, lípidos o proteínas (Cooper y Hausman, 2007).

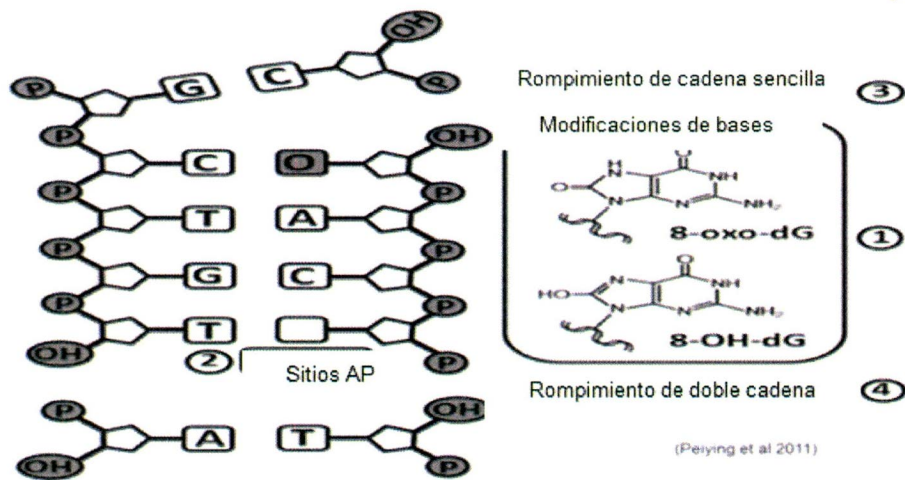
El balance entre las ERO y el sistema de defensa antioxidante como se mencionó anteriormente, mantiene la homeostasis celular; así mismo, el sistema de defensa antioxidante lo componen un grupo de moléculas, cuya finalidad es convertir estas ERO en compuestos no tóxicos o menos tóxicos (Oxilia, 2010; González *et al.*, 2000; Mayor 2010). En organismos eucariontes se han descrito la presencia y actividad de algunas de las enzimas con función antioxidante, dentro de las que se encuentran: SOD, glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) (**Figura 4**), tioredoxinas (TR) y peroxirredoxinas.



**Fig. 4 Productos de algunas enzimas con función antioxidante.** SOD tiene la capacidad de dismutar al  $\text{O}_2^-$  para convertirlo en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , CAT transforma  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ ; GPx reduce al  $\text{H}_2\text{O}_2$  y ROOH para formar  $\text{H}_2\text{O}$  (Jie *et al.*, 2013; Kulbacka *et al.*, 2012).

A su vez cabe destacar la participación de ciertos oligoelementos como parte activa de las enzimas antioxidantes, tales como: cobre, zinc, selenio, magnesio y hierro (González *et al.*, 2000). También existen antioxidantes no enzimáticos que tienen la capacidad de unirse a radicales libres y transformarlos en radicales menos agresivos; algunos de ellos son: vitamina E, vitamina C, glutatión, urato, bilirrubina, flavonoides, espermina y la coenzima Q (CoQ) (González *et al.*, 2000).

Como se mencionó anteriormente, el mantenimiento del equilibrio entre ERO y enzimas con función antioxidante es importante para mantener la homeostasis intracelular, mientras que la sobreproducción de ERO está implicada en la eliminación de distintos patógenos. Dentro de los principales daños que se generan en el ADN por parte de ERO son: rompimiento de cadena sencilla (SSB por sus siglas en inglés), de doble cadena (DSB por sus siglas en inglés), así como la formación de aductos como la 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) o la 8-oxodesoxiguanosina (8-oxodG) (**Figura 5**). Estas últimas son de gran importancia, ya que generan transversiones en el genoma, relacionadas como causa de diferentes tipos cáncer. Por otra parte, la oxidación de lípidos y proteínas genera intermediarios que también pueden reaccionar con el ADN formando otro tipo de aductos (Esterbauer *et al.*, 1990).



**Fig. 5 Lesiones en el ADN causadas por ERO.** 1) Formación de aductos 8-OHdG u 8-oxodG. 2) Generación de sitios apurínicos/apirimídicos (AP). 3 y 4) Rompimiento de cadena sencilla y doble cadena (modificado de Pelying *et al.*, 2011).

El estrés oxidativo y nitrozativo pueden causar inestabilidad al genoma con la aparición de fenotipos alterados en parásitos y modificaciones oxidativas en otras macromoléculas celulares indispensables como proteínas y lípidos (Bosch *et al.*, 2015). Como se mencionó anteriormente el estrés oxidativo, es generado por células del sistema inmunológico del huésped (macrófagos, células dendríticas y monocitos), además de medicamentos para el control de infecciones parasitarias (Guo *et al* 2007; Tejman y Eckmann, 2011). Entre los fármacos utilizados como quimioterapéuticos se encuentran componentes que pertenecen a los 5-nitroimidazoles (metronidazol) y benzimidazoles (albendazol) (Tejman y Eckmann, 2011). El daño oxidativo al ADN en parásitos se asocia con la detención del ciclo celular y apoptosis, por lo que cuentan con mecanismos para evadir las ERO y llevar a cabo la reparación del genoma, en el caso de encontrarse en un estado de estrés oxidativo.

## 2.4. Mecanismos de reparación del ADN

Cuando el sistema de defensa antioxidante celular se ve sobrepasado por las ERO, el genoma puede sufrir lesiones y para contrarrestar el daño infligido sobre el genoma, la célula tiene la capacidad de activar una cascada de señalización, llamada respuesta a daño en el ADN.

La respuesta de daño al ADN detecta la lesión y transmite señales que activan los puntos de control del ciclo celular, con el fin de retrasar la progresión de este ciclo y permitir que el daño sea reparado mediante el reclutamiento de la maquinaria de reparación del ADN (Ghosal y Chen, 2013). Una vez detectado el daño, empiezan a funcionar los mecanismos de reparación del ADN. Estos mecanismos de reparación del ADN se pueden dividir en dos clases principales: 1) inversión directa de la reacción química y 2) eliminación de bases dañadas, seguida de la reposición de ADN recién sintetizado (Cooper y Hausman, 2007).

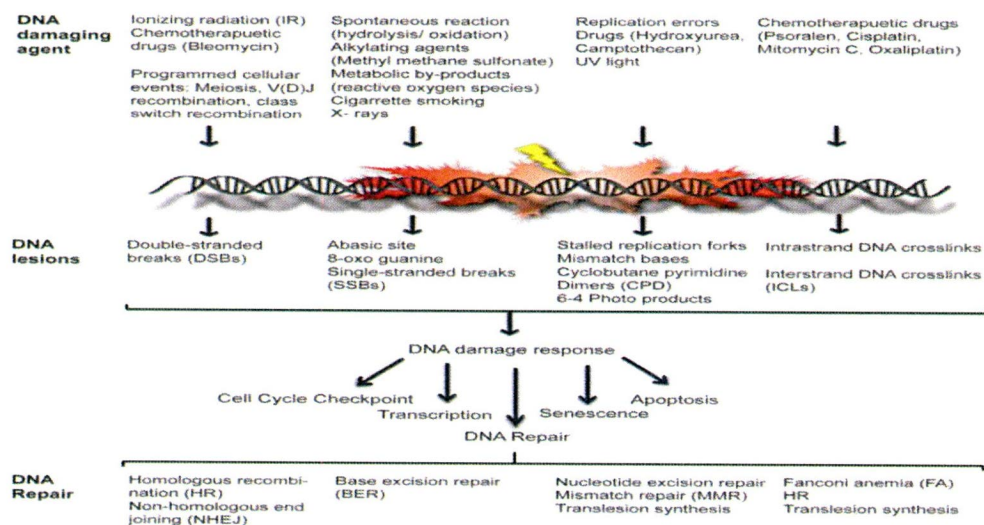
Cuando los nucleótidos no coinciden, causan inestabilidad genómica provocada por la ADN polimerasa, a la cual se le escapan errores en su actividad correctora o por deslizamientos de ésta. Cuando esto sucede, la vía de reparación mismatch entra en marcha.

Esta vía consta de cuatro pasos, el primer paso es el reconocimiento del mal apareamiento de bases en el ADN y la unión del complejo proteico heterodimérico MSH2-MSH6 o MSH2-MSH3, dependiendo del tipo de lesión que se presente. El segundo paso es la escisión por la exonucleasa EXO1; el tercer paso es la síntesis llevada a cabo por la polimerasa Pol  $\delta$ ; y por último se realiza la ligación de los extremos por la ADN ligasa I (Gredilla *et al.*, 2012) **(Tabla 3)**.

A su vez, existen dos vías principales que reparan la DSB en el ADN: la reparación por recombinación no homóloga (NHEJ por sus siglas en inglés) y la reparación por recombinación homóloga (HR por sus siglas en inglés). En NHEJ, las proteínas clave que se conservan desde la levadura a los seres humanos, incluyen el heterodímero Ku70-Ku80, que

une los extremos del ADN con una alta afinidad. Este heterodímero recluta a su vez a nucleasas, polimerasas ( $\mu$  y  $\lambda$ ) y al complejo de ligasa Cernunnos, también conocido como XLF con ADN ligasa IV (Langerak y Russell, 2011).

La reparación por HR, inicia cuando el complejo Mre11-Rad50-Nbs1/Xrs2 (MRN) el cual reconoce y se une al ADN, generando extremos libres más largos en la hebra 3' del ADN. Este extremo se recubre de las proteínas RPA, RAD51 y otras moléculas del complejo epistático RAD51 para formar un filamento núcleo-proteico, cuya finalidad es invadir la doble hebra de ADN homóloga, abriendo en ella una burbuja y emparejándose a la cadena complementaria que discurre en dirección antiparalela. A partir de este extremo 3' se extiende la cadena, usando la hebra complementaria como molde, y al mismo tiempo se extiende también el otro extremo que había quedado libre. Tras una corta extensión, los extremos libres se unen por acción de una ligasa y esto genera dos estructuras en las que una hebra salta de una molécula de ADN a la molécula homóloga (Langerak *et al.*, 2011).



**Fig. 6 Respuesta al daño en el ADN.** Factores endógenos y exógenos pueden causar daño al ADN, los daños van desde modificación de bases hasta rupturas de cadena doble. Estos daños pueden ser detectados por las células a través del llamado respuesta a daño al ADN, activando los procesos celulares como los puntos de control del ciclo celular y la transcripción; así como, la activación de las maquinarias de reparación, senescencia y apoptosis (Ghosal y Chen, 2013).

El ADN nuclear también puede repararse por el mecanismo de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER por sus siglas en inglés), el cual puede eliminar numerosos tipos de lesiones voluminosas que distorsionan la doble hélice. Además, NER es central para la reparación de enlaces cruzados del ADN. La vía NER incluye el reconocimiento de daños, la apertura de la hélice de ADN, la incisión y la posterior síntesis de los nucleótidos que rodean la lesión; y por último, la formación del enlace fosfodiéster para ligar la cadena de ADN. NER tiene dos sub-vías con diferentes formas de detección de lesiones: escaneo genoma global y acoplado a la transcripción (Gredilla *et al.*, 2012).

La Reparación por Escisión de Bases (BER), es una de las vías más importantes implicadas en corregir el daño oxidativo en el ADN en las células de humanos. Se estima que el nivel de lesiones generados en la célula por día es de 1000 aductos 8-OHdG (van Loon *et al.*, 2010). Durante la infección parasitaria en el huésped, la eliminación del parásito inicia con la producción de ERO, la cual podría generar el aducto 8-OHdG y conducir a transversiones durante la replicación del ADN, poniendo en riesgo la estabilidad genómica del parásito *E. histolytica*. Se han encontrado algunos componentes de la vía BER en el genoma de diferentes parásitos, los cuales podrían ser suficientes para llevar a cabo la reparación del ADN (*E. histolytica*) (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Proteínas involucradas en los mecanismos de reparación del ADN en eucariontes

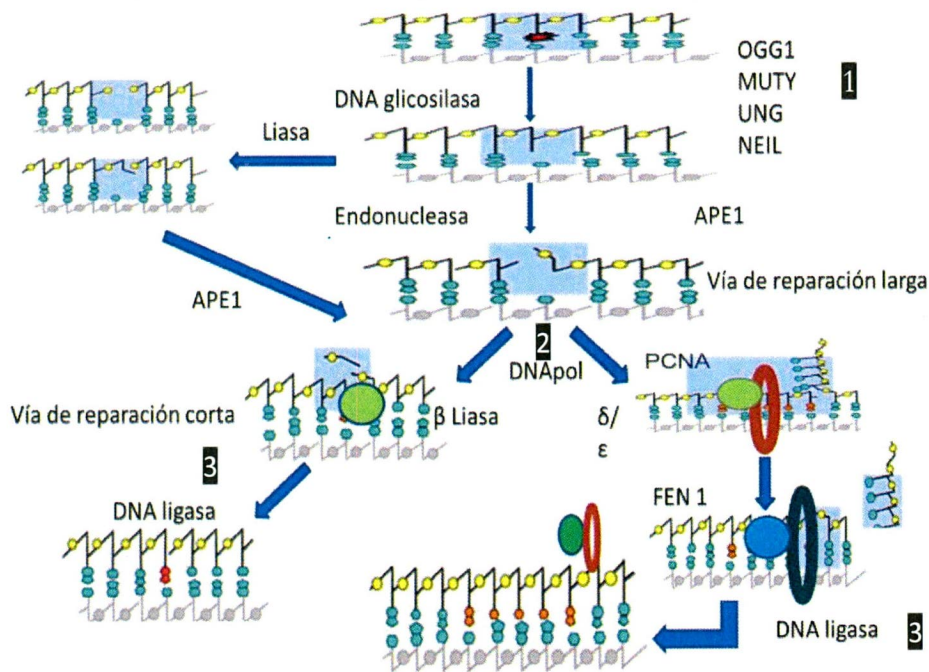
<b>Agentes causantes del daño</b>					
ERO, agentes alquilantes y UV		UV y ERO	Errores de replicación	Rayos X, UV y ERO	
<b>Lesiones</b>					
8-OHdG, 8-oxodG, bases alquiladas o mismatch bases		Dímeros de pirimidina bulky lesions	A-G mismatch T-C mismatch	Rompimiento de doble cadena	
<b>Mecanismos de reparación</b>					
<b>BER</b>		<b>NER</b>		<b>Mismatch</b>	<b>Recombinación homóloga</b>
<b>Proteínas involucradas en:</b>					
<b>Reconocimiento del daño</b>		<b>Reconocimiento del daño</b>		<b>Reconocimiento mismatch</b>	<b>5'-3' resection</b>
Vía corta	Vía larga	GG	TC	Complejos: -MutL $\alpha$ PMS2-MLH1 -MutS $\alpha$ MSH6-MSH2 -MutS $\beta$ MSH2-MSH3 -MLH1/MLH3 -RFC y PCNA	Complejo MRN: -RAD50-Mre11-Nbs1
Glicosilasas bifuncionales OGG1, NTH, NEIL1, NEIL2 y NEIL3	Glicosilasas monofuncionales UNG, MUTY, MBD4, MPG y SMUG	Complejo Cul4-DDB (XPE): RBX1, Cul4, DDB1, DDB2 Complejo XPC: XPC, HR23B, CETN2	Complejo Cul4- CSA: RBX1, Cul4, DDB1, CSA, CSB		
<b>Escisión cadena</b>		<b>Desenrollamiento ADN</b>		<b>Escisión</b>	<b>Formación Filamento</b>
APE1 y APE2	APE1 y APE2	Complejo TFIIH: CDK7, XPB, TFIIH1, MNAT1, XPD, TFIIH2, CCNH, TTDA, TFIIH3, TFIIH4,	XPG, XPA y RPA	Exo1	RPA, Rad51, Rad52, BRCA2, DSS1
<b>Síntesis</b>		<b>Incisión, escisión y síntesis ADN</b>		<b>Síntesis ADN</b>	<b>Síntesis ADN</b>
Dpol, XRCC1, Lig3	Dpol, PCNA, Pol $\delta$ , Pol $\beta$ , Pole, Fen1	Incisión: XPF y ERCC Escisión: PCNA, RFC Síntesis: Pol $\delta$ y Pole		RPA y Pol $\delta$	Pol $\delta$
<b>Ligación</b>					
Lig1					

■ El genoma de amiba presenta genes que codifican para estas proteínas (Tabla generada a partir de la base de datos de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG)).

## 2.5. Mecanismo de Reparación por Escisión de Bases (BER)

La reparación por BER, es una de las vías más importantes implicadas en corregir el daño oxidativo en el ADN en las células de humanos. Se estima que el nivel lesiones en una célula por día es de 1000 aductos 8-OHdG (van Loon *et al.*, 2010). Durante la infección parasitaria en el huésped, la eliminación del parásito inicia con la producción de ERO, la cual podría generar el aducto 8-OHdG y conducir a transversiones durante la replicación del ADN, poniendo en riesgo la estabilidad genómica del parásito *E. histolytica*. Esta vía de reparación se encuentra subdividida en dos: la vía corta y la vía larga, que se diferencian en el número de nucleótidos que son escindidos y la cantidad de enzimas que participan en ellas. En la vía corta solamente se remueve e incorpora un nucleótido, en tanto que en la vía larga se incorporan de 2 a 6 nucleótidos. La vía corta inicia cuando el ADN dañado es reconocido por una ADN glicosilasa, la cual escinde el enlace N-glicosílico que une a la base nitrogenada con la columna vertebral de la desoxirribosa fosfato. Esta escisión genera un sitio abásico/apurínico/apirimídico o sitio AP, el cual es procesado por una ADN endonucleasa AP (**Figura 7**). Esta enzima corta el enlace fosfodiéster en el extremo 5' del sitio AP, generando así un SSB, que posee un hidroxilo libre en el extremo 3' y un grupo fosfato en el extremo 5', unido al azúcar desoxirribosa (Dianov y Hübscher, 2013). Es requisito que el SSB tenga los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato, para que la ADN polimerasa incorpore el nucleótido correspondiente y la ADN ligasa pueda sellar los extremos sueltos del ADN. En la vía larga se requiere una mayor cantidad de enzimas para llevar a cabo la reparación, como lo son el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA por sus siglas en inglés), que sirve como proteína de andamiaje para la polimerasa, la ADN ligasa y la exonucleasa FEN 1. Esta última encargada de retirar la hebra que quedó colgando cuando la ADN polimerasa añadió más nucleótidos a la hebra rota (**Figura 7**). Se

han encontrado algunos componentes de la vía BER en el genoma de algunos parásitos como *E. histolytica*, los cuales podrían ser suficientes para llevar a cabo la reparación del ADN (Tabla 3).



**Fig. 7 Esquema del mecanismo de reparación BER.** Proceso de reparación por la vía corta y larga del mecanismo de reparación BER, que consiste en: 1) Reconocimiento del daño, remoción de la base dañada por medio de glicosilasas y escisión de la cadena en sitio AP. 2) relleno del sitio AP por medio de ADNpol. 3) Ligación de la cadena con la formación del enlace fosfodiéster por medio de una ligasa. Como se puede observar la cantidad de proteínas participantes en las subvías es diferente, al igual que el número de bases removidas de la cadena (Modificado de Xu *et al.*, 2008).

### 2.5.1. Proteínas que participan en la vía BER

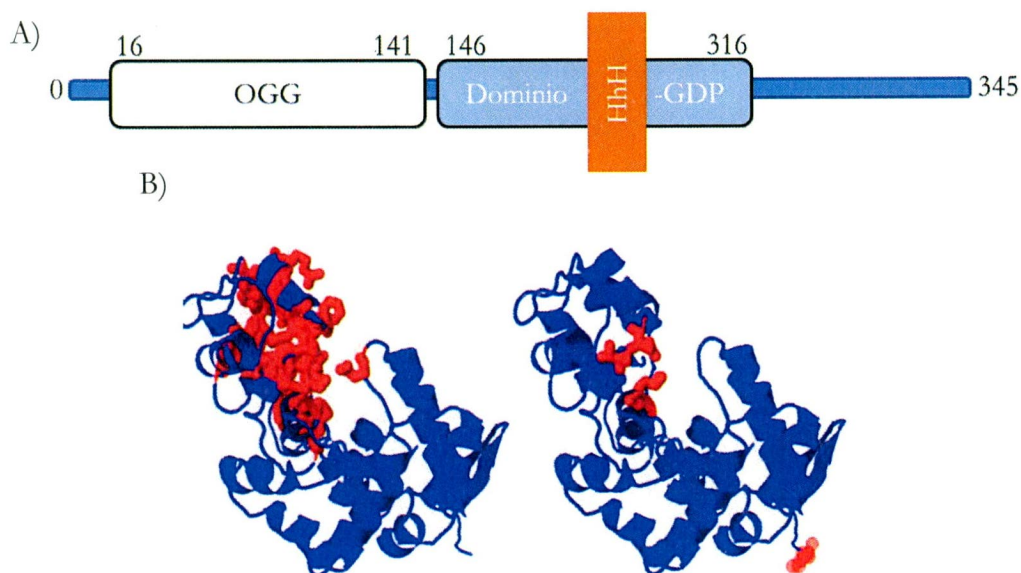
La vía de reparación BER inicia con el reconocimiento del daño, el cual se da a través de proteínas ADN glicosilasas, que son enzimas encargadas de romper el enlace N-glicosil entre la base dañada y la cadena de desoxirribosa generando un sitio AP. En el genoma de mamíferos se han identificado once genes codificantes para ADN glicosilasas. Las ADN glicosilasas se dividen en dos grupos: monofuncionales y bifuncionales. Estas últimas además de llevar a cabo la remoción de la base dañada, también son capaces de romper el enlace fosfodiéster en el extremo 3' del sitio AP (Krokan *et al.*, 1997). Las ADN glicosilasas también se pueden dividir en cuatro familias

estructuralmente distintas: uracil ADN glicosilasas (UDGs), glicosilasas hélice-horquilla-hélice (HhH), siendo los ejemplos más significativos OGG y NTH, las cuales contienen el motivo HhH-GPD que consta de HhH seguido de los residuos Gly, Pro y Asp (Krokan y Bjørås, 2013), 3-metil-purin-glicosilasa (MPG) y endonucleasas VIII-like (NEIL) (**Tabla 4**) (Jacobs y Schär, 2012).

**Tabla 4.** ADN glicosilasas de mamíferos

Tipo de lesión	Siglas	Nombre	Sustratos	Función M/B
Uracil en ssADN o dbADN	UDG	Uracil-N glicosilasa	U, 5-FU, ss y dsADN	M
	SMUG1	Uracil ssADN glicosilasa	U, 5-hmU, 5-FU ss ADN	M
Derivados de pirimidina en mismatches	MBD4	Dominio de unión-metilo glicosilasa 4	T, U, 5-FU, εC opuesto a G en ds ADN	M
	TGD	Timina ADN glicosilasa	T, U, 5-FU, εC 5hmU, 5-fc, 5-caC, opuesto a G en ds ADN	M
Bases oxidadas	OGG	8-OHdG ADN glicosilasa 1	8-OHdG, FaPy, opuesto C, en dsADN	B
	MYH	MutY	A opuesto a 8-OHdG, C o G en dsADN	M
Purinas alquiladas	MPG	Metilpurina glicosilasa	3-meA, 7-meG, 3-meG. Hipoxantinas εA, en ss y ds ADN	M
Bases oxidadas	NTHL1	Endonucleasa III-like 1	A opuesto a 8-OHdG, Tg, FaPyG, 5hC, 5hU, 5hC en dsADN	B
Anillo fragmentado o saturado en pirimidinas	NEIL 1	Endonucleasa VIII-like glicosilasa 1	Tg, FaPyG, FaPyA, 8-OHdG, 5hU, 5hC en ss y ds ADN	B
	NEIL 2	Endonucleasa VIII-like glicosilasa 2	As NTHL1 y NEIL 1	B
	NEIL 3	Endonucleasa VIII-like glicosilasa 3	FaPy, FaPyA preferentemente ssADN	B

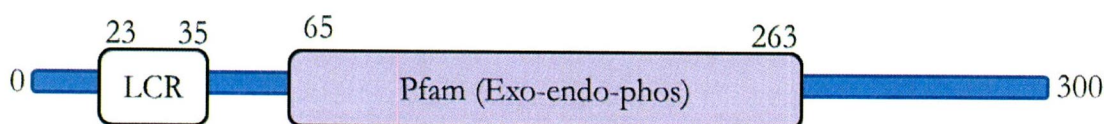
U, uracilo; A, adenina; T, timina; C, citosina; G, guanina; ss, single stranded; ds, double stranded; 5-hm, 5-hidroximetil; 5-FU, 5-fluorouracil; ε, eteno; 5-fC, 5-formilcitosina; 5-caC, 5-carboxilcitosina; 8-OHdG, 8-OH-7,8-dihidroguanina; Tg, timidin glicol; FaPy, 2,6-diamino-4-hidroxi-5-N-metilformamidopirimidina; me, metil; h, hidroxil; M, monofuncional; B, bifuncional. Modificada de (Jacobs y Schär, 2012).



**Fig. 8** Esquema de dominios funcionales y estructura terciaria de la proteína OGG de *H. sapiens*. **A)** En blanco se muestra el dominio OGG en la región N-terminal y en naranja el dominio HhH-GDP. El sitio catalítico está conformados por los aminoácidos K-168, V-185 y D-186. **B)** En la figura de la izquierda se muestran en rojo los motivos de unión al ADN y en la derecha en rojo se muestran sitios catalíticos de la enzima. Obtenido de Phyre<sup>2</sup>.

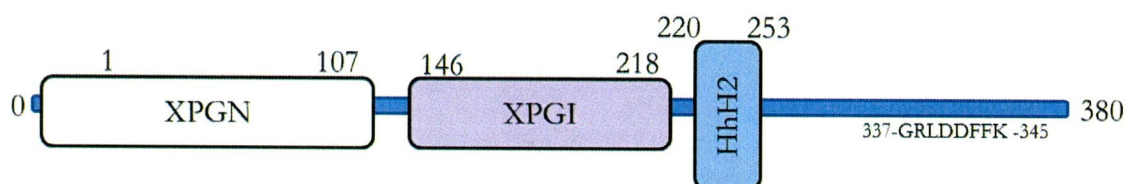
La proteína APEX endonucleasa es esencial en la vía BER en lesiones del ADN, causadas por oxidación y alquilación de bases (Tell *et al.*, 2010) y participa como endonucleasa en sitios AP.

Esta enzima está conformada por 300 aa y se divide en dos dominios: el N-terminal consta de una señal de localización nuclear y el dominio C-terminal tiene la actividad de endonucleasa (Pfam) (**Figura 9**). APEX no sólo está implicada como elemento clave en la vía BER, sino que también actúa como factor redox para la regulación de factores de transcripción, como modulador de ARNm y represor transcripcional (Li y Wilson, 2013).



**Fig. 9** Esquema de los dominios funcionales y estructura terciaria de la proteína APEX 1 de *H. sapiens*. En blanco se muestra el dominio Low Complexi Region (LCR) en la posición N-terminal y en verde el dominio Pfam que contiene el sitio de unión al ADN y catalítico (tomado de la base de datos SMART).

La especificidad de sustrato de FEN1 (**Figura 10**) permite procesar intermediarios en la maduración de los fragmentos Okazaki, también participa en la vía BER larga y en el mantenimiento de los telómeros. En la vía BER larga, la ADNpol  $\beta$  coopera con FEN 1 para eliminar el azúcar oxidado; la ADNpol empieza a añadir residuos de nucleótidos para rellenar el sitio AP, se agregan de 2 a 7 nucleótidos dejando una hebra de ADN colgando, la cual es escindida por FEN 1 (Zheng *et al.*, 2011).



**Fig. 10** Esquema de los dominios funcionales de FEN 1 de *H. sapiens*. El recuadro blanco representa el dominio Xeroderma pigmentoso G en la región amino (XPGN), el morado representa el dominio XPGI, el azul el dominio HhH2 y los aminoácidos que van del 337 al 345 son el motivo de interacción con PCNA (PIP box) (tomado de la base de datos SMART).

PCNA tiene una estructura altamente conservada (Naryzhny, 2008), que realiza una función esencial proporcionando a la ADN pol una alta capacidad de procesamiento para duplicar el genoma. PCNA adopta una estructura tridimensional de anillo que se acopla alrededor de la doble cadena de ADN (Maga y Hubscher, 2003). Cada anillo está formado por monómeros que se asocian en trímeros y cada monómero se compone de una asa conectora entre dominios (IDCL). El IDCL sirve para conectar los extremos N- y C-terminal, de cada monómero. A su vez IDCL es un sitio donde se

acoplan diferentes proteínas, tales como ADN pol  $\delta$ , p21, ADN ligasa 1 y FEN1. PCNA presenta varios motivos y residuos conservados en distintas especies, dentro de los motivos más importantes se encuentran: D-41 que es un residuo responsable de la estimulación de la ADN pol  $\delta$ ; Q-125, L-126, G-127 y I-128 que son esenciales para la unión de p21 y ADN pol  $\delta$ ; L-251, A-252, P-253 y K-254 son responsables del plegamiento apropiado de PCNA (Jonsson *et al.*, 1998; Maga y Hubscher, 2003).



**Fig. 11 Esquema de la estructura tridimensional de PCNA.** El anillo de PCNA es de aproximadamente 30 Å de ancho, está conformado por tres monómeros, la cara frontal contiene el IDCL y está involucrado en diversas interacciones proteína-proteína (Biasio, 2013).

Las ADN ligasas son un grupo de proteínas conservadas evolutivamente que catalizan la formación de enlaces fosfodiéster, son importantes en los mecanismos de replicación, reparación y recombinación del ADN. Dependiendo del tipo de cofactor que emplean, se dividen en dos familias: 1) las que usan  $\text{NAD}^+$  y 2) las que usan ATP. La primera familia  $\text{NAD}^+$  dependientes son empleadas por bacterias, mientras que la familia ATP dependiente la utilizan la mayoría de las células eucariontas, así como por arqueas y bacteriófagos (Shuman, 2009; Martin, 2002; Doherty, 2000).

En vertebrados se han identificado 3 ADN ligasas dependientes de ATP denominadas I, III y VI, que evolucionaron de una enzima ancestral común que es la nucleotidiltransferasa. La ADN ligasa I se encuentra probablemente conservada en todos los eucariontes y se ha demostrado que desempeñan un papel importante en la replicación, reparación y recombinación del ADN.

En levaduras la ADN ligasa I también funciona en la replicación y reparación del ADN mitocondrial, un papel que en eucariontes superiores es tomado por la ADN ligasa III, aunque también está presente en el núcleo donde participa en la reparación del ADN y quizás también en la recombinación meiótica. La ADN ligasa I es probable que se conserve en todos los eucariotas superiores, mientras que los ortólogos de la ligasa IV se han identificado y caracterizado en levaduras, plantas superiores y vertebrados (Martín, 2002).

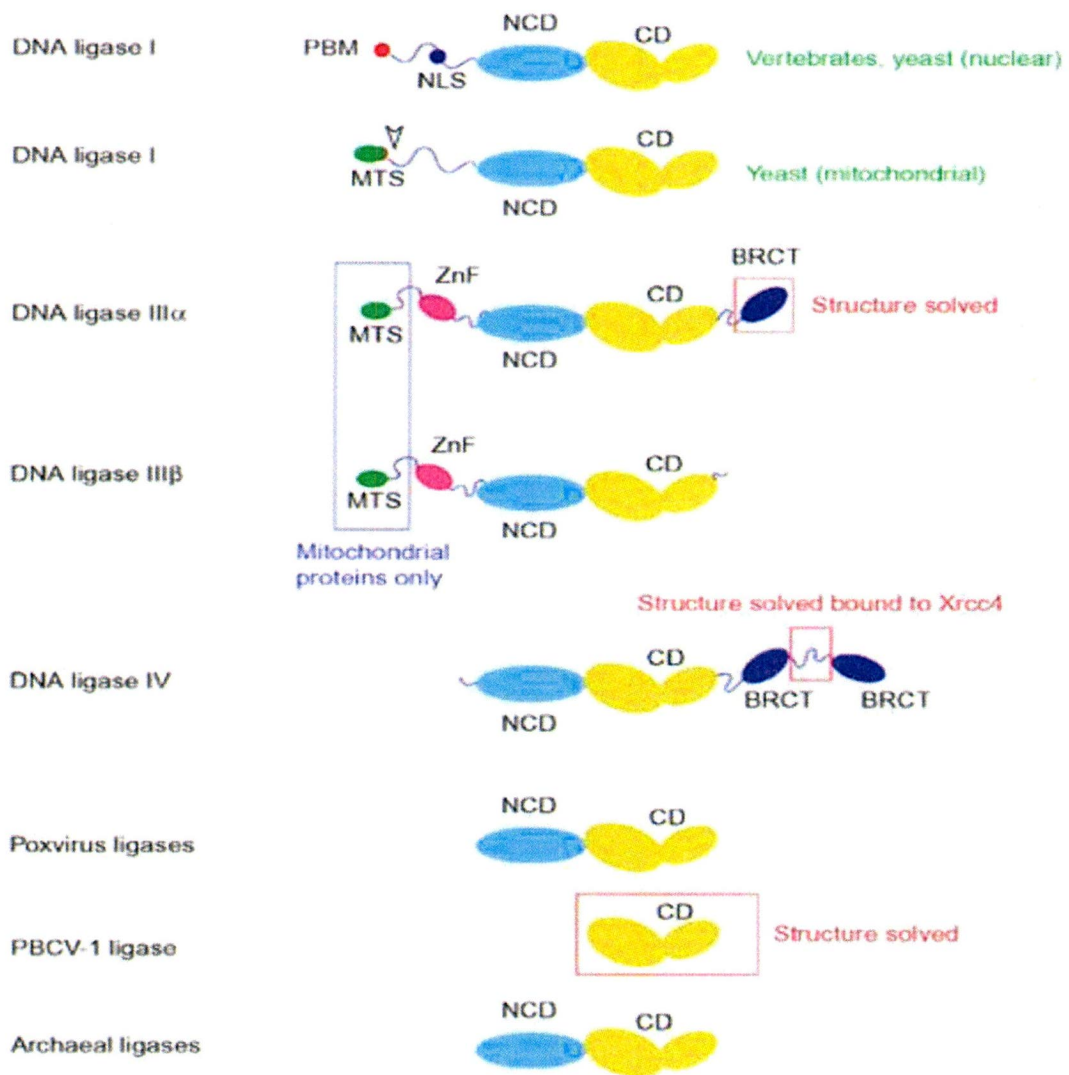
Todas las ADN ligasas eucariotas dependientes de ATP están relacionadas en secuencia y estructura, con excepción de la pequeña enzima viral PBCV-1. Las ligasas poseen dos dominios comunes: 1) el dominio catalítico (CD) o NTase, que comprende seis motivos conservados I, III, IIIa, IV, V-VI y que también son conservados en las ligasas NAD<sup>+</sup> dependientes (**Figura 12**). El motivo I incluye el residuo de lisina que se adenila, lo que se considera la primera etapa de reacción de ligación; 2) el dominio no catalítico (NCD) que se conserva débilmente entre los diferentes miembros de la familia. La función de este dominio es desconocido (Martín y MacNeill, 2002).

Además del dominio CD y NCD, la ligasa de ADN nuclear de diferentes especies en su dominio N-terminal de longitud variable, presenta una secuencia de localización nuclear (NLS) y un motivo conservado de unión a PCNA (PBM). PCNA mejor conocido como un factor de procesividad de la ADN polimerasa, juega un papel importante en la coordinación de las interacciones proteína-proteína. En levaduras, las diferentes posiciones del codón de inicio dan como resultado distintas isoformas de ADN ligasas, como la ADN ligasa I que contiene secuencias de localización nuclear y la ADN ligasa I con secuencias de localización mitocondrial (MTS). La forma nuclear de la proteína carece de MTS y se traduce a partir de un marco de lectura con AUG interno.

Así mismo, el gen de la ADN ligasa III utiliza un mecanismo similar para producir proteínas nucleares y mitocondriales. Además las alternativas de corte y empalme dan por resultado las

isoformas III $\alpha$  y III $\beta$ ; siendo la diferencia la secuencia C-terminal, que en la III $\alpha$  cuenta con un dominio BRCT. Este es un módulo de proteína autónomo implicado en la replicación y reparación del ADN. Además, III $\alpha$  y III $\beta$  tienen un motivo de dedos de Zn situado en el N-terminal. La ligasa IV se caracteriza por una extensión en C-terminal donde se presentan dos dominios BRCT, implicados en la unión al ADN del factor de reparación Xrcc1 (Martin y MacNeill, 2002) (**Figura 12**).

El proceso de ligamiento de la ADNlig dependiente de ATP, se lleva a cabo en tres pasos: el primero de ellos es la adenilación de la enzima, el siguiente paso consiste en la transferencia de AMP al extremo 5'-PO<sub>4</sub> de la hebra rota y por último la formación del enlace fosfodiéster (Doherty y Suh 2000; Martin y MacNeill, 2002; Shuman, 2009).



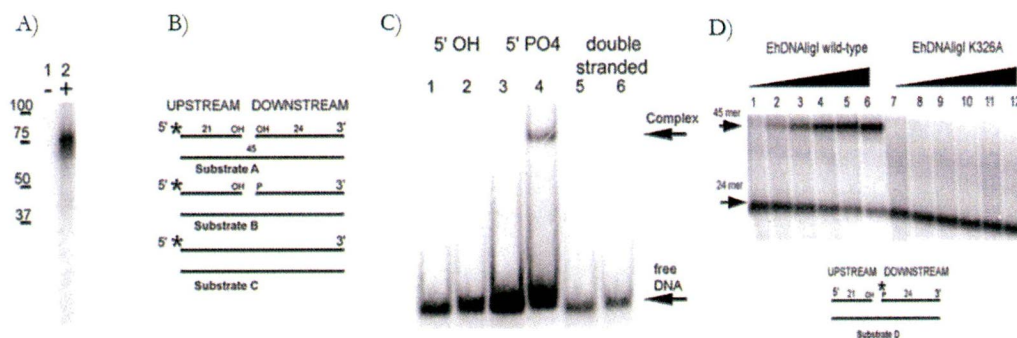
**Fig. 12 ADN ligasas presentes en organismos eucariontes.** Representación esquemática de las diferentes ADN ligasas donde se muestran sus diferentes dominios. (Tomado de Martin y MacNeill, 2002).

### 3. Antecedentes particulares del proyecto

La vía de reparación BER en *E. histolytica* parece estar incompleta debido a que hasta la fecha no se han reportado e identificado los genes que codifican para la glicosilasa OGG. La ausencia de OGG pudiera estar relacionada con la falta de compartimentos mitocondriales productores de ERO. Sin embargo, el genoma de *E. histolytica* presenta genes que codifican para ADN glicosilasas bifuncionales, es decir con actividad AP, como NTG1 y UNG1, las cuales podrían ser suficientes para llevar a cabo la reparación por la vía BER de ciertas lesiones en el ADN (López *et al.*, 2009).

Hasta el momento, se han caracterizado otras proteínas de esta vía en *E. histolytica*, como EhDNALigI y EhPCNA. *E. histolytica* contiene una sola ADNlig perteneciente a la familia I (EhDNALigI), que en vertebrados es responsable de llevar a cabo la formación de enlaces fosfodiéster durante la replicación y reparación del genoma. EhDNALigI consta de una secuencia de 685 aminoácidos, con una identidad del 35% comparada con la ADN ligasa de humano. EhDNALigI conserva seis motivos catalíticamente importantes en la súper familia de las nucleotidil transferasas. EhDNALigI contiene un motivo de unión a PCNA canónico en los residuos 4-11 (QSSLSRFF) en el extremo N-terminal; así como, una región de unión al ADN que va desde el residuo 39 hasta el 292, en tanto que el motivo de adenilación lo componen los residuos 293 a 505.

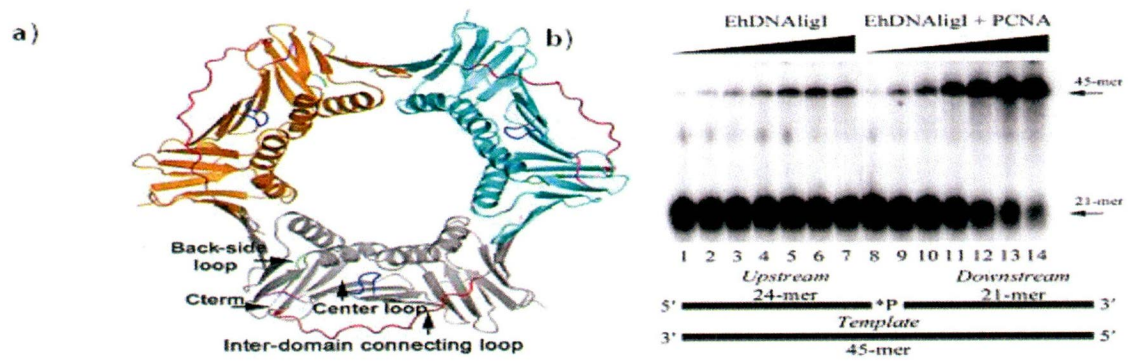
La localización de la proteína EhDNALigI es tanto citoplasmática como nuclear, observándose enriquecida en ésta última. Ensayos bioquímicos realizados *in-vitro* con la proteína recombinante, mostraron que EhDNALigI posee la capacidad de llevar a cabo los tres pasos conservados de la reacción de ligación (**Figura 13**) (Cardona *et al.*, 2010).



**Fig. 13 Determinación de la actividad de EhDNALigI de *E. histolytica*** A) Ensayo de adenilación de la enzima. B) Templados de ADN utilizados para evaluar la especificidad de transferencia de AMP al extremo 5' PO<sub>4</sub>. C) Ensayo de transferencia al extremo 5' PO<sub>4</sub>. D) Formación del enlace fosfodiéster con la formación del templado de 45 mer, el cual va siendo evidente conforme se aumenta la concentración de EhDNALigI (Cardona *et al.*, 2010).

Como se puede observar en la **Figura 13 (A)**, la EhDNALigI tiene la capacidad de adenilarse, así como de unirse y transferir el AMP sólo al extremo 5' PO<sub>4</sub> (**Figura 13 B**), y de formar el enlace fosfodiéster (**Figura 13 D**).

La proteína PCNA de *E. histolytica* (EhPCNA) forma homotrímeros que forman un anillo, donde cada monómero consta de dos dominios globulares conectados por una asa entre dominios muy similares a la de *H. sapiens* y *S. cerevisiae*. PCNA estimula la interacción de proteínas tales como FEN 1 y ADNlig con el ADN, principalmente a través de su motivo PIP box. En humanos, el complejo entre el ADN y la ADN ligasa I (HsPCNA) estimula la actividad de la ADN ligasa I alrededor de cinco veces (Tom *et al.*, 2001). En *E. histolytica*, EhPCNA además de interactuar con EhDNALigI (**Figura 14a**), estimula aproximadamente cuatro veces la actividad de EhDNALigI para formar el enlace fosfodiéster (**Figura 14b**) (Cardona *et al.*, 2011). Sin embargo, EhDNALigI y EhPCNA no se han caracterizado *in-vivo* en *E. histolytica*.



**Fig. 14** Estructura tridimensional de EhPCNA e incremento en la actividad de ligación de EhDNALigI por EhPCNA. a) Estructura cristalográfica de EhPCNA en homotrimeros. b) cuando EhPCNA se encuentra presente, la EhDNALigI aumenta la formación de enlaces fosfodiéster (tomado de Cardona *et al* 2011).

## II. Justificación

*E. histolytica* es un parásito anaerobio aerotolerante, el cual va a estar expuesto a diversas ERO y ERN cuando se encuentra colonizando el epitelio intestinal, por lo que se ha visto obligado a desarrollar diversas estrategias que le han permitido adaptarse a las ERO. Estudios recientes, han propuesto que el fenotipo de virulencia de *E. histolytica* está relacionado con la capacidad de reducir ERO, generando resistencia ante un estado oxidante que conlleva a su supervivencia. Hasta el momento, se han evidenciado algunas de las proteínas con función antioxidante; así como, las lesiones que sufren las proteínas cuando *E. histolytica* se encuentra sometida a estrés oxidativo mediante el uso de  $H_2O_2$ . Sin embargo, hasta el momento no existen reportes del daño al ADN como consecuencia de un desbalance entre las ERO y los sistemas de defensa antioxidante. Por lo que el presente estudio pretendió evidenciar el daño al ADN generado por  $H_2O_2$ , a través de la formación del aducto 8-OHdG; así como, determinar los cambios de expresión de algunos genes que podrían participar en la vía BER. Así mismo, localizar mediante microscopía confocal las proteínas EhDNALigI y EhPCNA lo que sugeriría su posible participación en la reparación del daño al ADN.

### III. Hipótesis y objetivos

#### 1. Hipótesis

En el genoma de *E. histolytica* existen genes putativos para la vía BER, por lo que el modelo de estrés oxidativo con  $H_2O_2$  generará daño al ADN, cambios en la expresión de genes involucrados en la vía de reparación BER, así como, modificaciones en la localización nuclear de EhDNALigI y EhPCNA.

#### 2. Objetivos

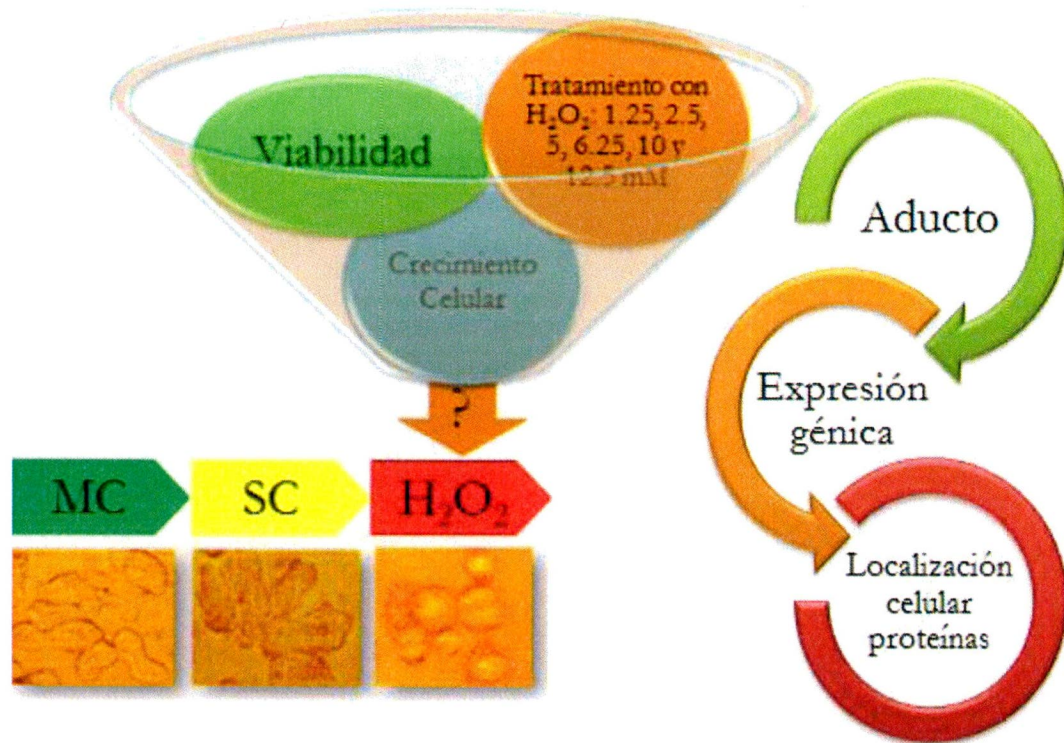
##### 2.1. Objetivo General

Determinar el daño al ADN generado por estrés oxidativo generado por  $H_2O_2$ , así como evaluar la expresión relativa de genes de la vía BER y analizar la localización de las proteínas EhDNALigI y EhPCNA después del tratamiento con  $H_2O_2$ .

##### 2.2. Objetivos Particulares

- 1) Determinar la concentración de  $H_2O_2$  que mantenga la viabilidad y proliferación de trofozoítos de *E. histolytica*.
- 2) Identificar y cuantificar el daño al ADN a través de la formación del aducto 8-OHdG en respuesta al tratamiento con  $H_2O_2$ .
- 3) Evaluar los cambios en la expresión de genes que codifican para proteínas putativas involucradas en la reparación del ADN por la vía de BER, en respuesta al tratamiento con  $H_2O_2$ .
- 4) Determinar la localización de EhDNALigI y EhPCNA en trofozoítos de *E. histolytica*, en respuesta al tratamiento con  $H_2O_2$ .

#### IV. Estrategia experimental



**Fig. 15 Esquema del diseño experimental.** Se expuso a los trofozoítos de *E. histolytica* a distintas concentraciones de  $H_2O_2$ , posterior al tratamiento se evaluó su viabilidad y crecimiento celular. Se eligió la concentración no letal para la ameba y se procedió a evaluar la formación del aducto por microscopía confocal; se evaluó la expresión de genes involucrados en la vía BER; así como, la localización celular de las proteínas EhDNALigI y EhPCNA.

##### 1. Cultivo *in-vitro* de trofozoítos de *E. histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HMI:IMSS-Clona A, se cultivaron en medio TYI-S33 complementado con 3% de vitaminas Diamond (Sigma-Aldrich), suplementado con 20% de suero bovino (Microlab), penicilina (100 U/mL) (Pengesod) y estreptomycin (100  $\mu$ g/mL) (SULFESTREP), en frascos de cultivo celular e incubadas a 37°C. Para cada experimento, los trofozoítos se cosecharon en la fase logarítmica, para lo cual las cajas se enfriaron a 4°C, el contenido se decantó en tubos cónicos de 50 mL y se centrifugaron a 500 g durante 5 min a 4°C.

## 2. Grupos Experimentales

Un total de 800,000 trofozoítos fueron incubados durante 25 min en medio TYI-S33 completo, en tubos de vidrio de 12 mL. Pasado este tiempo se decantó el medio y se agregó medio nuevo según los siguientes grupos experimentales: 1) trofozoítos en medio TYI-S33 completo, el cual se tomó como grupo control (C); 2) trofozoítos que estuvieron en medio TYI-S33 no complementado y sin cisteína (Cys-); 3) trofozoítos se incubaron en medio TYI-S33 no complementado y sin cisteína e incubados con diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  (1.25, 2.5, 5, 6.25, 10 y 12.5 mM) grupo experimental ( $H_2O_2$ ). Todos los grupos se mantuvieron en un volumen de 12 mL de medio durante 1h a 37°C.

## 3. Cinéticas de viabilidad y crecimiento

La viabilidad de los trofozoítos con los diferentes tratamientos, se midió por medio de la tinción con azul de tripan 0.4% (Bio-Rad) y el contador automatizado de BIORAD TC10 (BIORAD Laboratories Inc., proporcionado amablemente por el Dr. Cesar López Camarillo. La viabilidad se determinó contando el número de amibas viables las cuales tienen la capacidad de excluir el colorante; mientras que los trofozoítos no viables, el colorante difunde en ellas observándose de color azul. Para evaluar el crecimiento celular después del tratamiento, se cambió el medio y se agregó medio TYI-S33 completo y se dejó recuperar a los trofozoítos por 24 h. Posteriormente a las 24 h, se realizó el conteo de trofozoítos y se midió la viabilidad a través del contador automatizado de BIORAD TC10. Para evaluar el crecimiento celular, después del tratamiento 2.5 mM de  $H_2O_2$  se cambió el medio de la condición  $H_2O_2$  y se agregó medio TYI-S33 nuevo completo y se dejó recuperar por 1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas. Se realizó el conteo de trofozoítos en cada tiempo a través

del contador automatizado de BIORAD TC10 y se determinó el porcentaje de viabilidad de las células; así como, el número de ellas para evaluar capacidad de crecimiento.

#### 4. Identificación del aducto 8-OHdG

Para la identificación del aducto 8-OHdG, se realizaron preparaciones, que posteriormente fueron visualizadas por microscopía confocal de acuerdo al protocolo de Furtado (2012), se procedió a poner cubreobjetos limpios y estériles en cajas de cultivo de 6 pozos, donde posteriormente se incubaron 800,000 amibas por 25 min. a 37°C, una vez adheridas las amibas al cubreobjetos, se decantó el medio y se agregó nuevo medio según tratamiento. Para el grupo experimental control “C” solo se agregó medio TYI-S33 completo, para el segundo grupo experimental “Cys-” se agregó medio TYI-S33 no complementado sin cisteína y para el tercer grupo “H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>” medio no complementado sin cisteína, se dio tratamiento a 5 cubreobjetos con trofozoítos a una concentración 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1 h, para las condiciones de recuperación post-tratamiento de 0, 1, 3, 6 y 12 horas. Posteriormente, los trofozoítos fueron fijados y permeabilizados con etanol absoluto (Sigma-Aldrich) a -20°C e incubadas 20 min. Una vez pasado este tiempo, se lavaron 2 veces los cubreobjetos con PBS 1x pH 6.8 (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) estéril, el cual fue removido cuidadosamente, se agregó RNasa A (100µg/mL) e incubó media hora a 37°C, se procedió a realizar nuevamente 2 lavados con PBS. Posteriormente, se incubaron los trofozoítos con avidina-FITC-conjugados (1:50) (Sigma-Aldrich) por una hora a temperatura ambiente y en oscuridad, pasado este tiempo el núcleo fue teñido con 2-(4-Amidinofenil)-6-indolecarbamidina dihidrochloride, 4',6-Diamidino-2-fenilindole dihidrochloride (DAPI) (Sigma-Aldrich) a una concentración (3.3µg/mL) e incubados por 5 min. en oscuridad, se realizaron 5 lavados con PBS y finalmente se procedió a montar los cubreobjetos en portaobjetos limpios y estériles con 15 µL de

Vectashield. Las imágenes fueron analizadas por microscopía confocal (Leica Microsystems) y analizados con el software Confocal Assistant software Image (Agradecimiento especial al M. en C. Eduardo Carrillo Tapia quien colaboró en la presente investigación, para visualizar las preparaciones y en el manejo del microscopio).

## 5. Búsquedas de sus ortólogos putativos de la vía BER en *H. sapiens*, *S. cerevisiae* y otras especies

Para cada componente de las proteínas de la vía BER en *E. histolytica*, se realizaron búsquedas por sus ortólogos putativos en *H. sapiens*, *S. cerevisiae* y otras especies utilizando Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) contra la base de datos NCBI RefSeq de proteínas delimitada al organismo correspondiente y toda la base de datos para encontrar la de mayor correspondencia de secuencias. El porcentaje de identidad (PID) se calculó usando secuencias de aminoácidos de proteínas de la vía BER de *E. histolytica*, *H. sapiens*, *S. cerevisiae* y el organismo con mayor correspondencia.

Basados en la revisión bibliográfica y en la búsqueda de genes (**Amoeba DB**) que pudieran estar codificando para proteínas de la vía BER se diseñaron oligonucleótidos, los cuales sirvieron para evaluar la expresión génica de la vía BER en *E. histolytica* cuándo esta es sometida a estrés oxidativo usando como modelo un tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **6. Extracción del ADN genómico**

El ADN genómico se obtuvo de 3 millones trofozoítos de la cepa HMI:IMSS Clona-A, mediante el uso del kit Wizard Genomic ADN Purification (Promega). La extracción se llevó a cabo en cuatro pasos, los cuales se describen en breve: el primer paso fue la lisis celular y nuclear de los trofozoítos, posteriormente se dió tratamiento con RNasa A (Thermo Fisher Scientific), se precipitaron las proteínas, se precipitó el ADN con isopropanol y re-suspendió en solución de rehidratación. Se cuantificó en un NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) y se llevó a una concentración de 100 ng/ $\mu$ L. El ADN fue empleado como control positivo de las reacciones de RT-PCR en tiempo final.

## **7. Extracción y purificación de ARN**

Se extrajo ARN total de 3 millones de amibas para los grupos C, Cys- y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La extracción se llevó a cabo por medio del reactivo TriZOL (Invitrogen). Las amibas fueron despegadas de las cajas de cultivo incubándolas a 4°C por 10 min. y transferidas a tubos cónicos de 50 mL, se centrifugaron por 500 g durante 5 min a 4°C para la obtención de la pastilla celular, se decantó el medio y se re-suspendió la pastilla en 1 mL de medio de cultivo en condición basal (Medio TYI-S33 sin complementar), se transfirió el homogenizado a tubos de 1.5 mL, se realizó una segunda centrifugación con las condiciones anteriores, se decantó y se agregó 1mL de TriZOL.

Una vez en TriZOL los trofozoítos de los grupos experimentales se mantuvieron a -70°C por dos días. Posteriormente se incubaron a temperatura ambiente por 15 min., se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos, se incubaron durante 3 min. a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 g, 15 min. a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo y se añadió 0.5 mL de isopropanol al 100%, se agitó e incubó por 10 min. a temperatura

ambiente, se centrifugó a 12,000 g, 10 min. 4°C. La pastilla obtenida fue lavada con 1 mL de etanol al 75% y centrifugada a 7500 g, 5 min. 4°C, consecutivamente se decantó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. El ARN obtenido se hidrató con 100 µL de agua libre de nucleasas en un termoblock a 37°C y se cuantificó en NanoDrop. En base a la cantidad de ARN obtenido se trató con DNasa (Ambion AM 2222 de Promega) 2U por cada 10 µg de ARN durante 30min. a 37°C.

Del volumen obtenido en la extracción de ARN y posterior tratamiento con DNasa, se agregó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sigma-Aldrich) en un volumen 1:1, se agitó durante 15 seg. y se centrifugó a 12,000 g durante 15 min. a 4° C. Se recuperó la fase acuosa transfiriéndola a otro tubo estimando el volumen obtenido y se agregó acetato de amonio 0.5 M en base a la siguiente relación:

Vol. Acetato de amonio= (volumen estimado/6.5)

Posteriormente, se agregó isopropanol en una relación 1:1, se incubó en hielo por 10 min., pasado este tiempo se centrifugó por 14,000 g por 20 min., se decantó y lavó la pastilla con 200 µL de etanol al 75%, se dejó secar a 37°C y se agregó 100 µL de agua libre de nucleasas. Se agregó acetato de amonio en base a la relación anteriormente citada y del total del volumen obtenido se agregó etanol absoluto en una relación 3:1, para precipitar el ARN, el cual se almacenó a -70°C para su uso posterior.

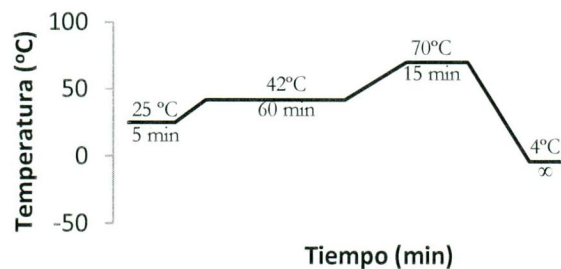
## **8. Análisis de la expresión génica del Mecanismo de Reparación por Escisión de Bases mediante RT-PCR**

El diseño de oligonucleótidos se realizó en base a la secuencia de genes completos de la base de datos de Amoeba DB. Los oligonucleótidos se diseñaron para ser utilizados como cebadores en la amplificación de los genes de estudio en las reacciones de PCR. Finalmente se realizó un Blastn

contra el genoma de *E. histolytica* para confirmar que los oligonucleótidos fueran específicos para cada gen de estudio (**Tabla 7**). Se determinó de forma semi-cuantitativa la expresión de genes de la vía BER (*ebmuty*, *ebnth*, *ebnth-like*, *ebapex*, *ebfen1*, *ebdnaligI* y *ebpcna*) mediante RT-PCR para cada uno de los grupos experimentales, se tomaron 20µL del ARN, se centrifugaron a 14,000 g por 20 min. 4°C, se decantó el sobrenadante, se lavó 2 veces con etanol (Sigma-Aldrich) al 75% y se realizó un segundo decantado, se dejaron secar las pastillas a 37°C y se hidrataron con 10 µL agua libre de nucleasas. Una vez hidratadas las pastillas se cuantificaron en el NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) y se llevó a una concentración de 500 ng/µL, del cual se tomó 1 µL para la mezcla de ARN (**Tabla 5**). Así mismo, se realizó una mezcla de reacción de retrotranscripción (**Tabla 5**), se homogenizaron las dos mezclas y se obtuvo cADN según condiciones de síntesis **Figura 16**, para la amplificación de genes de la vía BER.

**Tabla 5.** Condiciones para la obtención de cADN

Reactivo	Volumen µL	Reactivo [ ] final	RT(+) µL	RT(-) µL
ARN	1	Buffer RT 1x	4	4
Odt 0.02M	1	MgCl <sub>2</sub> 25mM 6mM	4.8	4.8
Agua	3	dNTPs 0.5mM	1	1
Vol. Reacción	5	ARNsin 1U/ µL	1	1
70°C 5 min.		Agua	3.2	4.2
		RT Improm II (Promega)	1	0
		Vol. Reacción	15	15

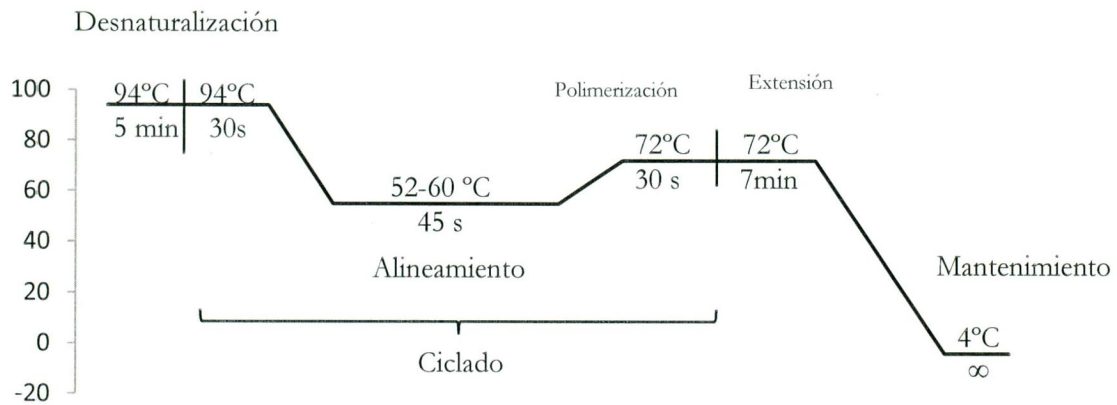


**Fig. 16 Condiciones de síntesis de cADN.** 5 min. temperatura ambiente para alineamiento; 1 h a 42°C para extensión; 15 min. a 70°C para inactivación.

Para amplificar los genes de la vía BER se utilizó Go Taq (Promega), se realizó la mezcla de reacción para la cual se empleó 1µL del cADN obtenido para cada una de las reacciones de PCR con los siguientes reactivos y condiciones de amplificación como se describe en la siguiente tabla (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Mezcla de reacción PCR

Reactivos	µL
5x Green Buffer --- 1x	5
MgCl <sub>2</sub> ---2.5Mm	2.5
DNTPs	0.5
Go Taq	0.125
Agua	13.875
Oligo S	1
Oligo AS	1
ARN	1
Vol. Reacción	25



**Fig. 17 Condiciones de amplificación por PCR de los genes de la vía BER.** Las Condiciones de amplificación constan de 3 pasos: 1) Desnaturalización a una temperatura de 94°C; 2) Ciclado el cual va a contener la desnaturalización por 30s, alineamiento el cual se va a encontrar en un rango de temperatura de 52-60°C y polimerización el cual se llevó a una temperatura de 72°C por 30s; 3) extensión

**Tabla 7.** Secuencias de oligonucleótidos para los genes de la vía BER.

Gen	Locus	Función	Secuencia oligonucleótidos (5'-3')	TA	Ciclos amplificación	Amplicón (pb)
<i>Ebmuty</i>	EHI_010700	Glicosilasa	L: TTACAACAAACACAAGTA R: ATTTATCAACACTAGAAGG	52	30	214
<i>ebnth</i>	EHI_083460	Glicosilasa	L: TTAAATGAGTTATTAGATGG R: TGGTCAACAGTAATACCTTC	60	30	206
<i>Ebnth-like</i>	EHI_118790	Glicosilasa	L: AAGTTGCATGAAACTCTT R: GGTCCAACACCAGGAAGTG	56	30	206
<i>ebapex1</i>	EHI_046670	Endonucleasa	L: CCTGATATTTTATGTGTTC R: TTTCTCATATTCAACTGT	54	30	210
<i>ebfen1</i>	EHI_099740	Endonucleasa	L: GAAGGTACTTGTGCTGCATTAG R: CATCCAAGTAAAATACAAAGG	60	30	218
<i>ebdnaligI</i>	EHI7A_158980	Ligasa	L: ACTGCTGAATATAAGTATG R: TTGAATGAACTGATACTCC	52	32	259
<i>Ebpcna</i>	EHI_128450	Procesividad de la polimerasa	L: GCACTTGACAATGATTGTGG R: GTAATTTTGAGGAATTCTGC	56	26	200
<i>ebribosomal 40s</i>	EHI_020280	Control de carga	L: ATTTCGGAAATAGAAGAGGAGG R: ACTAATCTTCCAAGCTTGGT	56	22	104

\*Con base en AmoebaDB

## 9. Evaluación de la expresión génica de EhDNALigI y EhPCNA mediante qRT-PCR

Se evaluó la expresión génica de EhDNALigI y EhPCNA mediante qRT-PCR utilizando la tecnología Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System. La amplificación fue realizada en placas de 96 pozos. Se tomaron 100 ng de ARN extraído de los grupos C, Cys- y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> éste último tratado con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la reacción se llevó a cabo en un solo paso de acuerdo al protocolo “QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen)”. En la **Tabla 8** se muestran las secuencias de oligonucleótidos utilizados para qRT-PCR.

**Tabla 8.** Secuencias de oligonucleótidos de *ehdnaligI* y *ehpcna* empleadas en qRT-PCR

Gen	Secuencia	Temperatura de alineamiento
<i>ehdnaligI</i>	S: GATTAGCCGATACAGTTGAC AS: GAGATGAAGACAGTGGAGAT	60 °C
<i>Ehpcna</i>	S: TCCAGAACTTCAATCTGA AS: AGCACCTTTAGTAGTGAGAG	60 °C

\*Diseñados a partir del servidor primer Blast

Para el análisis de la expresión relativa del ARNm de los dos genes, se procedió a evaluar la expresión del gen de interés y el de referencia de los grupos C, Cys- y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como, para el calibrador mediante  $\Delta\Delta Ct$ . Los resultados se normalizaron con el gen de expresión constante para asegurar que las variaciones observadas en la expresión, fueron realmente debidas a cambios de expresión y no a una cantidad variable de muestra añadida entre los ensayos.

### Calculo $\Delta\Delta Ct$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (Gen interés tratado-Gen referencia tratado) -  $\Delta Ct$  (Gen interes control-Gen referencia control)

Fold change =  $2^{\Delta\Delta Ct}$

## 10. Localización de la EhDNALigI y EhPCNA por Microscopía Confocal

Para la localización de EhDNALigI y EhPCNA, se produjeron anticuerpos policlonales en el laboratorio de la Dra. Esther Orozco, especial reconocimiento a la Dra. Guillermina García quien estuvo a cargo la etapa de su obtención a partir de rEhDNALigI y rEhPCNA, los cuales fueron expresados de forma heteróloga en el laboratorio del Dr. Luis Brieba (Cardona *et al.*, 2009; Cardona *et al.*, 2011). Para ello, fue inoculado por vía subcutánea la proteína recombinante rEhDNALigI con una dosis inicial de 130 µg y diluida en adyuvante completo de Freund (Sigma) y 4 inyecciones más de refuerzo (130 mg cada una) a intervalos de 21 días. Después de una semana de la última inmunización, los conejos se sangraron y se obtuvieron anticuerpos policlonales. Antes de la inmunización, se obtuvo el suero pre-inmune. También se obtuvieron anticuerpos  $\alpha$ -rEhPCNA de ratón, para ello se inmunizaron los ratones con 150 µg de dosis inicial y seis dosis semanales, usando las mismas condiciones como se describió anteriormente. Todos los protocolos de inmunización y sangrado se hicieron de acuerdo al protocolo No. 0313-06, CICUAL 001 del Cinvestav. Este protocolo cumple con lo estipulado en la norma NOM-062-ZOO-1999, en el cual se establece las especificaciones y el cuidado adecuado de los animales.

Para la localización y colocalización de las proteínas EhDNALigI y EhPCNA se realizaron preparaciones, que posteriormente fueron visualizadas por microscopía confocal.

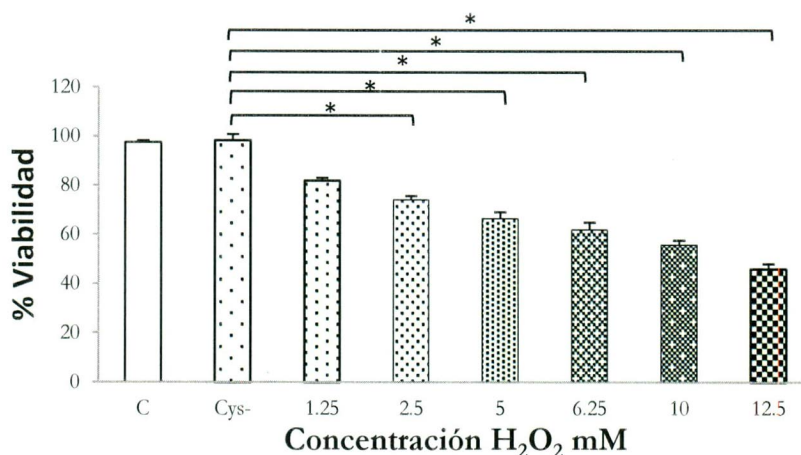
Para ello, se procedió a colocar cubreobjetos estériles en cajas de cultivo de 6 pozos y se incubaron 800,000 amibas por 25 min. a 37°C. Una vez adheridas las amibas al cubreobjetos, se decantó el exceso de medio y se agregó medio según el tratamiento, tanto para el grupo control “C”, para el segundo grupo experimental “Cys-” y para el tercer grupo “H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>”, se procedió a dar tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de de 2.5 mM durante 1 h a trofozoítos adheridos a cubreobjetos, para las condiciones de recuperación post-

tratamiento de 0, 1, 3, 6, 12 y 24 horas. Posteriormente, las células fueron fijadas y permeabilizadas con etanol absoluto  $-20^{\circ}\text{C}$  e incubadas 20 min., una vez pasado este tiempo se lavaron 2 veces los cubreobjetos con 1 mL de PBS el cual fue removido, se agregaron los anticuerpos primarios anti-EhDNA LigI (anticuerpo policlonal generado en conejo) y anti-PCNA (anticuerpo policlonal generado en ratón) mezclados en una solución con PBS a una dilución de 1:100, se dejaron incubar toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS, se añadió e incubó el anticuerpo secundario  $\alpha$ -conejo FITC y  $\alpha$ -ratón TRITC por 1h a  $37^{\circ}\text{C}$ , se volvieron a realizar tres lavados con PBS, para posteriormente teñir el núcleo con DAPI a una concentración ( $3.3\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubados por 5 min. en la oscuridad, se realizaron 5 lavados con PBS y finalmente se procedió a montar los cubreobjetos en portaobjetos estériles con 15  $\mu\text{L}$  de Vectashield (Vector Laboratories) y las imágenes fueron capturadas con el microscopio confocal (Leica Microsystems).

## V. Resultados

### 1. Resistencia de trofozoítos durante el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

El aducto 8-OHdG es un tipo de daño al ADN que puede ser originado por varios tipos de insultos, entre los que se encuentran el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En *E. histolytica* tratamientos con 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producen cambios en la expresión de genes que codifican para proteínas con función antioxidante importantes en la eliminación de esta ERO. Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado que produzca daño al ADN como consecuencia del desbalance entre las EROs y las proteínas con función antioxidante. Con la finalidad de hallar la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adecuada para generar el aducto 8-OHdG, pero que no afecte la capacidad de crecimiento y la viabilidad celular, los trofozoítos fueron incubados a distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.25, 2.5, 5, 6.25, 10 y 12.5 mM) durante 1h y posteriormente se evaluó su viabilidad. El grupo experimental al cual se le dió tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se le eliminó la cisteína para evitar el efecto protector antioxidante de este aminoácido (grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En la figura 18 se puede observar que la viabilidad del grupo C (sin tratar en presencia de medio completo) y la del grupo Cys- (Medio sin cisteína) no se afectó, pues se mantuvo la viabilidad cercana al 100%. En el caso de la viabilidad de los trofozoítos del grupo tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ésta disminuyó de forma dosis dependiente, en las diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizadas (2.5, 5.0, 6.25, 10 y 12.5 mM) en un 25.85, 33.52, 38, 44.18 y 50.54% respectivamente con respecto al grupo Cys-. Mientras que el grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sometido a una dosis a la dosis de 1.25 mM no presentó diferencias significativas en relación al grupo control. Estos resultados muestran, por una parte que la depleción de cisteína y el tratamiento con 1.25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no modifican la viabilidad y que el tratamiento a una concentración 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sería la indicada para generar estrés oxidativo en la célula.



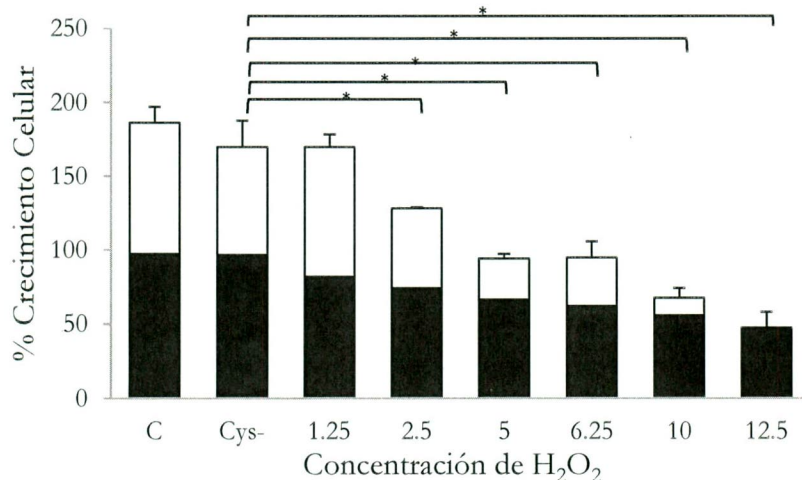
**Fig. 18 Ensayo de viabilidad de los trofozoítos con distintos tratamientos.** Los trofozoítos fueron tratados con medio completo (C), medio sin cisteína (Cys-) y con diferentes concentraciones H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por una hora y posteriormente se determinó su viabilidad con azul de tripano. Los valores representan el promedio  $\pm$ EE del porcentaje de viabilidad de tres experimentos independientes. \*Diferencias estadísticamente significativas. Utilizando la prueba estadística de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer ( $*p \leq 0.05$ ).

## 2. Cinética de crecimiento celular

El estrés oxidativo generado con la exposición de los trofozoítos al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede propiciar daño a las biomoléculas tales como: lípidos, proteínas y ADN. Por lo que; la evaluación de la proliferación con un resultado en el incremento de la población después de 24 h de recuperación de los grupos, es un buen indicativo de recuperación de los trofozoítos, lo cual podría sugerir la capacidad de reparar los daños infringidos en estas biomoléculas. Para ello se determinó la capacidad de los trofozoítos de proliferar posterior al tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> después de 24 horas de recuperación. Para ello el medio con el cual se trataron a los trofozoítos de todos los grupos, se sustituyó por medio completo y estos se dejaron recuperar por 24 horas. Al cabo de este tiempo se cuantificó el número de trofozoítos para determinar el porcentaje de crecimiento celular.

Como se puede observar en la **Figura 19** el grupo C y Cys-, así como el grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sometido a una dosis de 1.25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementaron su población celular en un rango del

70 al 80%; mientras que los grupos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sometidos a concentraciones de 2.5, 5.0, 6.25, 10 y 12.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentaron un incremento en su población celular en un 54.1, 27.7, 32.5, 11.8 y 1.43%, respectivamente.



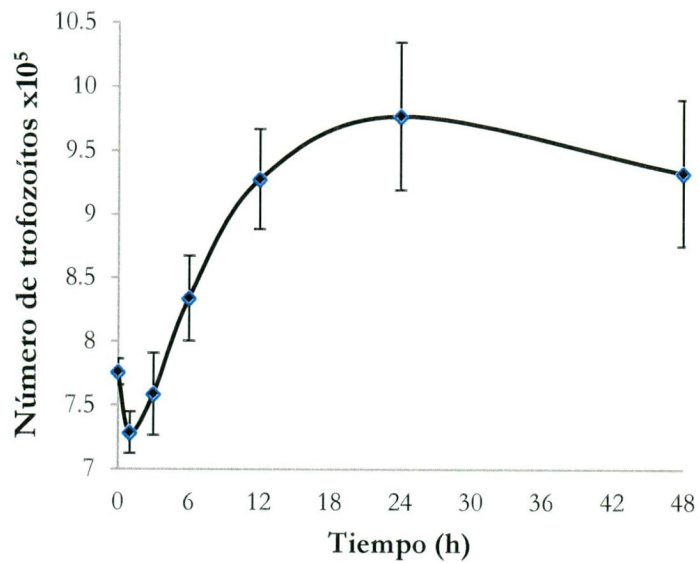
**Fig. 19 Crecimiento celular de los trofozoítos de *E. histolytica* post-tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 24 h de recuperación.** Las barras negras muestran el porcentaje de viabilidad de los diferentes grupos post-tratamiento. Las barras blancas muestran el porcentaje de crecimiento celular después de 24 horas de recuperación. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  E.E de tres experimentos independientes. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con C (\* $p \leq 0.05$ ). Utilizando la prueba estadística de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer.

Los resultados anteriores de viabilidad y de crecimiento celular de trofozoítos mostraron que la dosis de 1.25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no modificó significativamente la viabilidad y el crecimiento celular. Por otra parte, concentraciones mayores a 5.0 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyeron la viabilidad en al menos un 35% post-tratamiento, de igual manera redujeron el crecimiento celular en alrededor del 69% o más. Por lo tanto en este trabajo se seleccionó la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 2.5 mM, ya que en esta concentración los trofozoítos presentaron una viabilidad de alrededor del 75% post-tratamiento y un incremento en su población celular del 54% después de 24 horas de recuperación. Con base en los resultados obtenidos, para los ensayos subsecuentes se empleó la concentración 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ya que a esta concentración se

observaron diferencias estadísticamente significativas tanto en la curva de viabilidad (75%) como en la cinética de crecimiento (54%) comparado con el grupo control.

### 3. Cinética de crecimiento post-tratamiento 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Los trofozoítos tratados con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se mantuvieron viables y con la capacidad de proliferación, aunque en menor medida que los trofozoítos controles, lo que sugiere un probable daño al ADN con la posible formación del aducto 8-OHdG que repercutiría en su crecimiento celular. Es por ello que se realizó una cinética de crecimiento de trofozoítos post-tratamiento en el grupo experimental H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1 h, con diferentes tiempos de recuperación 0, 1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas. Esto con la finalidad de evaluar el tiempo que les toma a los trofozoítos en recuperarse al tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y comenzar su crecimiento poblacional. En la **Figura 20** se puede observar que el crecimiento celular comenzó a partir de las 12 h de recuperación post-tratamiento, alcanzando su máximo crecimiento a las 24 h manteniéndose en fase estacionaria (fase lag) hasta las 48 h. Así mismo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas a las 12, 24 y 48 h con respecto a las 0 h de recuperación post-tratamiento. El número de trofozoítos incrementaron en un 27, 34% y 28%, respectivamente con respecto a las 0 h de recuperación. La cinética de recuperación en el intervalo que abarca de las 0 a 6 h, posiblemente indique el tiempo que tardaron los trofozoítos en recuperarse al estrés ocasionado por el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, antes de comenzar el crecimiento celular observado hasta las 12 h de recuperación.



**Fig. 20 Cinética de crecimiento de los trofozoítos post-tratamiento con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1h.** El número de trofozoítos de *E. histolytica* se determinó post-tratamiento a las 0, 1, 3, 6, 12, 24 y 48h de recuperación. Los puntos muestran el promedio  $\pm$  E.E del crecimiento celular de tres experimentos independientes. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el grupo de recuperación 0 h ( $*p \leq 0.05$ ). Utilizando la prueba estadística de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer.

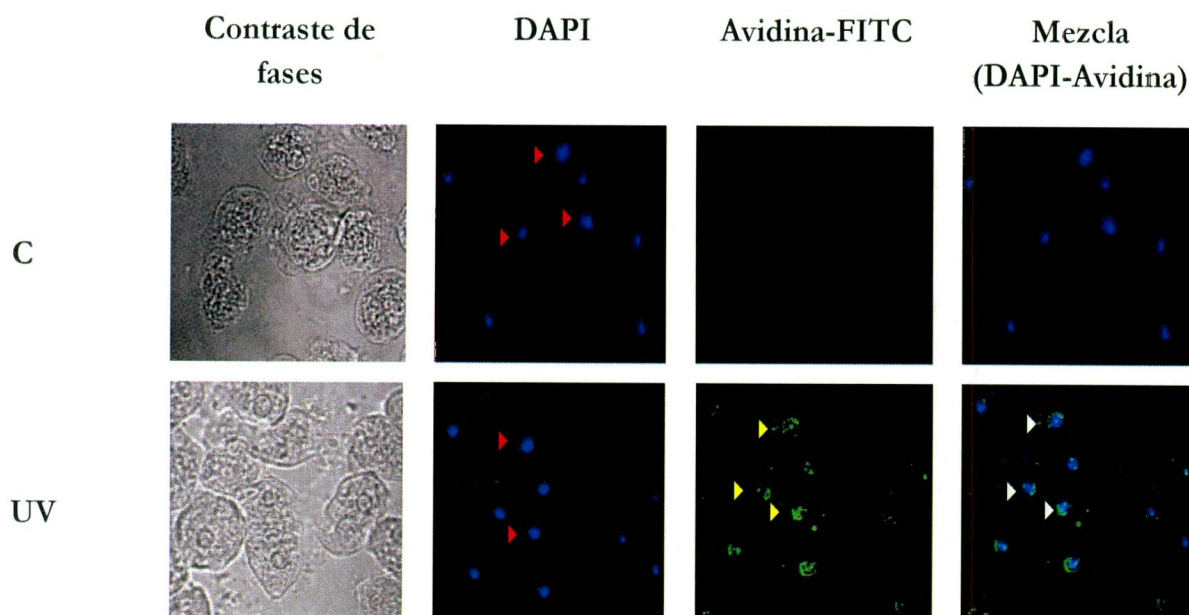
#### 4. Identificación del aducto 8-OHdG por medio de Avidina-FITC

Para la identificación del aducto se utilizó el marcador Avidina conjugado con el fluoróforo FITC, este compuesto tiene la capacidad de unirse con alta especificidad al residuo de nucleótido 8-OHdG que es un excelente biomarcador de daño a nivel del ADN causado por ERO y que puede ser reparado por la vía BER (Valavidinis *et al.*, 2009). Esta afinidad y especificidad de interacción es debida a la semejanza estructural que tiene el aducto con la vitamina biotina (vitamina H) (Connors *et al.*, 2006).

#### 5. Formación del aducto 8-OHdG mediante UV

Como control positivo de la formación del aducto 8-OHdG, los trofozoítos de *E. histolytica* se irradiaron con UV con una intensidad de 150J ya que se ha reportado que la UV

induce la formación del aducto 8-OHdG (Wei *et al.*, 1997) generando daño a nivel del ADN por el incremento de ERO y por consecuencia se forma el aducto 8-OHdG. Como control negativo (C) los trofozoítos no fueron expuestos a radiación UV. Posteriormente, las células se fijaron y la acumulación de daño al ADN se evidenció por la interacción de la molécula 8-OHdG con Avidina-FITC en el núcleo, el cual fue contrateñido con DAPI. La **Figura 21** muestra los núcleos de trofozoítos teñidos con DAPI (azul), para ambos grupos; el grupo UV mostró una tinción con Avidina-FITC (verde) que representa la formación del aducto 8-OHdG, a diferencia del grupo C, el cual no presentó tinción verde. En el grupo tratado con UV, la avidina co-localizó con el DAPI, exclusivamente en el núcleo.

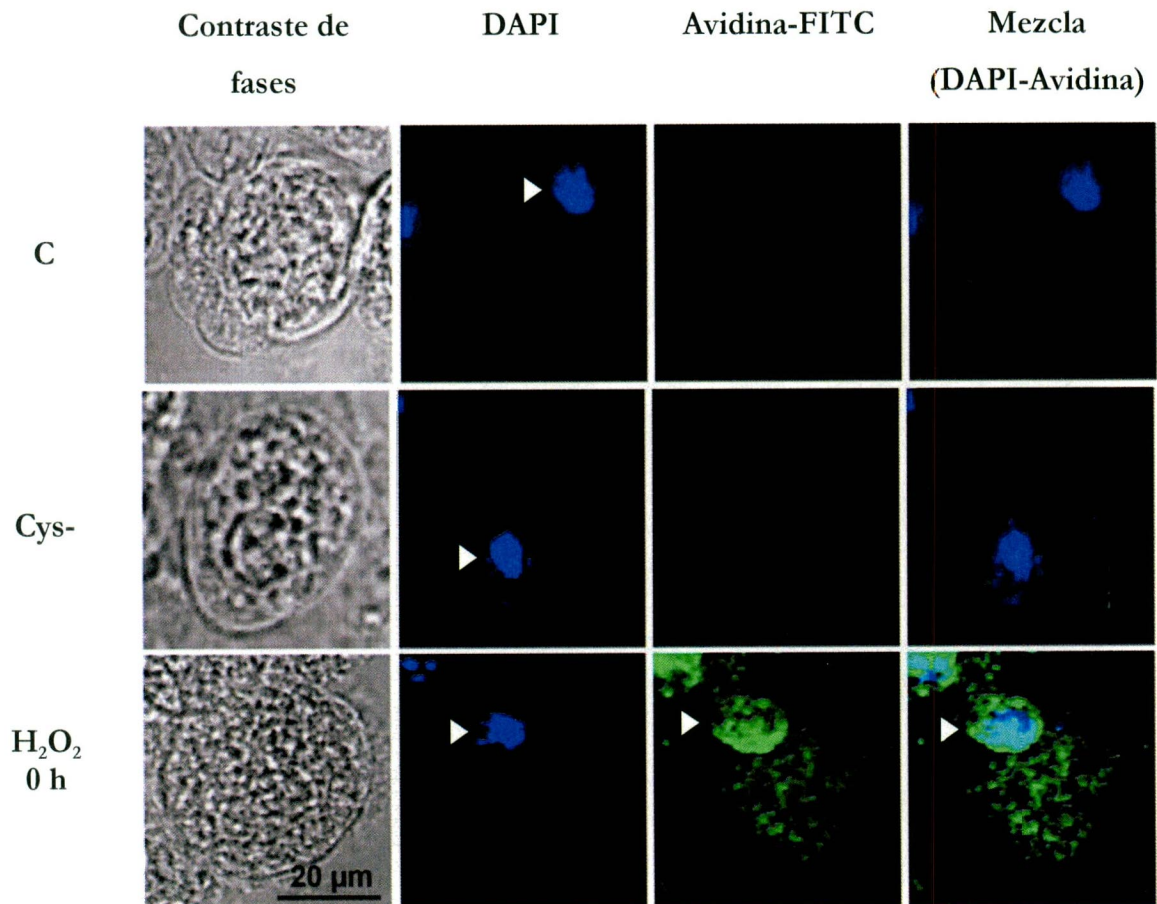


**Fig. 21 Identificación del aducto 8-OHdG mediante Avidina-FITC en trofozoítos irradiados con UV.** Control positivo de daño al ADN generado por radiación UV (grupo UV) y control negativo de daño sin radiación (grupo C). Los núcleos fueron teñidos con DAPI y el aducto marcado con Avidina-FITC. Las flechas rojas señalan la tinción nuclear del grupo C y del UV con DAPI; las flechas amarillas señalan la formación del aducto teñido con Avidina-FITC en el grupo UV; y las flechas blancas señalan que el aducto 8-OHdG fue específicamente localizado en el núcleo. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal.

## 6. Formación del aducto 8-OHdG por el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

De la misma forma en que se llevó a cabo la identificación del aducto 8-OHdG en el grupo tratado con UV, se realizó la detección del aducto 8-OHdG para los grupos experimentales C, Cys- y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> este último bajo la condición experimental de tratamiento 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1h (0 h de recuperación). Como se puede observar la **Figura 22** muestra los núcleos de los trofozoítos teñidos con DAPI (azul), para todos los grupos analizados; el grupo tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5 mM durante 1h, mostró tinción con Avidina-FITC (verde) con localización nuclear que representa la formación del aducto 8-OHdG a diferencia del grupo C y Cys-, los cuales no presentaron tinción. Por su parte, en la mezcla DAPI-Avidina (azul-verde) se puede observar que en el grupo tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0h de recuperación la tinción con

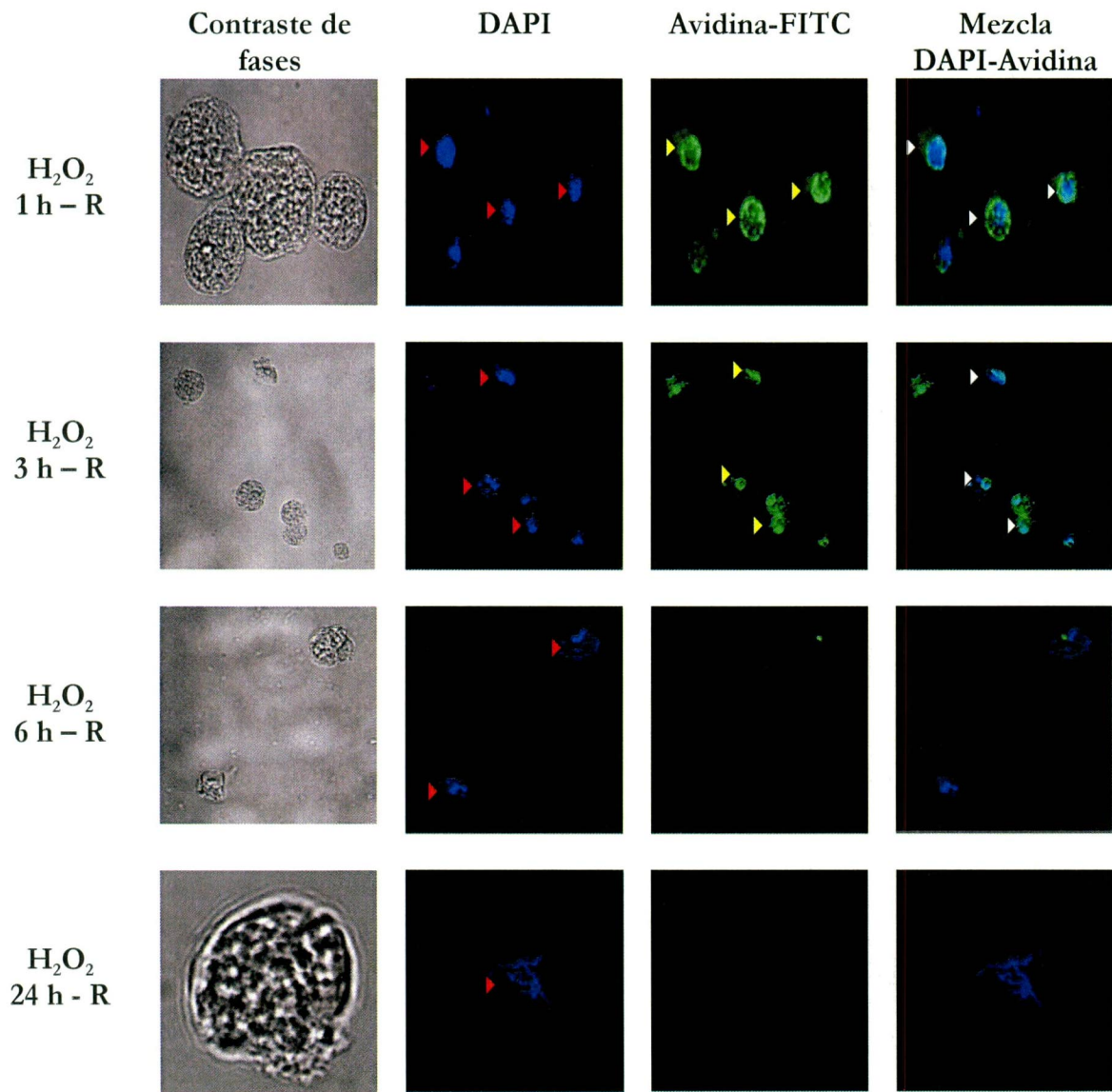
Avidina-FITC fue nuclear al colocalizar con la tinción del DAPI. Estos resultados indican que el estrés oxidativo generado por tratamiento con  $H_2O_2$  inducen eficientemente la formación del aducto 8-OHdG, el cual es principal daño al ADN generado por ERO.



**Fig. 22** Identificación del aducto 8-OHdG mediante Avidina-FITC producido en trofozoítos tratados con  $H_2O_2$ . Los núcleos fueron teñidos con DAPI y el aducto marcado con Avidina-FITC. Las flechas señalan la tinción nuclear del grupo C, Cys- y  $H_2O_2$  0 h de recuperación con DAPI; así como, la formación del aducto teñido con Avidina-FITC en el grupo  $H_2O_2$  0h de recuperación con localización nuclear. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal.

Para determinar si los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de eliminar el aducto 8-OHdG después del tratamiento con  $H_2O_2$ , se substituyó por el medio TYI-S33 completo dando tiempos de recuperación de 1, 3, 6 y 24 h. Como se puede observar en la **Figura 23** los núcleos de los trofozoítos se muestran teñidos con DAPI (azul), para todos los grupos analizados, los grupos tratados con  $H_2O_2$  2.5 mM durante 1h, con 1 y 3 h de recuperación

mostraron tinción nuclear con Avidina-FITC (verde), que representa la formación del aducto 8-OHdG, evidenciado mayormente en la primera hora en comparación a la tercera hora de recuperación. Interesantemente los trofozoítos mostraron una reducción del aducto 8-OHdG, la cual comenzó en la tercera hora, desapareciendo en su totalidad a las 24 h de recuperación.



**Fig. 23** Identificación del aducto 8-OHdG mediante Avidina-FITC en trofozoítos tratados con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y observados a diferentes horas de recuperación. Las imágenes muestran el aducto en la primera y tercera hora de recuperación y va desapareciendo paulatinamente hasta las 24 h de recuperación. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y el aducto marcado con Avidina-FITC. Las flechas rojas señalan la tinción nuclear de todos los grupos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a (1, 3, 6 y 24 h de recuperación) con DAPI; las flechas amarillas señalan la formación del aducto teñido con Avidina-FITC en los grupos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 y 3 h de recuperación y las flechas blancas señalan que el aducto 8-OHdG fue localizado en el núcleo. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal. Con esto ensayos se demuestra el daño al ADN con la formación del aducto 8-OHdG, cuando los trofozoítos de *E. histolytica* se someten a estrés oxidativo mediante un tratamiento de 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así mismo, como se puede observar a la sexta hora de recuperación, el aducto 8-OHdG desaparece, lo que puede relacionar la reparación del daño con el crecimiento celular después de la sexta hora de recuperación.

## 7. Análisis *in-silico* de proteínas de la vía BER en *E. histolytica*

La regulación de la expresión génica con base en cambios ambientales es importante para aclarar el funcionamiento, la homeostasis celular y por ende la supervivencia de los organismos. El genoma de *E. histolytica* ha revelado la presencia de algunos genes que codifican para proteínas involucradas en los mecanismos de reparación del genoma. La vía BER es un mecanismo importante para el mantenimiento de la integridad del genoma en organismos eucariontes superiores. Recientemente en *E. histolytica*, se han identificado algunos de los genes que participan en este mecanismo. Sin embargo, el genoma de *E. histolytica* se re-anotó en el año 2010 dando como resultados algunos cambios en los genes predichos, en este trabajo se realizó una nueva búsqueda de los genes que participan en esta vía.

En relación a la secuencia de aminoácidos tomada de “NCBI Reference Sequence” se llevaron a cabo alineamientos mediante la herramienta bioinformática Blast (por sus siglas en inglés “basic local alignment search tool”), para cada una de las proteínas que pudieran estar participando en la vía BER con base a su secuencia, función y posible participación en la reparación del daño ocasionado por estrés oxidativo. Tal es el caso de algunas glicosilasas como: UDG, MutY y Nth que intervienen en el reconocimiento y remoción del principal daño generado por ERO, el aducto 8-OHdG. Así como, de proteínas encargadas de la escisión del enlace fosfodiéster APEX y FEN1 en los sitios AP generados por glicosilasas y las proteínas que participan en la unión y reparación del ADN, EhDNALigI y EhPCNA. Para ello, se verificó la identidad que presentan estas proteínas en *E. histolytica*, comparándolas con las que se encuentran presentes en *H. sapiens*, *S. cerevisiae* y con otros organismos. En la **Tabla 9** se muestran las proteínas EhUDG, EhMutY, EhNth-like, EhNth, EhApex, EhPCNA, EhFen1, EhDNALigI con sus respectivos pesos moleculares, anotación y número de acceso del gen que las codifica de acuerdo a la base de datos AmoebaDB, la secuencia de referencia obtenida a

partir del banco de datos NCBI de *E. histolytica* y el porcentaje de identidad de la proteína con otras especies. Como se puede observar las proteínas EhUDG, EhMutY y EhApex de *E. histolytica* presentan un mayor porcentaje de identidad con microorganismos procariotas, como son las bacterias (*Algicola sagamiensis*, *Chlorobaculum parvum* y *Butyrivibrio pullicaecorum*, respectivamente), lo que podría estar relacionado a una probable transferencia horizontal de esos genes. Las dos proteínas EhNth, EhPCNA y EhDNALigI presentan un mayor porcentaje de identidad con microorganismos eucariotas, como son los hongos y protozoarios (*Phytophthora parasitica*, *Aphanomyces astaci*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Dictyostelium fasciculatum*); y por último la proteína FEN1 presentó un mayor porcentaje de identidad con el molusco *Aplysia californica*.

Tabla 9. Proteínas de la vía BER en <i>E. histolytica</i>										
<i>E. histolytica</i>				<i>H. sapiens</i>		<i>S. cerevisiae</i>		Organismos		
Proteína	Anotación*	N. de acceso*	Sec. Ref.	Sec. Ref.	% Identidad	Sec. Ref.	% Identidad	Sec. Ref.	Especies	% Identidad
EhUDG 64.5 kDa	Uracil-ADN glicosilasa	EHI_178910	XP_656294.1	NP_550433.1	37.1	NP_013691.1	31.4	WP_018692098.1	<i>Algicola sagamiensis</i>	43.9
EhMutY 35.4 kDa	A/G-glicosilasa específica de adenina	EHI_010700	XP_653060.1	NP_001041636.1	17.1	NP_009387.1	8.6	WP_012502346.1	<i>Chlorobaculum parvum</i>	41.6
EhNth-like 35.5 kDa	Endonucleas a III, putativa	EHI_083460	XP_655025.1	NP_002519.1	29.6	NP_009387.1	23.3	XP_008891591.1	<i>Phytophthora parasitica</i>	40.0

<b>EhNth</b> <sup>□</sup> 27.5 kDa	Endonucleasa III, putativa  ↑ <b>cepas virulentas</b>	EHI_118790	XP_654116.1	NP_002519.1	17.0	NP_009387.1	16.3	XP_009822095.1	<i>Aphanomyces astaci</i>	22.0
<b>EhApex</b> 37.4 kDa	Exodeoxiribonucleasa III  ↑ <b>cepas virulentas</b>	EHI_046670	XP_650532.2	XP_005267639.1	29.66	NP_009534.1	6.8	WP_016147086.1	<i>Butyricoccus pullicaecorum</i>	34.7
<b>EhPCNA</b> <sup>□</sup> 28.5 kDa	Antígeno nuclear de proliferación celular, putativa  ↑ <b>cepas no virulentas</b>	EHI_128450	XP_651510.1	NP_002583.1	33.4	NP_009645.1	33.9	NP_596504.1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	38.1
<b>EhFen1</b> 42.6 kDa	Flap nucleasa, putativa  ↑ <b>cepas virulentas</b>	EHI_099740	XP_651270.1	NP_004102.1	50.6	NP_012809.1	43.7	XP_005105611.1	<i>Aphysia californica</i>	51.9
<b>EhDNALigaseI</b> 78.2 kDa	ADN ligasa, putativa	EHI_111060	XP_657595.1	NP_001275993.1	34.7	NP_010117.1	29.6	XP_004367109.1	<i>Dictyostelium fasciculatum</i>	35.7

□ Previamente descrita por Marchat, 2011. \*De acuerdo a AmoebaDB.

## 8. Dominios estructurales de proteínas de la vía BER

Con el fin de determinar si las proteínas EhMutY, EhNth-like, EhNth, EhApex y EhFen1 de la vía BER de *E. histolytica*, presentan en su estructura dominios altamente conservados que lleven a cabo funciones de reconocimiento, remoción y reparación del daño ocasionado por estrés oxidativo, en comparación con proteínas que realizan funciones semejantes en *H. sapiens*, se procedió a realizar una búsqueda de los dominios estructurales que estuvieran conservados entre *H. sapiens* y *E. histolytica*, para ello se realizaron representaciones esquemáticas de sus respectivos dominios. Estas representaciones fueron generadas a partir de la base de datos (SMART por sus siglas en inglés) “Simple modular architecture research tool”.

## 9. Comparación de los Dominios estructurales de las glicosilasas EhMutY, EhNth-like y EhNth de *E. histolytica* y la Nth de *H. sapiens*

La **Figura 24** ejemplifica los dominios estructurales de las glicosilasas EhMutY, EhNth-like, EhNth de *E. histolytica*, así como de la glicosilasa Nth de *H. sapiens*. Las proteínas Nth de *H. sapiens* y EhNth de *E. histolytica* muestran una región de baja complejidad (LCRs), que es una extensión con pocos aminoácidos y que puede contribuir en gran medida a aumentar la secuencia de la proteína y generar nuevas funciones (Radó-Trilla, 2012). Esta región inicia en la posición 24 de la secuencia de aminoácidos y termina en la posición 49 en Nth de *H. sapiens*, mientras que en la de *E. histolytica* comienza en la posición 4 y finaliza en la 18 de la secuencia de aminoácidos.

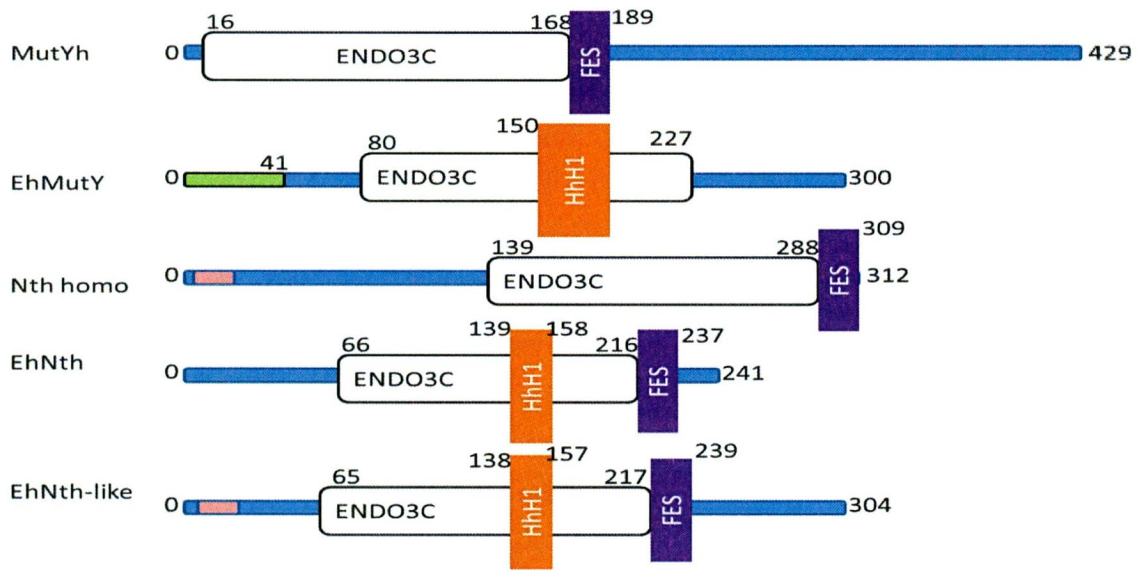
Como se puede observar el dominio Endonucleasa III (ENDO3c), se encuentra altamente conservado en todas las glicosilasas estudiadas. Este es un dominio de unión a sitios AP del ADN asociado al dominio Fe-S, a excepción de la proteína EhMutY que no está

asociada a dicho dominio. ENDO3c tiene actividad de glicosilasa y escinde enlaces fosfodiéster en sitios AP, a través de un mecanismo de  $\beta$ -eliminación (Tainer *et al.*, 1995). Este dominio en la proteína Nth comienza en el aminoácido 138 y termina en el 288, mientras que en EhMutY comprende del aminoácido 80-227, EhNth del 66-216 y en EhNth-like del 65 al 217.

El dominio Fe-S contiene residuos básicos conservados para la interacción con el esqueleto de fosfato del ADN, mediante la formación de un motivo estructural Fe4S4 (Thayer *et al.*, 1995).

El dominio HhH1 se encuentra en todas las glicosilasas estudiadas de *E. histolytica* a diferencia de la proteína Nth de *H. sapiens*. Este dominio de unión al ADN sin especificidad de secuencia, presenta aproximadamente 20 aminoácidos y está conformado por dos hélices conectadas por un corto tramo de péptidos doblados, formando una horquilla rígida [motivo Hélice-vuelta-Hélice (HhH)]. La interacción del dominio HhH con el ADN es mediada por los aminoácidos situados en el bucle altamente conservado (LPGIGPYT) y en el extremo N-terminal de la segunda hélice. Esta interacción podría implicar la formación de enlaces de hidrógeno entre los nitrógenos de la estructura de la proteína y los grupos fosfato del ADN (Doherty *et al.*, 1996). Este dominio en la proteína EhMutY comprende del aminoácido 150 al 169, en el caso de EhNth-like del 139-158 y de EhNth del 138-157.

A diferencia de las otras proteínas EhMutY presenta un dominio bobina en espiral “Coiled coil region” (por sus siglas en inglés), que es un motivo estructural de unión al ADN, involucrado en la regulación de la expresión génica. Este dominio comprende del aminoácido 1 al 41.



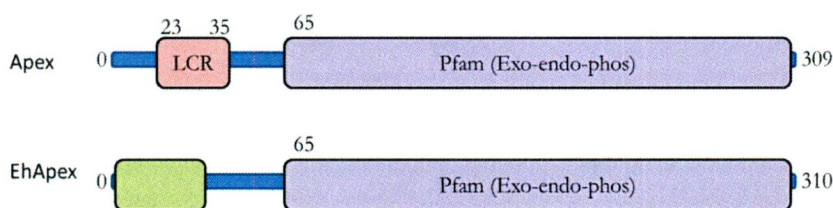
**Fig. 24 Representación esquemática de los dominios estructurales de las glicosilasas de *E. histolytica* y de *H. sapiens*.** El recuadro rosa representa la región de baja complejidad (LCRs); dominio Endonucleasa III (ENDO3c) rectángulo blanco; dominio Fierro-Azufre (FES), rectángulo morado; dominio Hélice-vuelta-Hélice HhH1, recuadro naranja y dominio bobina en espiral, rectángulo verde. Tomado de la base de datos SMART.

El resultado de este estudio muestra que las glicosilasas de *E. histolytica* conservan el dominio ENDO3, importante para la reacción de beta-eliminación para escindir enlaces fosfodiéster en sitios AP; así como, el dominio HhH para interactuar con el ADN, por lo que se sugiere su posible participación en la eliminación de bases nitrogenadas oxidadas.

#### 10. Comparación de los dominios estructurales de las proteínas EhApex y EhFen1 de *E. histolytica* contra los dominios Apex y Fen1 de *H. sapiens*

La **Figura 25** ilustra los dominios estructurales de las proteínas endonucleasas EhApex de *E. histolytica* y de Apex de *H. sapiens*. La proteína EhApex de *E. histolytica* presenta un dominio bobina en espiral (rectángulo verde) “Coiled coil region” (por sus siglas en inglés) que comprende del aminoácido 1 al 32.

La proteína Apex de *H. sapiens* presenta una región de baja complejidad (LCRs); que abarca desde el aminoácido 23 al 35. En tanto que las proteínas de ambas especies, contienen el dominio Exo\_endo\_phos (Pfam), recuadro morado, el cual se encuentra en un gran número de proteínas incluyendo endonucleasas y fosfatasa implicadas en la señalización intracelular dependientes de magnesio (Dlakic, 2000). Este dominio en *E. histolytica* comprende del aminoácido 73 al 310 y en *H. sapiens* del aminoácido 65 al 309.



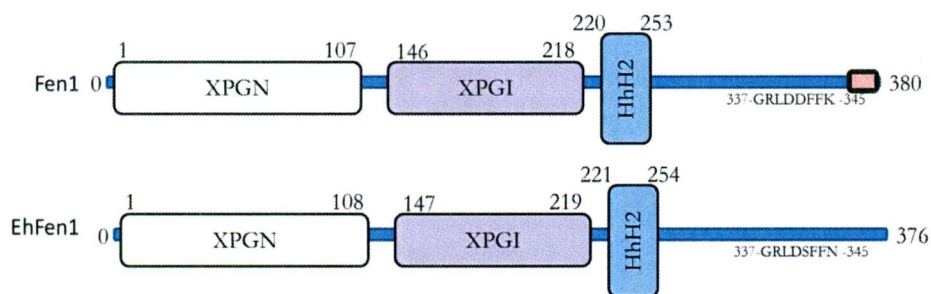
**Fig. 25 Representación esquemática de los dominios estructurales de las proteínas EhApex de *E. histolytica* y de Apex de *Homo sapiens*.** Dominio bobina en espiral (rectángulo verde) de *E. histolytica*. El rectángulo rosa representa la región de baja complejidad (LCRs) de *H. sapiens* y el dominio Exo\_endo\_phos (Pfam), rectángulo morado de *E. histolytica* y de *H. sapiens*. Tomado de la base de datos SMART.

La **Figura 26** ejemplifica los dominios estructurales de la proteína EhFen1 de *E. histolytica* y Fen1 de *H. sapiens*. Las proteínas EhFen1 de *E. histolytica* y Fen1 de *H. sapiens* presentan el dominio Xeroderma pigmentosum G región amino (XPGN), que incluye del aminoácido 1 al 108 en *E. histolytica* y del 1 al 107 en *H. sapiens*. El dominio catalítico XPGI contiene el sitio activo; en *E. histolytica* abarca del aminoácido 147 al 219 y en *H. sapiens* del 146 al 218. Ambos dominios XPG, participan como componentes catalíticos que escinden la cadena de ADN monocatenaria dañada (Habraken *et al.*, 1993).

El dominio HhH2 es un dominio de unión al ADN, que forma enlaces puente de hidrógeno entre los nitrógenos de la estructura de la proteína y los grupos fosfato del ADN (Shanahan *et al.*, 2004). En *E. histolytica* este dominio abarca del aminoácido 221 al 254 y en *H.*

*sapiens* del 220 al 253. La proteína Fen1 de *H. sapiens* presenta una región de baja complejidad (LCRs), que abarca desde el aminoácido 361 al 380.

Estos análisis indican que EhFen1 conserva los dominios conservados involucrados en la unión y escisión de la cadena de ADN lo que sugiere su participación en la reparación del daño.



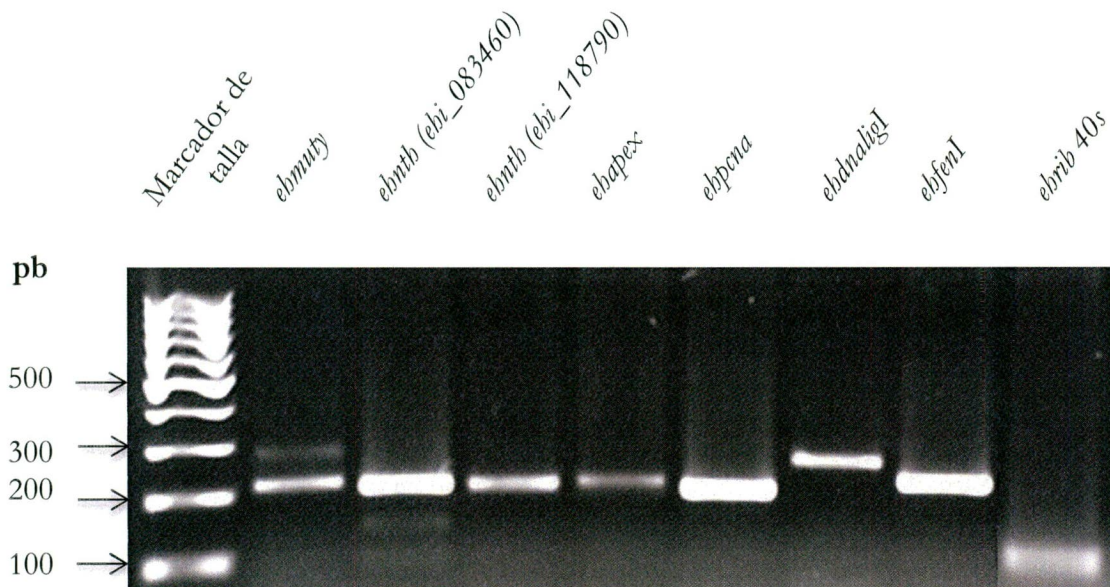
**Fig. 26 Representación esquemática de los dominios estructurales de las proteínas Fen1 de *E. histolytica* y de *H. sapiens*.** El recuadro blanco representa el dominio Xeroderma pigmentosum G region amino (XPGN). El recuadro morado el dominio XPGI y el recuadro azul el dominio HhH2 de *E. histolytica* y de *H. sapiens*. La proteína Fen1 de *H. sapiens* presenta una región de baja complejidad (LCRs), recuadro rosa. Tomado de la base de datos SMART.

## 11. Evaluación de la expresión relativa de los ARNm de genes que participan en la vía BER

Los ensayos de microscopía confocal, demuestran que los trofozoítos sometidos a concentraciones de 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducen la formación del aducto 8-OHdG en los trofozoítos de *E. histolytica* y que los tiempos de recuperación de 24 h post-tratamiento, presentan una reducción en la frecuencia del aducto. Así mismo, ya que el análisis del genoma de este parásito muestra la presencia de genes que codifican para proteínas involucradas en la vía BER, en este trabajo se propone la posible participación del mecanismo BER en la reparación del daño inducido por ERO. De manera que consideramos importante evaluar la

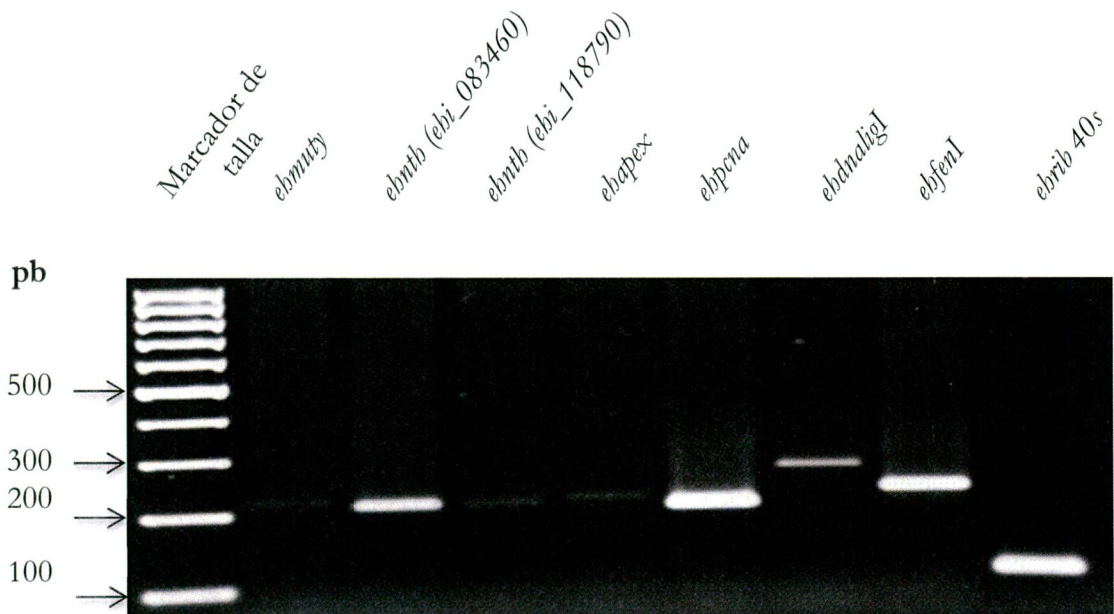
expresión relativa del ARNm de éstos genes y determinar su posible participación en la reparación de daño a nivel del ADN por estrés oxidativo.

Para ello, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar los genes de la vía BER (vía larga) que probablemente participen en la reparación del aducto 8-OHdG como *ebmuty*, *ebnth*, *ebnth-like*, *ebapex*, *ebpcna*, *ebdnaligI*, *ebfen1* y como control de carga el gen ribosomal *ebrib40s*. Como se puede observar en la **Figura 27** *E. histolytica*, contiene en su genoma los genes *ebmuty*, *ebnth-like*, *ebnth*, *ebapex*, *ebfen1*, *ebdnaligI* y *ebpcna* (214, 206, 206, 210, 218, 259 y 200 pb respectivamente). Estos resultados sugieren que este parásito contiene en su genoma la maquinaria de genes que codifican para proteínas de la vía BER, los cuales podrían ser funcionales para llevar a cabo la reparación del ADN.



**Fig. 27 Amplificación de los genes de la vía BER a partir de ADNg.** Los primers diseñados para evaluar la expresión génica amplifican en el tamaño de amplicón esperado. Imágenes obtenidas mediante la técnica de PCR tiempo final.

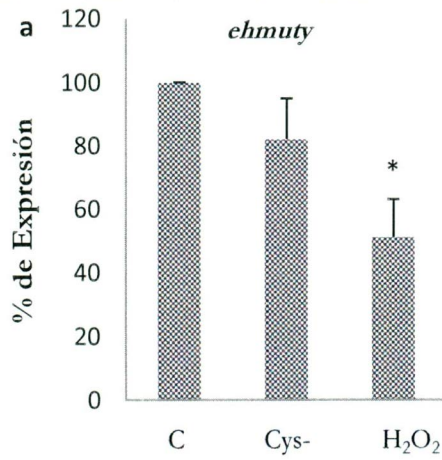
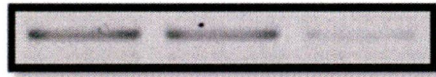
Una vez corroborada la amplificación de los genes empleando ADN genómico se procedió a determinar la expresión de estos genes en condición basal de cultivo, para lo cual se realizó un análisis de RT-PCR. La **Figura 28** muestra la expresión de los genes que participan en la vía BER (*ebmuty*, *ebnt*, *ebntb-like*, *ebapex*, *ebpcna*, *ebdnaligl*, *ebfen1* y *ehrib40*). Estos resultados muestran que *E. histolytica* expresa los genes de la vía BER en condición basal de cultivo, lo que sugiere una posible participación en la reparación del genoma, en respuesta a eventos que dañen su ADN, como la exposición a radicales libres provenientes del estrés oxidativo.



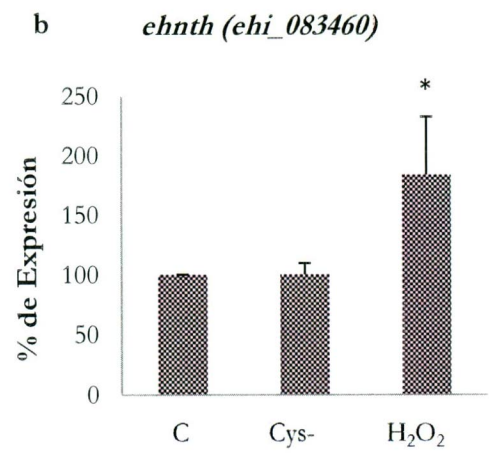
**Fig. 28 Expresión génica de la vía BER en condición basal de cultivo.** Se utilizó mismo cADN como templado para la amplificación de todos los genes tomando como control del amplificado el gen *ehrib 40s*. Imágenes obtenidas mediante la técnica de PCR tiempo final.

Ya que se había determinado la expresión de los genes de la vía BER en condiciones basales de cultivo, se procedió a evaluar cambios en los perfiles de expresión génica después de generar daño al genoma mediante la formación del aducto 8-OHdG y que pudiera ser reparado por la vía BER. Es por ello, que a partir de 500 ng de ARN extraído de los grupos experimentales C, Cys- y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> este último tratado con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1h, se llevó a cabo la amplificación de los genes de la vía BER mediante RT-PCR. De los geles obtenidos, se obtuvieron datos semi-cuantitativos mediante análisis densitométrico. Los resultados se normalizaron con relación al gen *ebrib 40s* y se reportaron en porcentajes con respecto a la expresión basal, tomando a ésta como el 100%. La **Figura 29** muestra los cambios de las expresiones relativas de los genes *ebmuty*, *ebnth*, *ebnthlike*, *ebapex*, *ehpcna*, *ebdnaligI* y *ehfen1*, en los grupos experimentales y control. En la **Figura 29a** se puede observar una disminución estadísticamente significativa (48%) en la expresión relativa del gen *ebmuty* en el grupo tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con respecto al grupo C. En la **Figura 29b** se puede observar un incremento (84%) en la expresión relativa del gen *ebnth* en el grupo tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparación al grupo C. A pesar, de que los demás genes no mostraron cambios estadísticamente significativos bajo estas condiciones, se propone evaluarlos a distintos tiempos de recuperación.

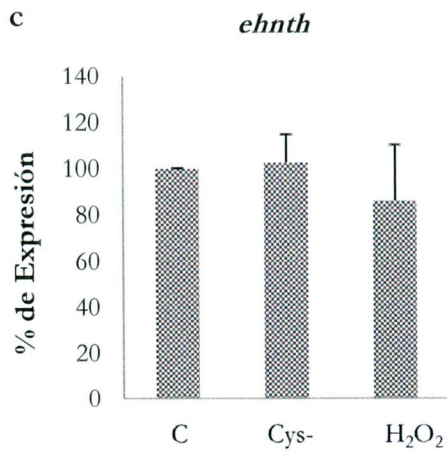
[214pb]



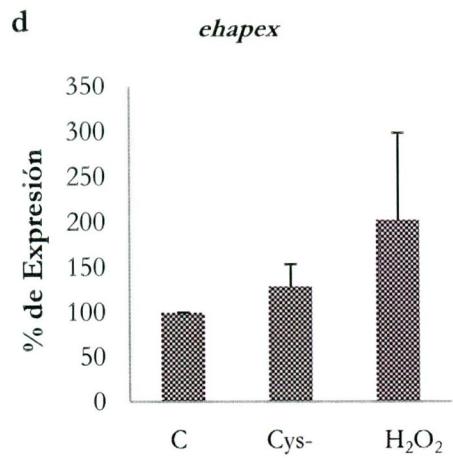
[206pb]

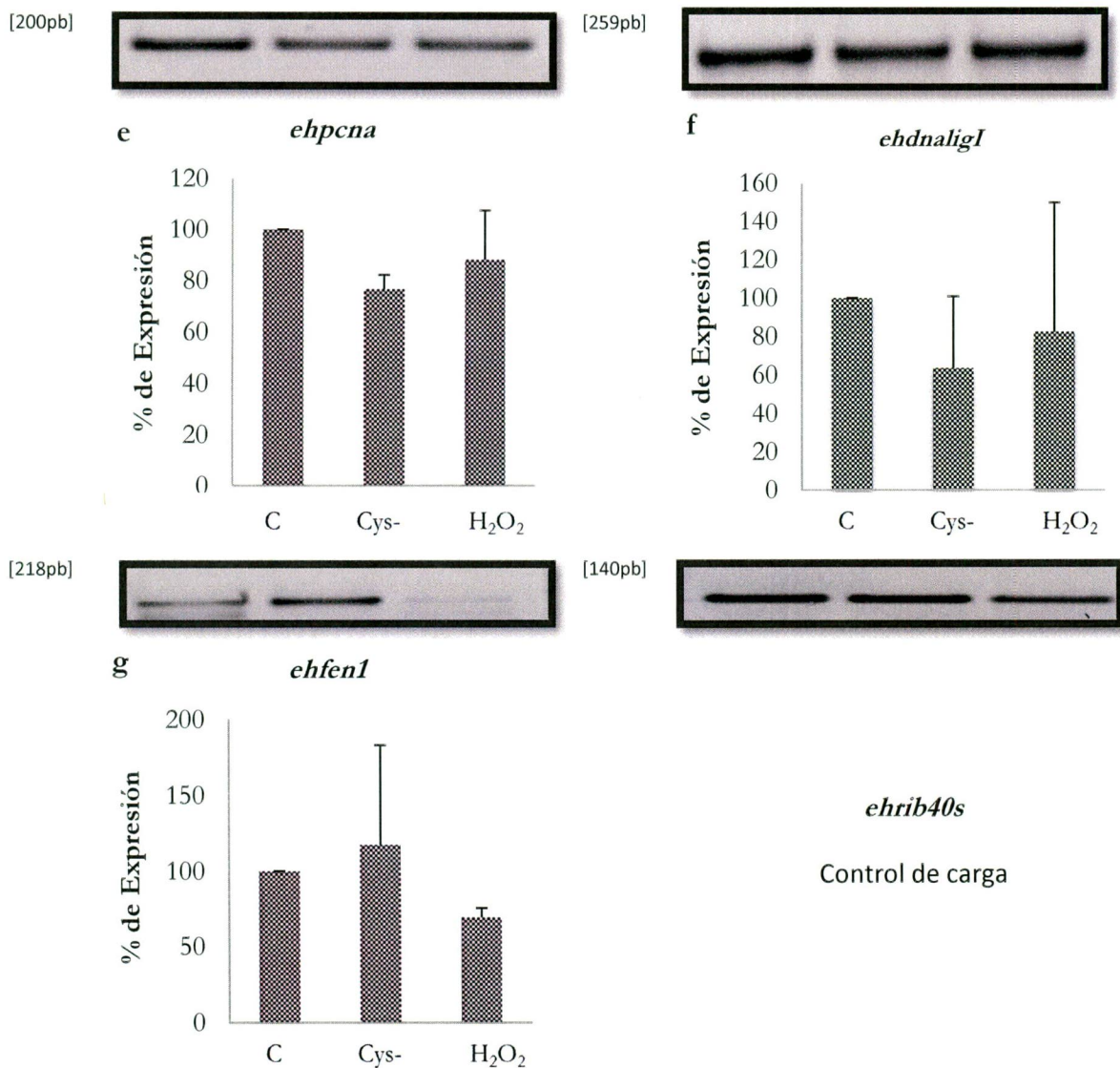


[206pb]



[210pb]

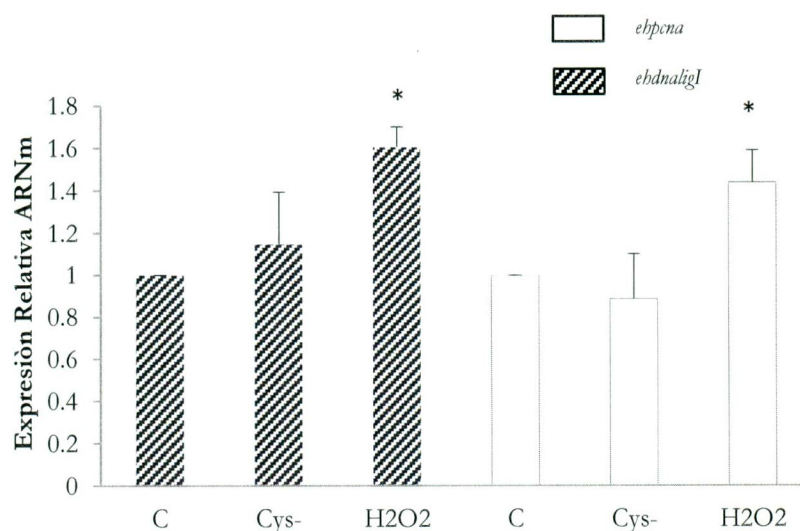




**Fig. 29** Cambios en la expresión relativa de genes de la vía BER en trofozoítos. Análisis por RT-PCR de los genes *ehmuty* (Fig. 29a), *ebnth* (Fig. 29b), *ebntblike* (Fig. 29c), *ehapex* (Fig. 29d), *ehpcna* (Fig. 29e), *ehdnaligI* (Fig. 29f) y *ehfen1* (Fig. 29g), en los grupos experimentales medio sin cisteína (Cys-) y medio sin cisteína tratado con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); así como, para el grupo control medio completo (C). Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el grupo C (\* $p \leq 0.05$ ). Utilizando la prueba estadística de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer.

En la evaluación de la expresión génica de *ehdnaligI* y *ehpcna* mediante qRT-PCR se pudo observar un aumento en la expresión de ambos genes en un 60% y 40% respectivamente lo que denota la sensibilidad de la técnica en comparación con la de PCR en tiempo final

**Figura 30.**



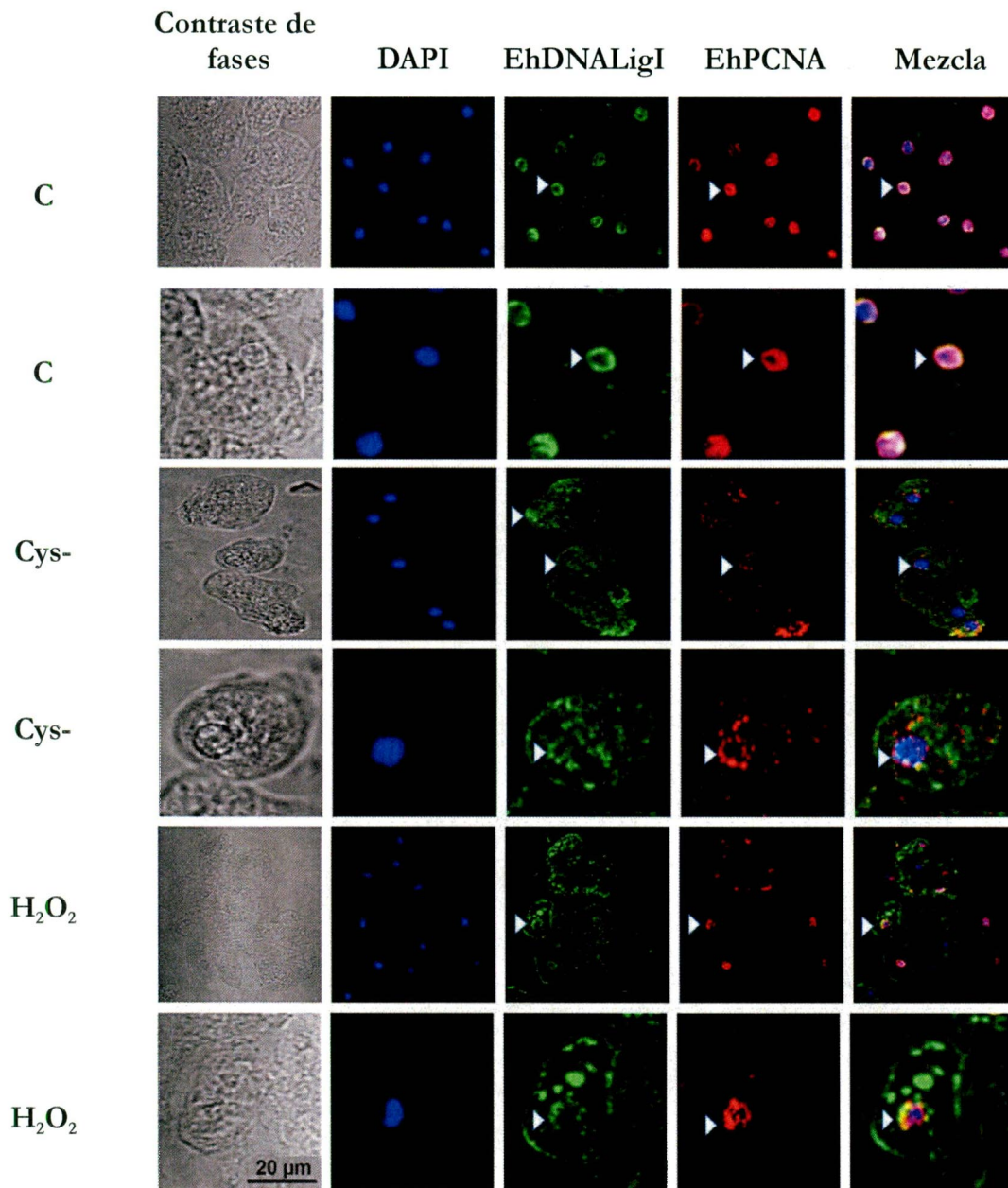
**Fig. 30 Cambios de expresión relativa mediante qRT-PCR.** Análisis de qRT-PCR de los genes *ehdnaligI* y *ehpcna* en los grupos C, Cys- y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el grupo C (\* $p \leq 0.05$ ). Utilizando la prueba estadística de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer.

El aumento en la expresión génica de *ehdnaligI* y *ehpcna* después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sugiere su probable participación en la reparación del daño al ADN.

## 12. Cambios de localización de EhDNALigI y EhPCNA después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

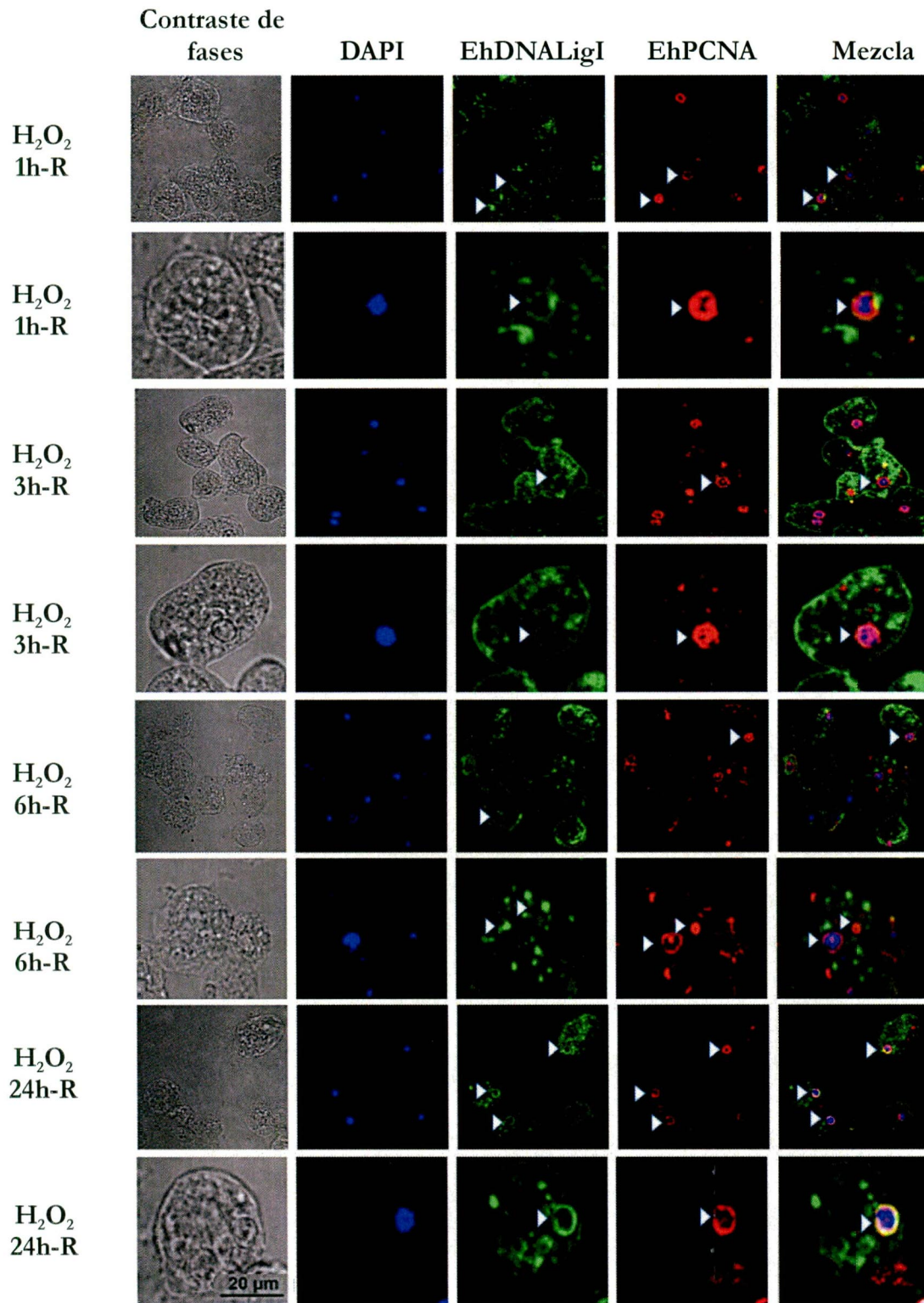
Determinados los cambios en la expresión de los genes *ehdnaligI* y *ehpcna* se procedió a explorar los cambios de localización de las proteínas EhDNALigI y EhPCNA después de la inducción del daño al ADN. Adicionalmente, su localización podría sugerir una posible interacción entre EhDNALigI y EhPCNA con implicaciones funcionales la reparación del

ADN; ya que anteriormente se reportó que la actividad de EhDNALigI se ve incrementada por EhPCNA (Cardona *et al.*, 2009). Por tanto, se exploraron cambios de localización y co-localización celular mediante microscopía confocal a través de ensayos de inmunofluorescencia, de la proteína EhDNALigI utilizando anticuerpo primario ( $\alpha$ -ligasa) y anticuerpo secundario (anti-ratón) marcado con FITC y de la proteína EhPCNA utilizando anticuerpo primario ( $\alpha$ -PCNA) y anticuerpo secundario (anti-conejo) marcado con TRITC en 800,000 trofozoítos de los grupos C, Cys- y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, éste último, con diferentes tiempos de recuperación (0, 1, 3, 6 y 24h) después de inducir daño a nivel del ADN con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 2.5 mM por una hora. La **Figura 31** muestra los núcleos de trofozoítos teñidos con DAPI (azul), la localización de las proteínas EhDNALigI marcada con FITC (verde) y EhPCNA marcada con TRITC (rojo). Así como, la mezcla de ambos fluoróforos (FITC-TRITC) para la co-localización de ambas proteínas (amarillo). Como se puede observar en la **Figura 31**, tanto EhDNALigI como EhPCNA presentan una localización totalmente nuclear en el grupo C, a diferencia del grupo Cys- en donde la localización de ambas proteínas fue tanto nuclear como citoplasmática. Para el grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con 0h de recuperación, se observa una localización citoplasmática y peri-nuclear para EhDNALigI y preferentemente nuclear para EhPCNA. La co-localización de estas dos proteínas se observaron en estructuras conocidas como *focis*, donde se superponen las señales verde y rojo (FITC y TRITC); y se observan puntos amarillos. Estos *focis* podrían ser los sitios donde se pueda llevar a cabo la reparación.



**Fig. 31** Localización de EhDNALigI y EhPCNA después del tratamiento con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul), la proteína EhDNALigI marcada con FITC (verde) y EhPCNA marcada con TRITC (rojo). Co-localización peri-nuclear de EhDNALigI y EhPCNA (amarillo). Las flechas blancas indican los núcleos de los trofozoítos. Imágenes obtenidas a partir de microscopía confocal.

Después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 2.5 mM por una hora, se dieron tiempos de recuperación (1, 3, 6 y 24h). Como se puede observar en el grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con 1h y 3h de recuperación (**Figura 32**), se sigue observando una localización citoplasmática y peri-nuclear para EhDNALigI y preferentemente nuclear para EhPCNA; con una mayor presencia de estructuras *focis* en la zona perinuclear, visualizados como puntos amarillos. A las 6h y 24h de recuperación ambas proteínas se encuentran en localización peri-nuclear, además EhDNALigI se encuentra contenida en algunas vacuolas.



**Fig. 32** Localización de EhDNALigI y EhPCNA de *E. histolytica* después del tratamiento con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tiempos de recuperación (1, 3, 6 y 24h). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul), la proteína EhDNALigI marcada con FITC (verde) y EhPCNA marcada con TRITC (rojo). Co-localización peri-nuclear de EhDNALigI y EhPCNA (amarillo). Las flechas blancas indican los núcleos de los trofozoítos. Imágenes obtenidas a partir de microscopía confocal.

## VI. Discusión

Hasta hace poco tiempo la virulencia de *E. histolytica* sólo se había atribuido a su capacidad invasiva a tejidos (Trejo y Castañon, 2009; Campos *et al.*, 2011, Ramos *et al.*, 2009), sin embargo estudios recientes han mostrado que un factor importante de su virulencia es la capacidad de resistir a la tensión generada por ERO (Ramos *et al.*, 2009). A su vez, la respuesta encontrada por parte del sistema inmunológico del huésped, como primera respuesta para la eliminación de este patógeno, es la producción de ERO (Guo *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2012).

Las tensiones de ERO para la eliminación de amibas en humanos, es generada por células fagocíticas como: granulocitos, macrófagos y células dendríticas, que son capaces de producir cantidades considerables de ERO durante el estallido respiratorio, cuya principal función es la eliminación de patógenos. Se ha estimado que en condiciones *in-vitro*, la población de granulocitos es de aproximadamente 1 millón y produce alrededor de 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 2 horas (Strus *et al.*, 2009).

*E. histolytica* cuenta con un sistema de defensa que incluye a las enzimas antioxidantes como SOD, NADPH-oxido reductasas, peroxirredoxinas y tiorredoxinas cuya principal función es convertir las ERO en compuestos menos dañinos como el agua; ya que se tienen reportes de aumentos en la expresión génica y de proteínas de estas enzimas, cuando se somete a este parásito a concentraciones de 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Davis *et al.*, 2006). Con base a los resultados de estas investigaciones es vital la eficiencia del sistema de defensa antioxidante, para la supervivencia de este parásito, tanto *in-vivo* como *in-vitro*.

Se propone que a pesar de que *E. histolytica* cuenta con un eficiente sistema antioxidante, su genoma podría estar sufriendo daños al estar en contacto con las ERO provenientes del sistema inmunológico. Con el fin de entender la capacidad que presentan las amibas expuestas a un estado de estrés oxidativo cuando se encuentra colonizando el intestino

y otros órganos, se procedió a montar el modelo de estrés oxidativo *in-vitro*. Esto basado, en la capacidad que presentan estos organismos de sobrevivir cuando se induce la formación de abscesos hepáticos en hámster, donde el 70% de la población de amibas muere y el restante preserva la capacidad de sobrevivir generando abscesos hepáticos que conlleva a la muerte del organismo (Olivos *et al.*, 2011).

En este trabajo se desarrolló el modelo de estrés oxidativo basado en la viabilidad y crecimiento celular post-tratamiento a distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con 24 h de recuperación de los trofozoítos de *E. histolytica*, asegurando una concentración tal que permitiera inducir el daño al ADN sin afectar su crecimiento celular después de 24 h de recuperación, que permita la activación del mecanismo BER. La concentración elegida (2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), para generar daño al ADN, evaluar la expresión génica de la maquinaria BER y explorar los cambios de localización de EhDNALigI y EhPCNA en *E. histolytica* fue determinada como condición no letal para la célula. Cabe destacar que los resultados de viabilidad concuerdan con los obtenidos por Preeti Shahi *et al.*, 2016 donde se establece la misma concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como no letal para la célula. El tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> implicó el uso de medios sin cisteína para evitar la capacidad amortiguadora que ejerce este aminoácido ante las ERO. Su función antioxidante se debe al grupo sulfidrilo (SH), además de formar parte de las principales enzimas con función antioxidante como SOD, peroxirredoxinas, tiorredoxinas y NADPH-oxido reductasas.

Adicionalmente, el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha sido usado como un inductor de daño al ADN por estrés oxidativo en líneas celulares de anemia de Fanconi (Zunino *et al.*, 2001) y *Mycobacterium smegmatis* (Li *et al.*, 2015).

Dentro de los principales daños que se generan en el ADN por parte de ERO se encuentran: SSB, DSB, así como la formación de aductos como 8-OHdG o la 8-oxodG (Pelying *et al.*, 2011). Se tomó como indicador del daño al genoma en *E. histolytica*, la formación del aducto 8-OHdG, el cual se visualizó con la proteína avidina marcada con el fluoróforo FITC, como previamente se describió en *Trypanosoma cruzi* (Furtado C *et al.*, 2012). Hasta la fecha, la formación del aducto no se ha determinado en este parásito; sin embargo, se sabe que el tratamiento con UV induce cambios en la expresión de proteína EhRad51 de la vía de reparación por recombinación homóloga (López *et al.*, 2008). La avidina es una proteína predominante en la clara de huevo, que tiene la capacidad de unirse a la proteína biotina y que por su semejanza estructural con la molécula 8-OHdG puede ser utilizada como marcador de daño al ADN (Connors *et al.*, 2006). A su vez, cuando las amibas se recuperaron después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se observó una disminución en la cantidad de lesiones generadas, lo que sugiere una posible reparación del daño. Sin embargo, sería importante evaluar la expresión génica a distintos tiempos de recuperación y analizar la abundancia de las proteínas implicadas en la reparación del daño después del tratamiento, para poder tener más evidencia de la participación de la vía BER en *E. histolytica*.

Mediante la búsqueda bibliográfica de genes reportados de la vía BER (López *et al.*, 2009 y Marchat *et al.*, 2011) y la búsqueda de genes en la base de datos KEEG, se encontraron algunos genes que codifican para proteínas putativas para el mecanismo BER y es por ello, que se evaluó la expresión de sus genes.

Los genes de la vía BER, se encuentran en el genoma de *E. histolytica* y se expresan en condición basal de cultivo. Adicionalmente, después del tratamiento con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, algunos genes se modularon significativamente como las ADN glicosilasas *ehmuty* y *ehnth*.

La disminución de *ebmuty* y el aumento *ebnth* puede estar relacionado con la capacidad de reparar el daño en las bases nitrogenadas causado al genoma por el estrés oxidativo, aunque *Entamoeba histolytica* no presenta glicosilasas para reparar las bases dañadas a consecuencia de la modificación de bases púricas como la 8-OHdG, estudios anteriores han identificado a las glicosilasas Nth como proteínas que tienen la capacidad de remover estos aductos en humanos, principalmente cuando se encuentra mal apareados 8-OHdG:G (Matsumoto *et al.*, 2001). A su vez, también *E. histolytica* presenta los componentes básicos de la vía de Reparación por Escisión de Nucleótidos por lo tanto se propone que la vía NER pudiera estar participando en la reparación, esto basado en que organismos como *Porphyromonas gingivalis* que carecen de la glicosilasa OGG son capaces de reparar el daño mediante la vía NER (Johnson *et al.*, 2004).

Sin embargo, el resto de los genes analizados no mostraron cambios significativos por la técnica de PCR en tiempo final, por lo que para corroborar este hecho, se decidió evaluar la expresión de los genes *ebdnaligi* y *ehpcna* mediante qRT-PCR encontrándose un aumento en la expresión de ambos genes después del tratamiento.

Reportes anteriores de tratamiento *in-vitro* con 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en trofozoítos de *E. histolytica* durante 1 hora en medio TYI-S33 completo, no muestran modulación de genes involucrados en la detoxificación, ni en la vía de BER y aunque los sistemas de eliminación de ERO se muestran altos, son casi invariables los niveles de expresión de genes que codifican para proteínas como las Flavodiiron con función antioxidante (Vicente *et al.*, 2009). A su vez se ha visto que aunque los niveles de expresión del factor de transcripción EHI\_108720 que reconoce el “motivo en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>” (HRM) no cambian ante el tratamiento con 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1 h, lo que sugiere que el ARNm EHI\_108720 permanece expresado de forma estable en una amplia gama de condiciones (Pearson *et al.*, 2013).

En el estudio de Vicente *et al.*, 2009, el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se llevó a cabo en medio TYI-S33 completo, a diferencia de nuestras condiciones, en la que se eliminó por completo la cisteína del medio para eliminar su efecto protector o amortiguador ante las ERO. Se sabe, que la L-cisteína, regula varias rutas metabólicas que incluyen la generación de energía, aminoácidos y metabolismo de fosfolípidos. En estudios de microarreglos donde se eliminó por completo a la cisteína del medio que representa el principal tiol intracelular, se observó cambios limitados en la expresión de genes implicados en el metabolismo de los aminoácidos que contienen azufre y en la defensa ante el estrés oxidativo (Husain *et al.*, 2011).

El análisis *in-silico* de la secuencia de proteínas codificadas por estos genes, muestra que contienen los motivos funcionales y estructurales importantes para llevar a cabo su función. MutY y Nth son miembros de la súper familia de glicosilasas cuya principal función es escanear el genoma en busca de bases dañadas. Una vez ubicada la lesión, se une al sitio haciendo que el ADN se doble, obligando a la enzima a voltear la base para ser escindida (Lee *et al.*, 2004).

Esta incisión es llevada a cabo por el rompimiento glicosídico entre el grupo N de la base dañada y el esqueleto de desoxirribosa. El dominio HhH es el dominio de unión al ADN, la interacción con el ADN no se realiza de forma secuencia dependiente y tiene lugar a través de la formación de enlace entre los fosfatos de la desoxirribosa y los nitrógenos del dominio conservada “LPGVPK” (Guan *et al.*, 1998). El motivo HhH en MutY está compuesto por la secuencia LPGIGPYT, Nth por LPGVGPKI y Nth-like por LPGIGPKL, que como se puede observar coincide con los motivos que presenta Nth de *E. coli* para el motivo HhH. El cluster de unión a metales 4Fe-4S está conformado grupo de cisteína –CxxxxxxCxxCxxxxxC- contenido en EhNth y EhNth like (**Figura 24**) (Thayer *et al.*, 1995, Watanabe *et al.*, 2005); no así para EhMutY donde este cluster de proteínas se encuentran involucradas en la unión al ADN, haciendo más fácil la detección de la lesión y la remoción del aducto (Yuliang, 2012).

MutY es importante en el mantenimiento de la estabilidad génica, gracias a la capacidad de catalizar la eliminación de la adenina cuando se encuentra interaccionando con 8-OHdG en la doble cadena de ADN. EhMutY cuenta con un motivo de reconocimiento de la transversión conformado por la secuencia de residuos de aminoácidos “LQQTQVT”, coincidente con la anteriormente reportada (Guan *et al.*, 1998). La estructura terciaria de EhMutY muestra el sitio activo compuesto por dos residuos de aminoácidos E33 y D134, que en *E. coli* se encuentran en E-37 y D-138, en la que D-138 se cree que activa una molécula de agua para el ataque nucleofílico en C1 de desoxirribosa facilitando la liberación de la adenina; mientras que E-37 protona N-7 de la adenina durante el desplazamiento nucleofílico (Manuel *et al.*, 2004).

Las Nths son glicosilasas de ADN que generan sitios AP (AP) apurínicos / apirimídicos) con actividad liasa y que a su vez escinden pirimidinas dañadas por estrés oxidativo. La Nth de humanos muestra una longitud de 304 residuos de aminoácidos al igual que EhNth de amiba. Ambas contienen un sitio activo D-149 (EhNth), D-142 (EhNth-like) y sólo EhNth-like muestra el sitio catalítico K-123. Thayer *et al.*, 1995 construyó el modelo catalítico y de unión al ADN que se encuentra entre los sitios catalíticamente importantes como lo son Lys-120 y Asp-138 de la endonucleasa III de humano; que en *Entamoeba histolytica* se encuentran entre K-123 y D-142 (Thayer *et al.*, 1995).

El ADN se une en la hendidura entre los dos dominios de la enzima, mientras que la lisina y el ácido aspártico (Lys-120 y Asp-138) están posicionados en un sitio nombrado “mouth of the pocket”. D-138 desprotona a K-120, la cual posteriormente ataca a la desoxirribosa en C-1, causando la liberación de la base nitrogenada, con la formación de una base de Schiff con el ADN. La base de Schiff sufre varias transformaciones resultantes en cadena, a través de la escisión  $\beta$ -eliminación hasta dejar el extremo 5'-fosfato y 3'- $\alpha,\beta$  aldehído insaturado o 3'-fosfato escindido (Ikeda *et al.*, 1998).

La endonucleasa 1 (APEX1), llamada así por el rompimiento del enlace fosfodiéster en sitios AP, medía la reparación de sitios abásicos y otras lesiones del ADN y es esencial para la vía BER. APEX1 se encarga de hidrolizar el enlace fosfodiéster, produciendo extremos 5'-fosfato de desoxirribosa y 3'-OH, necesario para la reparación (Manvilla *et al.*, 2013). La EhAPEX1 de *E. histolytica* contiene dos sitios de unión a metales como Mg<sup>2+</sup>: 1) A24, E50 y D255; 2) D160, N162 y H257 como cofactores catalíticos de la AP endonucleasa, que en humanos se encuentran en la posición D70 y E96 (Manvilla *et al.*, 2013). El sitio catalítico putativo de la proteína EhAPEX1 generado por el servidor Phyre<sup>2</sup>, lo constituyen los residuos de aminoácidos N23, E51, Y120, D160, N162, D231, D256 y H257, que en humanos presentan los residuos de aminoácidos E96, D210, N212, D283, D308 y H309 (Gorman *et al.*, 1997). Así mismo, la predicción generada por el servidor de los residuos de aminoácidos en *E. histolytica* que se encuentran implicados en la interacción con los grupos fosfatos del ADN para su unión, lo conforman N22, E50, Y119, N122, D159, N161 y H256; mientras que en humano lo conforman Y171, N174, N212 y H309 (Gorman *et al.*, 1997). Como se puede observar existe un desfase en el número de aminoácidos que contienen cada una de las APEX1 endonucleasas, tanto en humano como en *E. histolytica*. Las dos presentan los residuos de aminoácidos de unión con los grupos fosfato Y (171-119), N (174,122), N (212,161) y H (309, 256). La importancia catalítica de H309 y D283 es clara, ya que la mutación en estos dos residuos de aminoácidos reduce la actividad enzimática de la proteína.

Las endonucleasa flap (FEN), catalizan la eliminación endonucleolítica de ADN y de ARN en uniones tipo flap 5' de ácidos nucleicos, que se generan durante la síntesis de la cadena de ADN. FEN1 participa en la vía BER larga y su función está regulada y coordinada por la interacción física con componentes de esta vía como lo son APE1, Polβ, Lig1 y PCNA.

El sitio activo de EhFEN1 lo componen los residuos de aminoácidos D33, D86, E158,

# BIBLIOTECA UACM

E160, D179 y D181, mientras que en humanos lo componen las secuencias D34, D86, E160 y D181, coincidentes con lo que presenta *E. histolytica*. Mutaciones en los residuos de aminoácidos D34A, D86A, E160A y D181A producen una pérdida por completo de la actividad de esta enzima, por lo que se cree, tiene la función de catálisis de sustrato. Se ha visto que la modificación del residuo E160 en A160 de la proteína, es suficiente para que pierda por completo la actividad de flap endonucleasa. (Shen *et al.*, 1997). A su vez, EhFEN1 cuenta con dos motivos de unión a metales 1) D33, D86, E158 y E160 y 2) D179 y D181, que al igual que EhAPEX1 está compuesta principalmente de residuos de aminoácidos ácidos como aspártico y glutámico. La actividad de FEN1 es sólo funcional en presencia de  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ , es decir no soporta la interacción con otros cationes como  $Zn^{2+}$  (Balakrishnan y Bambara, 2013). La región C-terminal, es responsable de importantes interacciones con proteínas, que incluyen la proteína PCNA (Balakrishnan y Bambara, 2013). Para *E. histolytica*, los motivos de unión e interacción de EhFEN1 con EhPCNA generados por el servidor Phyre<sup>2</sup>, están conformados por los residuos de aminoácidos 27-GRV-29, K80, 167-VKA-169, 208-SxSS-211, 296-EWxK-299 y 336-QGRLx<sup>2</sup>FF-342, mientras los reportados en humano son 333-QGSTQxxLxxFF-344 (Sakurai *et al.*, 2005).

Para explorar los cambios de localización de dos proteínas importantes en la vía BER como lo son EhDNALigI y EhPCNA en *E. histolytica*, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia. En los grupos experimentales C se puede observar que ambas proteínas son totalmente nucleares y cuando se elimina por completo la cisteína y se da tratamiento con  $H_2O_2$ , ambas proteínas se observan peri-nucleares y en citoplasma.

Estos hallazgos nos sugieren que cuando se elimina la cisteína del medio se genera un posible estado oxidativo, ya que para mantener un potencial reducido en cultivos axénicos se usan agentes reductores; tal es el caso de la combinación de L-cisteína (0,1%) y ácido ascórbico

(0,02%) en el medio TYI-S33, aunque no se evidencia con la formación del aducto 8-OHdG.

La reubicación de ambas proteínas en el citoplasma y en la localización perinuclear, también sugiere un posible daño en estas proteínas que las llevaría a su degradación vía proteosomal para su posterior síntesis también se pueden observar algunas vacuolas que contiene a estas proteínas. A su vez, cuando se da tratamiento con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se puede observar que la tinción con estas dos proteínas es peri-nuclear con varias regiones de colocalización en *focis*, esto hasta la tercera hora de recuperación, lo que nos sugiere la interacción entre estas dos proteínas en la reparación del daño. Como se describió anteriormente, estas dos proteínas interaccionan *in-vitro* para llevar a cabo la formación de enlaces fosfodiéster llevada a cabo por la EhDNALigI y haciéndola más eficiente con EhPCNA (Cardona *et al.*, 2011)

Cabe destacar que en estudios *in-vitro* aún no reportados por Cardona Félix se observó que si se presenta el aducto en el ADN, no es posible llevar a cabo la formación del enlace fosfodiéster (Cardona F. datos no publicados).

## VII. Conclusiones

El modelo de estrés oxidativo con  $H_2O_2$  en *E. histolytica* permitió verificar, con base en la viabilidad y crecimiento post-tratamientos, la resistencia que muestra este parásito ante esta especie reactiva de oxígeno. Así mismo, se verificó que esta especie reactiva de oxígeno sobrepasa el sistema de defensa antioxidante, ocasionando lesiones al genoma, evidenciado con la formación del aducto 8-OHdG. Este daño podría ser reparado por el mecanismo de reparación por escisión de bases ya que la lesión disminuye a los tiempos de recuperación 6 y 24 h, además de que algunos genes (glicosilasas) son modulados y estos son, importantes en la remoción de bases nitrogenadas dañadas.

El análisis *in-silico* de la secuencia de aminoácidos de las proteínas estudiadas muestra la presencia de los dominios funcionales y la expresión en condición basal de estos genes sugiere su funcionalidad. Es interesante que los genes *ehdnaligI* y *ehpcna* aumenten su expresión durante la respuesta al daño inducido por tratamiento con  $H_2O_2$ , y que las proteínas codificadas por estas se relocalicen en el núcleo y co-localizen en regiones tipo *foci* sugiriendo su participación en la reparación del ADN.

## VIII. Perspectivas

Evaluar si *E. histolytica* tiene la capacidad de adaptarse a condiciones y agentes adversos para sobrevivir. A esta respuesta se le denomina hormesis, la cual está definida como el proceso por el cual la exposición a una dosis baja de un agente químico o bien un factor ambiental, que es dañino a dosis altas, induce una respuesta adaptativa y/o un efecto benéfico en la célula o el organismo. Por lo tanto, sería de gran importancia relacionar la hormesis con un aumento en la virulencia de este parásito.

Evaluar la abundancia proteica de las proteínas de la vía BER en respuesta al tratamiento con  $H_2O_2$  que nos confirme su participación en la reparación del daño.

Evaluar si las glicosilasas MutY y Nth pueden llevar a cabo la remoción de la base dañada con el aducto 8-OHdG.

Sobre-expresar o inhibir alguna de estas proteínas y evaluar si los trofozoítos pueden aumentar o disminuir su resistencia al estrés oxidativo.

## IX. Bibliografía

- **Arroyo R, Orozco E.** Location and Identification of *Entamoeba histolytica* adhesion. 1987. *Mol Biochem Parasitol.* 110:177-82.
- **Balakrishnan L, Bambara RA.** Flap endonuclease 1. 2013. *Annu Rev Biochem.* 82:119-38.
- **Bosch SS, Kronenberger T, Meissner KA, Zimbres FM, Stegehake D, Izui NM, Schettert I, Liebau E, Wrenger C.** Oxidative stress control by apicomplexan parasites. *Biomed Res Int.* 2015;2015:351289
- **Cardona-Félix CS, Pastor-Palacios G, Cárdenas H, Azuara-Liceaga E, Brieba LG.** Biochemical characterization of the ADN ligase I from *Entamoeba histolytica*. 2010. *Mol Biochem Parasitol.* 174(1): 26-35.
- **Connors R, Hooley E, Clarke AR, Thomas S, Brady radicales libres.** Recognition of oxidatively modified bases within the biotin-binding site of avidin. 2006. *J Mol Biol Mar.* 357(1):263-74.
- **Connors R, Hooley E, Clarke AR, Thomas S, Brady radicales libres.** Recognition of oxidatively modified bases within the biotin-binding site of avidin. 2006. *J Mol Biol.* 357(1):263-74.
- **Davis PH, Zhang X, Guo J, Townsend RR, Stanley SL.** Comparative proteomic analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. 2006. *Mol Microbiol.* 61:1523-32.
- **Dianov GL, Hübscher U.** Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. 2013. *Nucleic Acids Res.* 41(6):3483-90.
- **Doherty AJ, Suh SW.** Structural and mechanistic conservation in ADN ligases. 2000. *Nucleic Acids Res.* 28(21):4051-58.
- **Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A.** Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 318-331.
- **Furtado C, Kunrath-Lima M, Rajão MA, Mendes IC, de Moura MB, Campos PC, Macedo AM, Franco GR, Pena SD, Teixeira SM, Van Houten B, Machado CR.** Functional characterization of 8-oxoguanine ADN glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. 2012. *PLoS One.* 7(8):e42484.
- **Gajiwala K, Pinko C.** Structural rearrangement accompanying NAD<sup>+</sup> synthesis within a bacterial ADN ligase crystal. 2004. *Structure.* 12:1449 -59.
- **Ghadirian E, Somerfield SD, Kongshavn PA.** Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to Oxidants. 1985. *Infec Immun.* 51(1):263-67.
- **Ghosal G, Chen J.** ADN damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. 2013. *Transl Cancer Res.* 2(3):107-29.
- **Gilchrist C.A., Moore E.S., Zhang Y., Bousquet C.B., Lannigan J.A., Mann B.J., Petri W.A. Jr.** Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica* by the URE3-BP transcription factor. *MBio* (2010) 1:e00057-10
- **Gorman MA, Morera S, Rothwell DG, de La Fortelle E, Mol CD, Tainer JA, Hickson ID, Freemont PS.** The crystal structure of the human ADN repair endonuclease HAP1 suggests the recognition of extra-helical deoxyribose at ADN abasic sites. 1997. *EMBO J.* 16(21):6548-58.
- **Gredilla R, Garm C, Stevnsner T.** Nuclear and mitochondrial ADN repair in selected eukaryotic aging model systems. 2012. *Oxid Med Cell Longev.* 2012:282438.

- **Gretes MC, Poole LB, Karplus PA.** Peroxiredoxins in parasites. *Antioxid Redox Signal.* **2012.** 17(4):608-33.
- **Guan Y, Manuel RC, Arvai AS, Parikh SS, Mol CD, Miller JH, Lloyd S, Tainer JA.** MutY catalytic core, mutant and bound adenine structures define specificity for ADN repair enzyme superfamily. **1998.** *Nat Struct Biol.* 5(12):1058-64.
- **Guo X, Houpt E, Petri Jr AW.** Crosstalk at the initial encounter: interplay between host defense and ameba survival strategies. **2007.** *Curr Opin Immunol.* 19:376–84.
- **Haque R, Mondal D, Duggal P, Kabir M, Roy S, Farr BM.** *Entamoeba histolytica* infection in children and protection from subsequent amebiasis. **2006.** *Infect Immun.* 904–09.
- **Hecht O, Van Nuland NA, Schleinkofer K, Dingley AJ, Bruhn H, Leippe M, Grötzinger J.** Solution structure of the pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*. **2004.** *J Biol Chem.* 279(17):17834-41.
- **Holmgren A.** Thioredoxin and Glutaredoxin. **1989.** *J Biol Chem.* pp. 264(24):13963-96.
- [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Giardiasis\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Giardiasis_il.htm)
- **Husain A, Jeelani G, Sato D, Nozaki T.** Global analysis of gene expression in response to L-Cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **2011.** *BMC Genomics.* 12:275.
- **Huston CD, Boettner DR, Miller-Sims V, Petri WA Jr.** Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun.* 2003 Feb;71(2):964-72.
- **Ikeda S, Biswas T, Roy R, Izumi T, Boldogh I, Kurosky A, Sarker AH, Seki S, Mitra S.** Purification and characterization of human NTH1, a homolog of *Escherichia coli* endonuclease III. Direct identification of Lys-212 as the active nucleophilic residue. **1998.** *J Biol Chem.* 273(34):21585-93.
- **Isibasi A, Santa Cruz M, Ramírez A, Kumate J.** Inmunquímica de una lipofosfoglicana extraída de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* cepa HK cultivados en medio axénico, utilizando el método de fenol agua. **1982.** *Arch Invest Med.* 13:51-55.
- **Jacobs AL, Schär P.** ADN glycosylases: in ADN repair and beyond. *Chromosoma.* **2012.** 121(1):1-20.
- **Jie Li, Wuliji O, Wei Li, Zhi-Gang Jiang, Hossein AG.** Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. **2013.** *Int J Mol Sci.* 14(12):24438–75.
- **Johnson NA, McKenzie R, McLean L, Sowers LC, Fletcher HM.** 8-oxo-7,8-dihydroguanine is removed by a nucleotide excision repair-like mechanism in *Porphyromonas gingivalis* W83. **2004.** *J Bacteriol.* 186(22):7697-703.
- **Keene WE, Hidalgo ME, Orozco E, MCKERROW JH.** *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytophatic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine protease. **1990.** *Exp Parasitol.* 71:199-206.
- **Krokan HE, Bjørås M.** Base excision repair. **2013.** *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(4).
- **Krokan HE, Standal R, Slupphaug G.** ADN glycosylases in the base excision repair of ADN. **1997.** *Biochem J.* 325(1):1-16.
- **Kulbacka J, Saczko J, Chwilkowska A, Choromańska A, Skońska N.** Apoptosis, Free Radicals and Antioxidant Defense in Antitumor Therapy. **2012.** *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* » "Antioxidant Enzyme" 265-302.

- **Langerak P, Russell P.** Regulatory networks integrating cell cycle control with ADN damage checkpoints and double-strand break repair. **2011.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 366(1584):3562–71.
- doi: 10.1371/journal.pgen.1002271. Epub 2011 Sep 8.
- **Langerak P, Mejia-Ramirez E, Limbo O, Russell P.** Release of Ku and MRN from ADN ends by Mre11 nuclease activity and Ctp1 is required for homologous recombination repair of double-strand breaks. *PLoS Genet.* 2011 Sep;7(9):e1002271.
- **Lee CY, Bai H, Houle R, Wilson GM, Lu AL.** An *Escherichia coli* MutY mutant without the six-helix barrel domain is a dimer in solution and assembles cooperatively into multisubunit complexes with ADN. **2004.** *J Biol Chem.* 279(50):52653-63.
- **Leippe M, Andra J, Nickel R, Tanich E, Muller-Eberhard HJ.** Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. **1994.** *Mol Microbiol.* 14: 895-904.
- **Leippe M, Tanich E, Nickel R, Van der Goot G, Pattus F, Horstmann RD, Muller-Eberhard HJ.** Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. **1992.** *EMBO J.* 11:3501-06.
- **Li M, Wilson DM.** Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1. **2014.** *Antioxid Redox Signal.* 20(4):678-707.
- **Li X, Wu J, Han J, Hu Y, Mi K.** Distinct Responses of *Mycobacterium smegmatis* to Exposure to Low and High Levels of Hydrogen Peroxide. *PLoS One.* 2015 Jul 30;10(7):e0134595.
- **Lindah T, Wood RD.** Quality control by ADN repair. **1999.** *Science.* 286:1897–905.
- **Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UC, Samuelson J, Amedeo P, Roncaglia, et. al.** The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. **2005.** *Nature* Feb 24;433(7028):865-8.
- **López CC, Lopez CM, Weber C, Guillen N, Orozco E, Marchat LA.** ADN repair mechanisms in eukaryotes: Special focus in *Entamoeba histolytica* and related protozoan parasites. **2009.** *Infect Genet Evol.* 9(6):1051-56.
- **López CM, Orozco E, Marchat A and López CC.** Transcriptional profile of the homologous recombination machinery and characterization of the EhRAD51 recombinase in response to ADN damage in *Entamoeba histolytica*. *BMC Mol Biol.* 2008 Apr 10;9:35.
- **López DN, Gutiérrez RM, Cortés BE, Zentella DA, Konigsberg FM.** Daño al ADN y niveles de radicales libres en fibroblastos de ratones jóvenes y viejos. **2003.** *Rev Cub Invest Biomed.* 22:109-16.
- **Maga G, Hubscher U.** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. **2003.** *J Cell Sci.* 116(15):3051-60.
- **Manuel RC, Hitomi K, Arvai AS, House PG, Kurtz AJ, Dodson ML, McCullough AK, Tainer JA, Lloyd RS.** Reaction intermediates in the catalytic mechanism of *Escherichia coli* MutY ADN glycosylase. **2004.** *J Biol Chem.* 279(45):46930-39.
- **Manvilla BA, Pozharski E, Toth EA, Drohat AC.** Structure of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 with the essential Mg<sup>2+</sup> cofactor. **2013.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 69(12):2555-62.

- **María Clara Soto-Bernardini, Henriette Raventós-Vorst.** Papel del estrés oxidativo en la esquizofrenia AMC, vol 50 (4), octubre-diciembre 2008
- **Marnett LJ, Riggins JN, West JD.** Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with and protein. **2003.** *J Clin Invest.* 111:583-93.
- **Martin IV, MacNeill SA.** ATP-dependent ADN ligases. **2002.** *Genome Biol.* 3(4).
- **Matsumoto Y, Kim K.** Excision of deoxyribose phosphate residues by ADN polymerase beta during ADN repair. **1995.** *Science.* 269:699–702.
- **Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC, Bohr VA.** Base excision repair of oxidative ADN damage and association with cancer and aging. **2009.** *Carcinogenesis.* 30(1):2-10.
- **McCoy JJ, Mann BJ, Petri WA.** Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around. **1994.** *Infect Immun.* 62(8):3045-50.
- **Meza I, Cazares F, Rosales-Encina JL, Talamas-Rohana P, Rojkind M.** Use of antibodies to characterize a 220-kilodalton surface protein from *Entamoeba histolytica*. **1987.** *J Inf Dis.* 156:798-805.
- **Mitra B y Andrews NW.** IRONY OF FATE: role of iron-mediated EROin *Leishmania* differentiation. *Trends Parasitol.* 2013 Oct;29(10):489-96.
- **Nandi N, Sen A, Banerjee R, Kumar S, Kumar V, Ghosh AN, Das P.** Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Entamoeba histolytica* trophozoites. **2010.** *Microbiology.* 156(7):1926-41.
- **Naryzhny SN.** Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. **2008.** *Cell Mol Life Sci.* 65(23):3789-808.
- **Olivos GA, Saavedra E, Nequiz AM, Ruy Pérez-Tamayo.** Amibiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*. **2011.** *Rev Fac Med UNAM.* pp.10-20.
- **Oxilia MR.** Oxidative Stress and Antioxidant Defense System. **2010.** *Rev Inst Med Trop.* 5(2):23-29.
- **Pearson RJ, Morf L, Singh U.** Regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress-responsive genes through a novel transcription factor in the protozoan pathogen *Entamoeba histolytica*. **2013.** *J Biol Chem.* 288(6):4462-74.
- **Pertuz BS y Flores radicales libres.** Papel de la respuesta inmune celular en la resolución de la amibiasis. *Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC 2004;* 29: 91-98.
- **Petri WA.** Amebiasis and the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin: from lab bench to bedside. **1996.** *J Invest Med.* 44:24–35.
- **Rajeev K. Mehlotra.** Antioxidant Defense Mechanisms in Parasitic Protozoa. *Critical Reviews in Microbiology.* Volume 22, Issue 4, 1996 pages 295-314
- **Ralston KS and Petri WA Jr.** Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol.* 2011 Jun;27(6):254-63.
- **Rastew E, Vicente JB, Singh U.** Oxidative stress resistance genes contribute to the pathogenic potential of the anaerobic protozoan parasite, *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol.* 2012 Oct;42(11):1007-15
- **Ravdin JI, Moreau F, Sullivan JA, Petri AW, Mandell LG.** Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. **1988.** *Infect Immun.* 56:1505–12.

- **Ravdin JI, Stanley P, Murphy FC, Petri AW.** Characterization of cell surface carbohydrate receptors for *Entamoeba histolytica* adherence lectin. **1989.** *Infect Immun.* 57:2179–86.
- **Reed SL and Gigli I.** Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. **1990.** *J Clin Invest.* 86:1815-22.
- **Reed SL, Keene WE, McKerrow JH.** Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. **1989.** *J Clin Microbiol.* 27(12): 2772–77.
- **Rodríguez MA, Hernández F, Santos L, Valdés J, Orozco E.** *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship. **1989.** *Mol Biochem Parasitol.* 37:87-100.
- **Saffer LD, Petri WA.** Role of the Galactose Lectin of *Entamoeba histolytica* in Adherence-Dependent Killing of Mammalian Cells. *Infection and Immunity.* **1991.** Pp. 4681-83.
- **Sakurai S, Kitano K, Yamaguchi H, Hamada K, Okada K, Fukuda K, Uchida M, Ohtsuka E, Morioka H, Hakoshima T.** Structural basis for recruitment of human flap endonuclease 1 to PCNA. **2005.** *EMBO J.* 24(4):683-93.
- **Serrano-Luna J, Piña-Vázquez C, Reyes-López M, Ortiz-Estrada G, de la Garza M.** Proteases from *Entamoeba spp.* and Pathogenic Free-Living Amoebae as Virulence Factors. **2013.** *J Trop Med.* 890603.
- **Shen B, Nolan JP, Sklar LA, Park MS.** Functional analysis of point mutations in human flap endonuclease-1 active site. **1997.** *Nucleic Acids Res.* 25(16):3332-38.
- **Shuman S.** ADN ligases: Progress and prospects. **2009.** *J Biol Chem.* 284(26):17365-69.
- **Siman-Tov R, Ankri S.** Nitric oxide inhibits cysteine proteinases and alcohol dehydrogenase 2 of *Entamoeba histolytica* **2003.** *Parasitol Res.* 89:146–49.
- **Stanley SL, Becker A, Kunz-Jenkis C, Foster L, Ellen L.** Cloning and expression of membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. **1990.** *Prot Natl Acad Sci.* 87:4976-80.
- **Stanley SL.** Amoebiasis. **2003.** *Lancet.* 361:1025-34.
- **Strus M, Janczyk A, Gonet-Surowka A, Brzychczy-Wloch M, Stochel G, Kochan P, Heczko PB.** Effect of hydrogen peroxide of bacterial origin on apoptosis and necrosis of gut mucosa epithelial cells as a possible pathomechanism of inflammatory bowel disease and cancer. **2009.** *J Physiol Pharmacol.* 60(6):55-60.
- **Strzalka W, Ziemienowicz A.** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in ADN replication and cell cycle regulation. **2011.** *Ann Bot.* 107(7):1127-40.
- **Talamás LD, Chávez MB, González RA, Talamás RP, Salazar VL, Durán DA, Martínez PA.** Erythrophagocytosis in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* a comparative study. **2014.** *Biomed Res Int.* 2014:626259.
- **Teixeira JE, Mann BJ.** *Entamoeba histolytica*-induced dephosphorylation in host cells. **2002.** *Infect Immun.* 70:1816–23.
- **Tejman-Yarden N., Eckmann L.** New approaches to the treatment of giardiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis* (2011). 24 451–456.
- **Tell G, Fantini D, Quadrifoglio F.** Understanding different functions of mammalian AP endonuclease (APE1) as a promising tool for cancer treatment. **2010.** *Cell Mol Life Sci.* 67(21):3589-608.
- **Thayer MM, Ahern H, Xing D, Cunningham RP, Tainer JA.** Novel ADN binding motifs in the ADN repair enzyme endonuclease III crystal structure. **1995.** *EMBO J.* 14(16):4108-20.

- **Tom S, Henricksen LA, Park MS, Bambara RA.** ADN ligase I and proliferating cell nuclear antigen form a functional complex. *J Biol Chem.* 2001 Jul 6;276(27):24817-25.
- **Trejo SJ, Castañón OJ.** Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. 2009. *Infect.* 13(2):100-10.
- **Valavidinis A, Vlachogianni T, Fiotakis C.** 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. 2009. *J Environ Sci Heal.* 27:120-39.
- **Van Loon B, Markkanen E, Hübscher U.** Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *ADN Repair (Amst).* 2010 Jun 4;9(6):604-16
- **Venereo GJ.** Daño oxidante, radicales libres y antioxidantes. 2002. *Rev Cubana Med Milit.* 31:126-33.
- **Vicente BJ, Gretchen M, Ehrenkauser, Ligía MS, Teixeira M, Upinder S.** *Entamoeba histolytica* modulates a complex repertoire of novel genes in response to oxidative and nitrosative stresses: implication for amebis pathogenesis. 2009. *Cellular Microbiology.* 11(1):51-69.
- **Walsh JA.** Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. 1986. *Rev Infect Dis.* 8:228-38.
- **Watanabe T, Blaisdell JO, Wallace SS, Bond JP.** Engineering functional changes in *Escherichia coli* endonuclease III based on phylogenetic and structural analyses. 2005. *J Biol Chem.* 280(40):34378-84.
- **Wei H, Cai Q, Rahn R, Zhang X.** Singlet oxygen involvement in ultraviolet (254 nm) radiation-induced formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in ADN. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(1):148-54.
- **Weidinger A, Kozlov AV.** Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. 2015. *Biomolecules.* 5(2): 472-84.
- **Wilson W, Weedall GD, Hall N.** Host-Parasite interactions in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: what have learned from their genomes?. 2012. *Parasite Immunology.* 34:90-9.
- **Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T.** Human ADN repair genes. 2001. *Science.* 291:1284-89.
- **Young JD, Cohn TM, Lu LP, Unkeless JC, Cohn ZA.** Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. 1992. *J Exp Med.* 156: 1677-90.
- **Zheng L, Dai H, Hegde ML, Zhou M, Guo Z, Wu X, Wu J, Su L, Zhong X, Mitra S, Huang Q, Kernstine KH, Pfeifer GP, Shen B.** Fen1 mutations that specifically disrupt its interaction with PCNA cause aneuploidy-associated cancer. *Cell Res.* 2011 Jul;21(7):1052-67.
- **Zunino A, Degan P, Vigo T, Abbondandolo A.** Hydrogen peroxide: effects on ADN, chromosomes, cell cycle and apoptosis induction in Fanconi's anemia cell lines. *Mutagenesis.* 2001 May;16(3):283-8.
- **Tillack M, Biller L, Irmer H, Freitas M, Gomes MA, Tannich E, Bruchhaus I.** The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics.* 2007 Jun 14;8:170.

Coordinación de Certificación y Registro

**UACM**

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

Nada Humano me es ajeno

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, abajo firmantes, aprobaron la Tesis titulada: “**Inducción de daño al ADN y evaluación de la expresión génica de la maquinaria de reparación por escisión de bases (BER) cuando se somete a estrés oxidativo a *Entamoeba histolytica***” que presentó **David Hernández Álvarez** el día 29 de marzo del 2016.

---

P R E S I D E N T A

**Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga**

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

---

S E C R E T A R I O

**Dr. José de Jesús Olivares**

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

---

V O C A L

**Dra. Abigail Betanzos Fernández**

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

---

V O C A L

**Dr. Armando Luna López**

Instituto Nacional de Geriátría

---

V O C A L

**Dr. Mario Cesar López Camarillo**

Universidad Autónoma de la Ciudad de México