

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *miRNAs* EN TROFOZOÍTOS
DE *Entamoeba histolytica*”**

Por:

M.C. JANNET EDITH SALINAS HERNÁNDEZ

Como requisito para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

con Especialidad en Microbiología

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN.

DICIEMBRE, 2013

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *miRNAs* EN TROFOZOÍTOS DE
Entamoeba histolytica”**

Por:

M.C. Jannet Edith Salinas Hernández

Comisión de Tesis:

DRA. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ
Presidente

DR. FERMIN MAR AGUILAR
Secretario

DR. PABLO ZAPATA BENAVIDES
Vocal

DRA. MARÍA PORFIRÍA BARRÓN GONZÁLEZ
Vocal

DR. MARIO R. MORALES VALLARTA
Vocal

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN.

DICIEMBRE, 2013

LUGAR DE TRABAJO

Este trabajo se realizó en la Unidad de Biología del Desarrollo, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, perteneciente a los departamentos de Microbiología e Inmunología, Biología Celular y Genética, bajo la dirección de la **Dra. Diana Reséndez Pérez**.

“Y todo lo que hacéis, sea de palabra o de hecho, hacedlo todo en el nombre del Señor Jesús, dando gracias a Dios Padre por medio de él”

Colosenses 3:17

DEDICATORIA

DIOS QUE HA ESTADO CONMIGO SIEMPRE EN CADA MOMENTO DE MI VIDA, ESTE PROYECTO ES PARA TI Y POR TI, Y TODO LO QUE VIENE TAMBIÉN LO SERÁ.

REYNOL SALINAS PÁEZ Y GLORIA MARGARITA HERNÁNDEZ LÓPEZ SU GRAN AMOR, APOYO, COMPRENSIÓN, ESFUERZO ES EL IMPULSO PARA SEGUIR SUPERANDOME Y CUMPLIENDO METAS Y SUEÑOS DÍA A DÍA Y ESTE NO SERÁ EL ÚLTIMO. LOS AMO MUCHO Y LOS BENDIGO.

REYNOL, BRIAN Y EIMY SU COMPAÑÍA, DESVELOS, RISAS, OCURRENCIAS, AYUDA INCONDICIONAL ASÍ COMO TODOS LOS MOMENTOS QUE HICIERON MEMORABLE ESTA ETAPA DE MI VIDA. LOS AMO MUCHO

MIS ABUELITOS **MARTHA G. PÁEZ SÁENZ, JUAN FRANCISCO PÁEZ** † Y **CARLOS HERNÁNDEZ MORENO**, SUS ORACIONES SIGUEN SIENDO FUNDAMENTALES EN LA BASE DEL ÉXITO EN MI PERSONA, GRACIAS POR SEGUIR A MI LADO, AUNQUE UNO DE USTEDES YA NO LO ESTÉ EN FÍSICO, LO ESTA EN MI CORAZÓN.

A **FÉLIX ALBERTO VARELA GUILLÉN**, POR COMPARTIR TU TIEMPO E INVERTIRLO A MI LADO SIEMPRE, APOYANDOME INCONDICIONALMENTE E INYECTANDOME ÁNIMOS CUANDO MÁS LO NECESITABA, TUS ORACIONES FUERON ESCUCHADAS Y ES POR ESO QUE HOY PUDE CERRAR ESTE CICLO Y COMENZAR UNO NUEVO A TU LADO, TE AMO ∞

AL **DR. MARIO RODOLFO MORALES VALLARTA** POR INICIARME EN ESTE MUNDO DE LA INVESTIGACIÓN TRABAJANDO CON ESTA PEQUEÑA AMIGA *E.histolytica* Y CULMINO MI ÚLTIMO GRADO ACADÉMICO ESTUDIANDO SU DIMINUTO MUNDO MOLECULAR.

AL **DR. FERMIN MAR AGUILAR** QUE POR SEGUNDA OCASIÓN ME AYUDÓ A TERMINAR EL PROYECTO Y ME EXTENDIÓ SU MANO EN EL MOMENTO OPORTUNO DEL PROCESO, SUS COMENTARIOS, CONSEJOS ACERTADOS FUERON MUY IMPORTANTES PARA NO DESESPERAR Y RECORDAR QUE LA FE ES LO QUE NOS MANTIENE.

A LA **BIÓL. CLAUDIA DALILA ALTAMIRANO TORRES** POR ESCUCHARME YA QUE ESE ES UN DON QUE DIOS TE HA DADO Y FUE DE GRAN BENDICIÓN A MI VIDA DURANTE TODO ESTE LARGO PROYECTO, PERSONAS COMO TU NO SE ENCUENTRAN CON FACILIDAD, TE QUIERO MUCHO.

A LA **DRA. DIANA RESENDEZ PÉREZ** POR SER LA MENTORA POR EXCELENCIA QUE DIOS PUSO EN MI CAMINO, Y ADEMÁS SER MI PRIMER JEFE EN MI CARRERA PROFESIONAL QUE EL DÍA DE HOY ES EXITOSA GRACIAS A SU FORMACIÓN NO SOLO ACADÉMICA SINO COMO SER HUMANO.

AGRADECIMIENTOS

A CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA POR EL APOYO OTORGADO MEDIANTE UNA BECA PARA PODER REALIZAR ESTE PROYECTO.

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO **NANCY, ISMAEL, CITLALI, AZENETH, FRANCISCO, ARTURO, AMAURI, SALOMÉ, CLAUDIA GRACIAS** POR SU COMPAÑÍA, POR SU AYUDA INCONDICIONAL, SU PRONTA DISPOSICIÓN PARA DISCUTIR ESTRATEGIAS NUEVAS DE TRABAJO EXPERIMENTAL QUE FUERAN MAS PRODUCTIVAS AL PROYECTO, SU AMISTAD ES UN TESORO PARA MI.

A LA **DRA. DIANA** GRACIAS POR LA OPORTUNIDAD DE SER SU BECARIA, ESTUDIANTE DE SERVICIO SOCIAL, LICENCIATURA, MAESTRÍA Y DOCTORADO, ADEMÁS DE SER PARTE DE SU EQUIPO DE INVESTIGACIÓN TODO ESTO POR CASI 15 AÑOS, MIL GRACIAS POR SU CONFIANZA Y ENSEÑANZAS, LA ADMIRO MUCHO.

AL **DR. SOCORRO GUAJARDO** Y EL **CIDEB** POR TODAS LAS FACILIDADES BRINDADAS PARA PODER CURSAR ESTE POSGRADO.

A LA **Q.F.B ELSA FLORES** POR DEJARME USAR SU LABORATORIO CUANDO TENIA QUE REALIZAR ALGUN EXPERIMENTO EN EL CIDEB, POR SU PLÁTICA, SUS CONSEJOS Y ESCUCHARME CUANDO MÁS LO NECESITE, MUCHAS GRACIAS ELSA.

A **FÉLIX VARELA** POR AYUDARME ∞ CON PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES, PRÁCTICOS, DIGITALES QUE AUNQUE NO ES TU ÁREA FUISTE TENAZ Y APRENDISTE PARA PODER EFICIENTAR ESTA TESIS.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
NOMENCLATURA Y SIMBOLOGÍA.....	1
LISTA DE FIGURAS.....	2
LISTA DE TABLAS.....	3
1. RESUMEN.....	4
2. ABSTRACT.....	6
3. INTRODUCCIÓN.....	7
4. HIPÓTESIS.....	9
5. OBJETIVOS.....	9
5.1 Objetivo general.....	9
5.2 Objetivos particulares.....	9
6. IMPORTANCIA.....	10
7. ANTECEDENTES.....	13
7.1 <i>Entamoeba histolytica</i>	13
7.2 Epidemiología.....	14
7.3 Ciclo de vida.....	15
7.4 Ciclo de vida <i>in vitro</i>	17
7.5 Genoma de <i>Entamoeba histolytica</i>	18
7.6 Regulación génica de <i>Entamoeba histolytica</i>	19
7.7 RNAs pequeños.....	20
7.8 MicroRNAs	21

7.9 Biogénesis de los microRNAs	22
7.10 Identificación de microRNAs.....	24
7.11 Presencia de microRNAs en diferentes organismos.....	25
7.11.1 microRNAs en <i>Schistosoma japonicum</i>	25
7.11.2 microRNAs en <i>Trichomonas vaginalis</i>	26
7.11.3 microRNAs en <i>Entamoeba histolytica</i>	26
8. ESTRATEGIA GENERAL.....	27
9. MATERIALES Y MÉTODOS	28
9.1 Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	28
9.2 Extracción de DNA genómico.....	28
9.3 Caracterización molecular de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	29
9.4 Extracción de RNA total y RNAs pequeños	31
9.4.1 Análisis de la calidad de los RNAs.....	32
9.5 Diseño de microarreglo para los miRNAs de <i>E. histolytica</i>	34
9.6 Verificación de los miRNAs de <i>Entamoeba histolytica</i>	35
mediante RT-PCR tiempo real.....	35
9.7 Predicción de los genes de miRNAs de <i>E. histolytica</i> ...	37
10. RESULTADOS.....	38
10.1 Extracción DNA genómico y RNAs totales y pequeños en <i>E. histolytica</i>	38
10.2 Caracterización de los acidos nucleicos de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	39

10.3	Análisis de la expresión de los miRNAs de <i>E. histolytica</i> mediante microarreglos.....	40
10.4	Confirmación de la expresión de miRNAs mediante RT-PCR tiempo real	44
10.5	Análisis de los genes blanco probables de los miRNAs en <i>E. histolytica</i>.....	50
11.	DISCUSIÓN.....	52
12.	CONCLUSIONES.....	57
13.	PERSPECTIVAS.....	59
14.	LITERATURA CITADA.....	62
15.	APÉNDICE: PUBLICACIONES Y CONGRESOS.....	78

NOMENCLATURA Y SIMBOLOGÍA

DNA	Ácido Desoxiribonucleico (Desoxiribonucleic Acid)
RNA	Ácido Ribonucleico (Ribonucleic Acid)
miliQ	Agua ultrapurificada
dNTP	Deoxynucleótidos trifosfatados
°C	Grados celsius
g	Gramos
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno
µg	Microgramos
µl	Microlitros
miR	MicroRNA
mg	Miligramos
mg/ml	Miligramos por mililitro
ml	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minutos
M	Molaridad
Ng	Nanogramo
nt	Nucleótidos
ng/µl	Nanogramos por microlitos
pb	Pares de bases
%	Porcentaje
PC	Posible candidato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Retrotranscripción
seg	Segundos
T	Temperatura
Tm	Temperatura media de alineamiento
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
UV	Ultravioleta
U/µl	Unidades por microlitro
V	Voltio
V/V	Volumen por Volumen

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	16
2. Biogénesis de los miRNAs.....	23
3. Extracción de DNA genómico y RNAs totales de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	38
4. Digestión del DNA genómico amplificado de <i>Entamoeba histolytica</i> con <i>Xba</i> I.....	39
5. Microarreglo de la expresión de los miRNAs candidatos en los trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	41
6. Curva de disociación del PCR tiempo real de los miRNAs candidatos en trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	46
7. Amplificación mediante PCR tiempo real de los miRNAs en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	48
8. Amplificación mediante PCR tiempo real de los miRNAs candidatos en trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> amplificados en menos de 35 ciclos.....	49

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Oligonucleótidos para la identificación de <i>Entamoeba histolytica</i>	30
II. Descripción de la mezcla de reacción para la PCR.....	30
III. Programa para la amplificación mediante PCR.....	31
IV. Mezcla de reacción para la caracterización enzimática.....	31
V. Programa para la amplificación de los miRNAs mediante PCR tiempo real.....	37
VI. Expresión de posibles candidatos a miRNAs en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	42
VII. Lista de oligonucleótidos respecto al número de copias de la secuenciación.....	44
VIII. Lista de oligonucleótidos respecto a la expresión en el microarreglo.....	45
IX. Lista de miRNA candidatos y sus posibles genes blanco en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	50

1. RESUMEN

Entamoeba histolytica representa una de las principales causas a nivel mundial de muertes por parasitosis. Aunque se ha identificado como el agente causal de la amibiasis desde 1875, los mecanismos moleculares por los cuales este parásito causa la enfermedad aún no están completamente comprendidos. Los microRNAs (miRNAs) son grupos de RNAs pequeños no codificantes que juegan un papel importante en la regulación de la expresión de genes y la traducción de proteínas en una gran variedad de organismos. Su identificación ha sido un paso importante para facilitar y entender la biología, organización y evolución del genoma, así como su regulación post-transcripcional, sin embargo en *E. histolytica* no se tiene registro de la presencia de estas moléculas reguladoras. En nuestro laboratorio a partir de un cultivo de trofozoitos de *E. histolytica* en condiciones axénicas se aislaron los RNA totales y se purificaron en una fracción de 15 a 50 nucleótidos los cuales se utilizaron para construir una biblioteca de RNAs pequeños que posteriormente fueron secuenciados y en donde se detectaron 199 miRNAs exclusivos para este parásito. Durante el desarrollo de esta tesis, se analizó la expresión de miRNAs en trofozoitos de *E. histolytica* HM1-IMSS, usando la técnica de microarreglo μ Paraflo Microfluidic Biochip Technology y posteriormente se realizó la verificación de la expresión de los miRNAs mediante RT-PCR Tiempo Real. Los resultados del microarreglo demostraron la expresión de 41 candidatos a miRNAs de los cuales se confirmó la presencia de 9 microRNAs de *E. histolytica* (Ehi-miRNAs) mediante RT-PCR Tiempo Real. La estructura de los Ehi-miRNAs permitió predecir 32 probables genes blanco ya descritos y 34 genes hipotéticos probables. Los resultados

obtenidos postulan una colección de miRNAs reguladores en *E. histolytica* que generan una plataforma para analizar molecularmente la estructura genómica, regulación génica y validación de los Ehi-miRNAs en este parásito.

2. ABSTRACT

Entamoeba histolytica represents one of the leading causes of parasitic death worldwide. Although identified as the causative agent of amebiasis since 1875, the molecular mechanisms by which the parasite causes disease are still not fully understood. MicroRNAs (miRNAs) are groups of non-coding small RNAs that play important roles in regulating gene expression and protein translation in a wide group of organisms. Its identification has been a critical step to facilitating our understanding of biology, genome evolution as well as the post-transcriptional regulation, however in *E. histolytica* there is no report about the presence of these regulatory molecules. In our laboratory, total RNA was isolated and a fraction of 15 to 50 nucleotides was purified from an axenic trophozoites culture to build a genetic library that was sequenced and 199 miRNAs unique to this parasite were detected. In this thesis, the expression of miRNAs in *E. histolytica* strain HMI-IMSS trophozoites culture was analyzed by microarray μ Paraflo Microfluidic Biochip Technology, and was further confirmed by Real-Time RT-PCR. The results showed the expression of 41 potential miRNAs of which 9 miRNAs of *E. histolytica* (Ehi-miRNAs) were confirmed by Real-Time RT-PCR. The Ehi-miRNAs structure predicted 32 known target genes and 34 hypothetical genes. The obtained results postulate a collection of regulatory miRNAs in *E. histolytica* that could be used as a new platform to analyze the genomic structure, gene regulation and validation of the Ehi-miRNAs in this parasite.

3. INTRODUCCIÓN

El parásito *Entamoeba histolytica* es un organismo unicelular que pertenece a la familia Entamoebidae y puede existir en dos formas: el quiste y el trofozoíto (Ravdin, 1995), y es el agente causante de la amibiasis cuya infección ocurre por ingestión de quistes maduros presentes en alimentos, agua o manos contaminados con heces. La prevalencia de infección amibiana puede ser tan alta como 50% en ciertas áreas de los países en desarrollo. La virulencia de *E. histolytica* está íntimamente relacionada con su capacidad motil para penetrar en el tejido humano, su poderosa actividad citotóxica y su actividad fagocítica sobre las células humanas. También se sabe que el contacto cercano entre el parásito y la célula eucariótica blanco es mediado por moléculas específicas de ambas superficies celulares, sugiriendo que las interacciones parásito-célula tienen un papel muy importante en la virulencia. En la última década se han estudiado unas moléculas denominadas MicroRNAs (miRNAs) las cuales se encuentran involucradas en muchos procesos celulares y del desarrollo como son: el tiempo de desarrollo, proliferación celular entre otros, sin embargo la identificación y verificación de nuevos miRNAs es una de los mayores retos a los cuales nos enfrentamos ya que solo algunos han sido descubiertos y la mayoría han sido validados por clonación y secuenciación complementados con análisis bioinformáticos. *Entamoeba histolytica* requiere una regulación controlada en la expresión de sus genes para tener un cambio dinámico entre sus formas de quiste y trofozoito y así sobrevivir dentro y fuera de su hospedero bajo condiciones de estrés. A la fecha, su genoma ya se encuentra totalmente secuenciado

(Loftus *et al.*, 2005) y actualizado (Lorenzi HA, 2010) así como evidencias de la presencia de maquinaria de procesamiento para los miRNAs en *E. histolytica* (Abed y Ankri., 2005; Kaur y Lohia, 2004; Ullu *et al.*, 2004) por lo que se han realizado predicciones *in silico* para la búsqueda de miRNAs en este organismo (De *et al.*, 2006). Sin embargo, actualmente no se ha demostrado experimentalmente la presencia de estos miRNAs en este parásito. En nuestro laboratorio a partir de un cultivo de trofozoitos de *E. histolytica* en condiciones axénicas se aisló el RNA total y se purificó una fracción de 15 a 50 nucleótidos los cuales se utilizaron para construir una biblioteca de RNAs pequeños que posteriormente fueron secuenciados y en donde se descubrieron 199 miRNAs exclusivos para este parásito (Tamez-Guerrero, 2013). Por lo que en esta tesis, se analizaron experimentalmente la expresión de los miRs en la fase de trofozoito de *E. histolytica*, y se validó su presencia así como se determinó mediante bioinformática sus posibles genes blanco. La información generada abre un panorama muy interesante para entender un poco más el comportamiento molecular de los miRNAs de este parásito, lo cual nos puede ayudar a generar nuevas herramientas para combatir al parásito, para mejorar el diagnóstico en pacientes o para entender el porque de la relación de éste parásito con su huésped.

4. HIPÓTESIS

El análisis de la expresión de los miRNAs en los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* permitirá determinar su presencia en este parásito, así como predecir sus probables genes blancos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar la expresión de miRNAs en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y predecir sus probables genes blanco.

5.2 Objetivos Particulares

- 1.- Analizar la expresión de los miRNAs en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* mediante microarreglos.
- 2.- Confirmar la expresión de los miRNAs en trofozoítos *Entamoeba histolytica* mediante RT-PCR tiempo real.
- 3.- Predecir los genes blanco probables de los miRNAs de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* mediante la herramienta bioinformática miRanda.

6. IMPORTANCIA

Entamoeba histolytica tiene una distribución mundial; sin embargo, las infecciones son más frecuentes en los países en vías de desarrollo como América Latina. En México la amebiasis intestinal en el 2011 fue de 419,564 casos, la cual disminuyó aproximadamente en un 70% en relación a los pacientes reportados en el 2000. A pesar de la disminución en estos últimos años aún no se logra la total erradicación de este padecimiento, por lo que es importante seguir estudiando a este parásito para encontrar nuevas estrategias para combatirlo (SUIVE/DGE/SALUD/, 2011).

La regulación de la expresión de genes se lleva a cabo de manera espacio-temporal y es vital para el crecimiento y el desarrollo de los organismos vivos para una respuesta óptima frente a los estímulos ambientales, y esta se alcanza mediante múltiples mecanismos que operan a niveles, desde el transcripcional hasta el nivel postraducciona (Carrington y Ambros 2003; Sunkar *et al.*, 2007). El reciente descubrimiento de los microRNAs (miRNAs) ha expandido el conocimiento de los mecanismos celulares que regulan la expresión de genes a nivel postranscripcional en eucariotes (Bartel, 2004).

A la fecha se ha documentado muy bien que la inhibición de la expresión génica dirigida por miRNAs, sin embargo recientemente se ha sugerido que estas moléculas también potencian la expresión de su gen blanco y esta “oscilación” de la actividad entre silenciadores o potenciadores de la expresión génica al parecer depende del estado del ciclo celular. Se ha observado que los miRNAs tienen funciones críticas en casi todos

los procesos biológicos estudiados, desde el control del desarrollo, proliferación celular, destino celular, diferenciación celular hasta el cáncer (Mendell, 2008). Incluso, recientemente se ha postulado que los miRNAs podrían ser utilizados como biomarcadores para la identificación de diferentes tipos de cáncer (Rosenfeld *et al.*, 2008) o inclusive como agentes o blancos terapéuticos (Ambros 2004; Love *et al.*, 2008).

Muchas familias de miRNAs están conservadas entre animales vertebrados y sus funciones también han sido bien conservadas, sin embargo, muchos miRNAs descubiertos recientemente en humanos y chimpancés no están conservados mas alla de los mamíferos y el 10% de ellos son específicos para la taxa (Berezikov *et al.*, 2006b). Como resultado de la extensión de estos estudios a otras especies animales se han identificados nuevos miRNAs específicos de linaje y especie-específicos (Berezikov *et al.*, 2006a; Glazov *et al.*, 2008). Estos hallazgos sugieren que la secuenciación de pequeñas bibliotecas de RNAs pequeños a partir de organismos individuales es muy importante para identificar y catalogar miRNAs especie-específicos y/o conservados tanto en plantas y animales como en bacterias, virus y eucariotes unicelulares (Burnside *et al.*, 2008; Sunkar y Jagadeeswaran, 2008). Uno de los requisitos del proceso es el conocimiento de la secuencia completa del genoma de la especie a estudiar, sin esto, la identificación de miRNAs especie-específicos se torna muy difícil.

En años recientes algunos investigadores han iniciado un esfuerzo por clonar y secuenciar miRNAs procedentes de parásitos de importancia médica, tales como, *Schistosoma japonicum* (Xue *et al.*, 2008) y *Trichomonas vaginalis* (Lin *et al.*, 2009).

La secuenciación completa del genoma de *E. histolytica*, (Loftus *et al.*, 2005) y actualización (Lorenzi *et al.*, 2010) es un requisito importante para realizar la caracterización correcta de nuevos miRNAs especie-específicos, por lo que se realizó un análisis *in silico* para la búsqueda de miRNAs en *E. histolytica* reportando el hallazgo de 17 miRNAs probables. Sin embargo, hasta el momento no se ha realizado ningún experimento de clonación que valide este hallazgo (De *et al.*, 2006). En nuestro laboratorio recientemente se llevo a cabo la secuenciación de RNAs pequeños en la búsqueda de miRNAs a partir de un cultivo de trofozoitos de *E. histolytica* y en donde se detectaron 199 miRNAs exclusivos para este parásito (Tamez-Guerrero, 2013). Por ello, el desarrollo de esta tesis constituye la primera evidencia experimental de investigación a nivel mundial en analizar la expresión de estos miRNAs y su confirmación de manera experimental en trofozoitos de *E. histolytica*.

7. ANTECEDENTES

7.1 *Entamoeba histolytica*

Emil Brump, en 1925, designó *Entamoeba dispar* al tipo de amiba que infectaba a las personas sin causarles ningún daño y la diferenció de *Entamoeba histolytica*, agente causal de la disentería amibiana y otros padecimientos extraintestinales. Las amibas aisladas de las personas enfermas se diferenciaban de las de individuos sanos por su capacidad de aglutinación con ciertas lectinas, (Martinez-Palomo *et al.*, 1973), por sus patrones isoenzimáticos, (Sargeant *et al.*, 1978), sus diferencias antigénicas (Strachan *et al.*, 1988) y diferencias en el DNA (Clark y Diamond 1991; Tannich *et al.*, 1989). Esto permitió que la comunidad científica adoptara a *Entamoeba dispar* como una especie distinta de *Entamoeba histolytica* (Diamond y Clark, 1993) lo cual se aceptó por la OMS en 1997. Con este hecho, aparentemente tan simple, se revaloraron diferentes estudios epidemiológicos que no consideraban la co-existencia de dos especies diferentes de *Entamoeba*.

Durante mucho tiempo *Entamoeba histolytica* se consideró un microorganismo primitivo por carecer de mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico y poseer un metabolismo energético similar al de las bacterias. Sin embargo, los estudios recientes sugieren que la falta de mitocondrias es un fenómeno secundario (Clark, 2000; Mai *et al.*, 1999) y su localización filogenética varía según los genes que se utilicen para su análisis (Baptiste *et al.*, 2002; Clark, 2000). Seguramente su clasificación taxonómica seguirá cambiando conforme se obtengan más datos genéticos y moleculares del parásito; lo que queda claro es que su clasificación morfológica ya es obsoleta.

7.2 Epidemiología

Entamoeba histolytica tiene una distribución mundial; sin embargo, las infecciones son más frecuentes en los países en vías de desarrollo, como el continente Americano, Asia y África. Las zonas con mayor endemia son los países tropicales y subtropicales, además de implicar factores sociodemográficos y de accesibilidad a los servicios sanitarios en una comunidad en particular.

La transmisión de *Entamoeba histolytica* es por vía fecal-oral. La ingestión de los quistes (bebidas, alimentos, manos contaminadas) es la forma más frecuente de transmisión y el hombre es el único huésped conocido de *Entamoeba histolytica*. Se considera que 10% de la población general está infectada y 90% no tienen síntomas. Se calcula que cada año ocurren 50 millones de casos sintomáticos (enfermos), de los cuales 100,000 son mortales (Walsh, 1986). En México la amibiasis es uno de los problemas sanitarios de salud pública más importantes. Un estudio seroepidemiológico reportó que 8.41% de la población tiene anticuerpos antiamebianos, lo que demuestra la elevada frecuencia de infección por este parásito (Caballero-Salcedo *et al.*, 1994). En México la amebiasis intestinal en el 2011 fue de 419,564 casos, lo cual disminuyó aproximadamente al 70% con relación a lo registrado en el año 2000 (SUIVE/DGE/SALUD/, 2011).

7.3 Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*

El humano es infectado (Figura 1) cuando ingiere agua o alimentos contaminados (1) con quistes maduros (2), los cuales eclosionan (3) y atraviesan el lumen intestinal hasta llegar a la región del íleon terminal (4) en donde inicia el proceso de desenquistamiento, durante este evento a partir de un quiste emerge un trofozoíto multinucleado el cual inmediatamente se divide por fisión binaria (5), algunos trofozoitos invaden la mucosa intestinal (6) y pueden afectar otros órganos como el hígado, cerebro y pulmones (7). Los trofozoítos pueden convertirse en trofozoítos prequísticos (8) los cuales presentan uno (9) o dos núcleos (10), contienen agregados de ribosomas, llamados cuerpos cromatoides, también contiene vacuolas alimenticias, en esta etapa el núcleo sufre rápidamente dos divisiones seguidas, lo cual da origen a un quiste tetranucleado maduro (11), el cual es eliminado fuera del colon a través de las heces fecales (12) formadas no diarreicas; en esta etapa tanto los cuerpos cromatoides como las vacuolas de glucógeno no pueden ser observadas (Clark y Diamond, 2002; Garcia y Buckner, 1997 y Katz *et al.*, 1989).

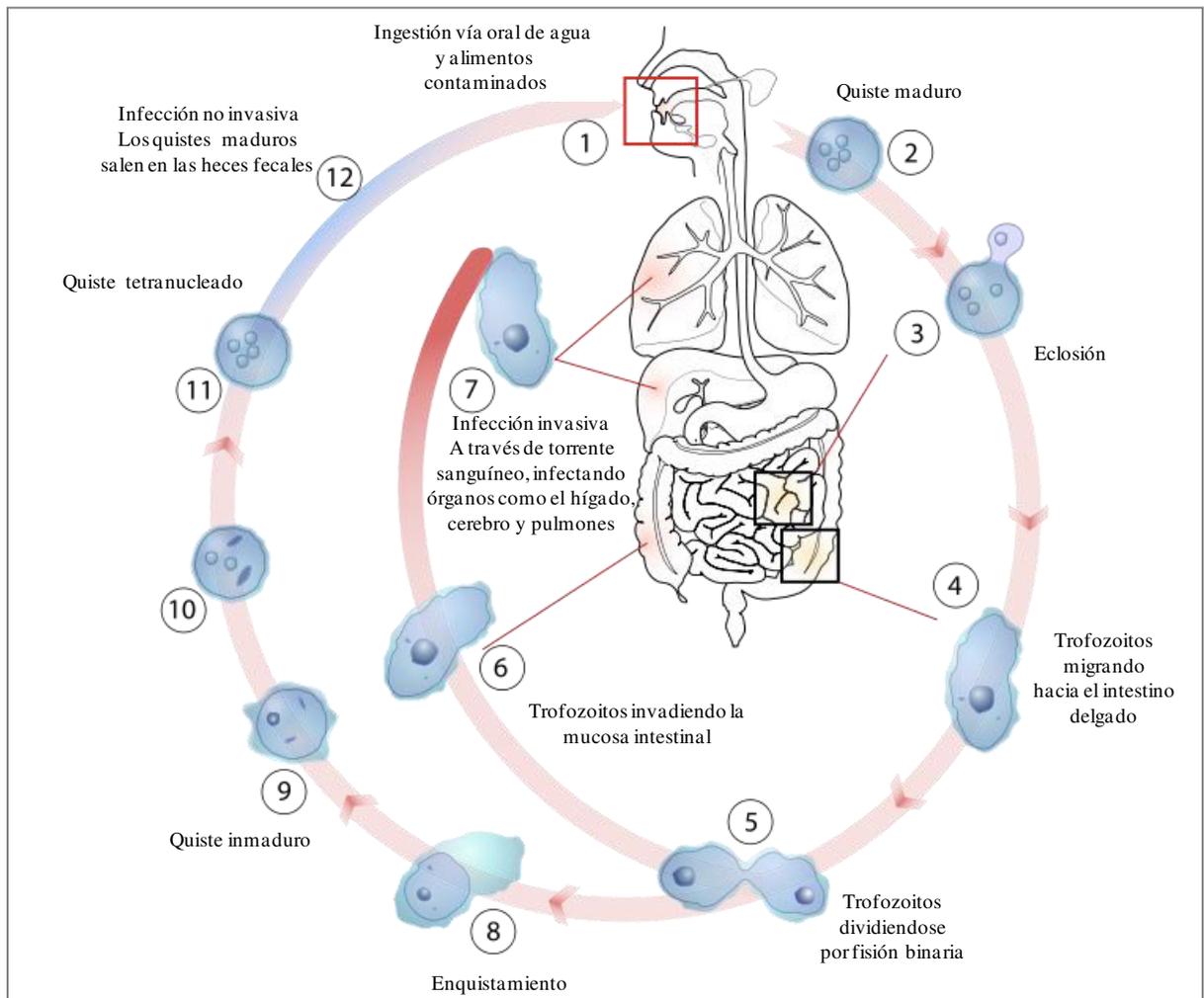


Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. El diagrama ilustra el ciclo de vida completo de *E. histolytica*, cada número contiene la descripción del proceso el cual se describe con precisión en el texto. (Imagen modificada de Ruiz Villarreal, 2008).

Debido a la protección de su pared celular, los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el medio externo y son los responsables de la transmisión. Los trofozoítos en el medio externo mueren rápidamente. De forma alternativa, en muchos casos permanecen confinados en la luz intestinal de los infectados, quienes son entonces portadores asintomáticos o eliminadores de quistes. En algunos individuos los trofozoítos invaden la mucosa intestinal, o bien invaden el hígado, pulmones, cerebro, llegando a esos órganos a través de la circulación. La amibiasis intestinal afecta, y es con más frecuencia letal en los extremos de la vida, mientras que el absceso hepático causado por *E. histolytica* es más frecuente en varones y tiene una alta mortalidad (Sehgal D., *et al.*, 1996).

7.4 Ciclo de vida *in vitro*

Entamoeba histolytica es un patógeno de gran importancia para nuestro país, desde su descubrimiento, han existido dos periodos desde el punto de vista histórico, el primero de 1890 a 1918, en que sólo se hicieron tentativas de cultivo, y el segundo de 1918 a la fecha, es en este periodo en que ya se tienen bien establecidos los sistemas de cultivo, pero no así para reproducir el ciclo de vida completo bajo condiciones axénicas *in vitro*, debido principalmente a la falta de un medio o método que induzca el enquistamiento de *E. histolytica*. A lo largo de la historia han existido tres sistemas de cultivo para *E. histolytica*: el cultivo xénico, en el cual el parásito es cultivado en presencia de flora indefinida; el sistema de cultivo monoxénico, en el cual el parásito es

cultivado en presencia de una sola especie en particular y el sistema de cultivo axénico, en el cual el parásito es cultivado en ausencia de cualquier tipo de célula.

Es importante señalar que para el experimento de caracterización es muy importante cultivar a *E. histolytica* en condiciones axénicas para evitar contaminación por parte de otro microorganismo. A partir de que se describieron los medios de cultivo en condiciones axénicas para trofozoítos de *E. histolytica* se ha avanzado en el conocimiento de los trofozoítos, pero no así para los quistes y su proceso de diferenciación. A pesar de que se sabe que el quiste es la forma infectiva de este parásito, la diferenciación de los trofozoítos de *E. histolytica* a quistes, así como el desenquistamiento, son aspectos de la biología del parásito que han sido muy poco estudiados debido a la falta de un medio o método que permita la inducción del esquistamiento de este parásito bajo condiciones axénicas *in vitro*. Recientemente se ha reportado por primera vez una metodología que permite inducir el enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas, con lo cual se hace posible reproducir el ciclo de vida completo de este parásito *in vitro* (Barrón-González *et al.*, 2008).

7.5 Genoma de *Entamoeba histolytica*

La información del genoma nos permite una mejor comprensión de los procesos patogénicos y consecuentemente nos ayuda a mejorar la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. En *E. histolytica* la organización del genoma y de los elementos promotores, también es muy peculiar, ya que el tamaño del genoma es relativamente pequeño para un organismo eucariota (3.2×10^7 pb) y un peso de 0.5 pg por núcleo, con un alto contenido de adenina/timina (A/T), y escasa presencia de

intrones. Todo el DNA se encuentra dentro del núcleo, pero presenta varias copias de RNAr como elementos circulares extracromosomales. Las regiones ricas en RNA se encuentran distribuidas hacia la periferia del núcleo (Byers, 1986).

Desde hace tiempo se estudia el genoma de *E. histolytica* y se ha determinado que sus cromosomas no se condensan y su tamaño varía de 0.3 a 2.2 Mb; también se han reportado diferencias en el tamaño de los cromosomas homólogos de diferentes aislados (Willhoeft y Tannich, 1999). De igual forma se determinó que el parásito tiene un genoma haploide (Clark y Diamond, 1991) sin embargo, continúan las investigaciones relacionadas con el número exacto de sus cromosomas. Loftus y colaboradores en el 2005, concluyó la secuenciación del genoma de *E. histolytica*. El proyecto del genoma de la ameba indica que contiene 9,938 genes en 1.17 kilobases de tamaño promedio, que comprende el 49% del genoma (Davis *et al.*, 2007; Tolstrup *et al.*, 2007).

7.6 Regulación génica de *Entamoeba histolytica*

La maquinaria transcripcional en *E. histolytica* ha sido bien estudiada incluyendo la identificación de la caja TATA y el elemento iniciador (Singh y Rogers, 1998 y Singh *et al.*, 2002), también se han encontrado factores de transcripción como la proteína de unión al elemento regulador río arriba 3 (URE3-BP), una proteína mano EF sensible a calcio y las proteínas potenciadoras de unión 1 y 2 de *Entamoeba histolytica* (EhEBP1 y EhEBP2) (Schaeffer *et al.*, 2001; Gilchrist *et al.*, 2001; Gilchrist *et al.*, 2003). Se ha reportado que dos genes activos en *E. histolytica* codifican proteínas miembro de la familia de TBP (Castanon-Sanchez *et al.*, 2009). Así mismo,

han sido clonados y caracterizados genes que codifican proteínas que tienen gran importancia en este microorganismo, tales como la ATPasa vacuolar (Melendez-Hernández *et al.*, 2008), y también han sido estudiadas proteínas relacionadas con la virulencia de este parásito (Quintas-Granados *et al.*, 2009). Y recientemente se encontraron estructuras parecidas a los cuerpos P (P-body) que contenían proteínas degradadoras de RNAm (López-Rosas *et al.*, 2012). Hon *et al.*, 2013 analizaron el uso de los sitios de splicing alternativo y poliadenilación en *E. histolytica* reportando las regiones 3'UTR en este parásito en la base de datos Amoeba DB.

A la fecha la falta de estudios sobre la presencia de RNAs pequeños, específicamente de microRNAs en *E. histolytica* ha imposibilitado explorar los procesos de regulación mediados por estas moléculas.

7.7 RNAs pequeños

Los RNAs pequeños (small RNAs) regulan el silenciamiento postranscripcional de una gran variedad de organismos en diversos procesos biológicos (Zamore y Haley, 2005). Hay dos proteínas centrales que son necesarias para las vías de silenciamiento génico reguladas por RNAs pequeños, estas son Dicer (RNAsa tipo III que genera RNAs pequeños) y Argonata (se asocia con el RNA pequeño y el gen blanco para producir el silenciamiento génico). Recientemente se han descubierto muchas clases de RNAs pequeños incluyendo RNAs pequeños de interferencia (siRNA), microRNAs (miRNA), siRNA trans-activadores (tasiRNA), RNAs pequeños no codificantes (tncRNA), “small scan RNA (scRNA), RNA asociado a piwi (piRNA), siRNAs secundarios (Sijen *et al.*, 2007; Tolia y Joshua-Tor, 2007). Se ha estudiado el genoma de *E. histolytica* y se

predice que varios genes codifican la maquinaria necesaria para la vía de RNAs de interferencia, por ello se piensa que este microorganismo puede llegar a regular los genes por este mecanismo (Loftus *et al.*, 2005). La gran mayoría de la literatura publicada hasta el momento acerca de estas moléculas es para organismos multicelulares. Recientemente Zhang y colaboradores identificaron en *E. histolytica* una población abundante de RNAs pequeños, los cuales tienen una estructura poco usual, lo cual indica que son generados mediante un mecanismo atípico. Una gran proporción de estos RNAs pequeños tiene secuencias antisentido a sus genes blanco y es posible que los regulen. Este hallazgo establece un nuevo paradigma de cómo la expresión génica es regulada en *E. histolytica*. Además, la identificación de RNAs pequeños con estas características estructurales dan una idea de la diversidad y complejidad que tienen estos RNAs y las funciones que desempeñan en los organismos eucariotes unicelulares (Zhang *et al.*, 2008).

7.8 MicroRNAs

Los miRNAs representan una clase de RNAs pequeños no codificantes que modulan la expresión génica en plantas y animales, funcionando como reguladores postranscripcionales negativos. Estos constituyen una clase abundante de pequeños moléculas de RNAs endógenos de 20 a 25 nucleótidos de longitud. Los precursores de miRNAs (pre-miRNAs) tiene una estructura secundaria (Abbott *et al.*, 2005; Ambros, 2001; Bartel, 2004; Carrington y Ambros, 2003), con un índice mínimo de energía libre de plegamiento (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006f). Algunos miRNAs

presentan una alta conservación entre especies desde animales (Pasquinelli *et al.*, 2000) hasta plantas (Floyd y Bowman, 2004 y Zhang *et al.*, 2006b).

Los miRNAs regulan la expresión por dos mecanismos, ya sea por rompimiento directo de la secuencia blanco (RNAm) o por inhibición de la traducción de este RNAm por medio de un apareamiento a la región 3' UTR (Lai, 2002).

7.9 Biogénesis de los microRNAs

Los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II para producir un miRNA-primario denominado pri-miRNA (Zeng *et al.*, 2005). Los pri-miRNAs tiene usualmente secuencias de nucleótidos largas y algunos de ellos tiene cientos o miles de nucleótidos, los pri-miRNAs tienen un CAP en el extremo 5' y una cola de poli A en el extremo 3' de manera similar a los RNAm codificantes para proteínas (Cai *et al.*, 2004). Posteriormente, estos forman una estructura secundaria específica y entran al complejo microprocesador, el cual está formado por la proteínas Drosha (una endonucleasa RNAsa III) y el cofactor DGCR8/Pasha, una proteína que contiene dominios de unión a RNA de doble cadena (Denli *et al.*, 2004). Este pri-miRNA es procesado y convertido en un pre-miRNA de 60 a 70 nucleótidos con un fosfato en el extremo 5' y un extremo de 2 nucleótidos en el extremo 3'. El pre-miRNA es transportado hacia el citoplasma por la exportina-5 (Exp5) (Bohnsack *et al.*, 2004). Una vez que llega el citoplasma el *pre-miRNA* es procesado en una cadena doble pequeña (duplex miRNA:miRNA*) por la enzima Dicer1 y una endonucleasa RNAsa III (Gregory *et al.*, 2005). Finalmente, el duplex miRNA:miRNA* es convertido en un miRNA maduro y un miRNA* por una helicasa. Los *miRNAs* maduros son asimétricamente incorporados en el Complejo de

Silenciamiento Inducido por RNA (RISC) para posteriormente regular la expresión génica ya sea por degradación del RNAm, por represión de la traducción o deadenilación (Gregory *et al.*, 2005, Winter *et al.*, 2009). Figura 2

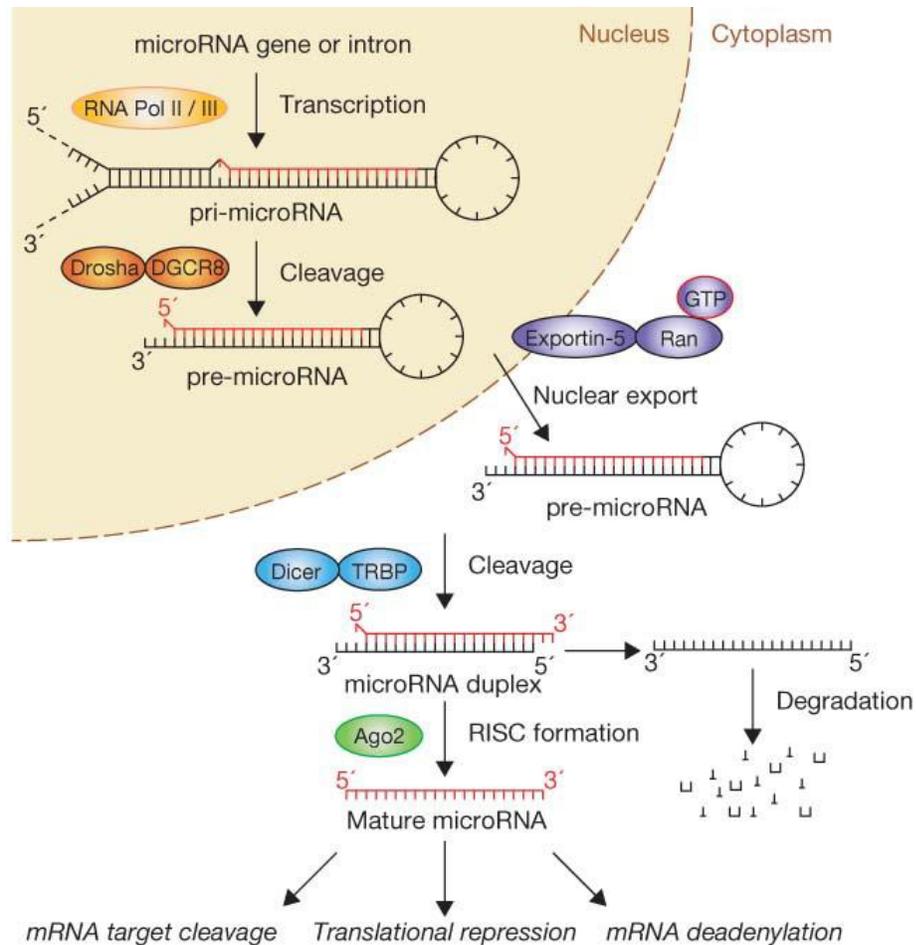


Figura 2. Biogénesis de los microRNAs. El diagrama ilustra las etapas de la formación de los microRNAs. (Imagen tomada de Julia Winter *et al.*, 2009)

7.10 Identificación de microRNAs

La identificación y validación de nuevos miRNAs es uno de los problemas más desafiantes para poder conocer más profundamente la regulación mediada por estas moléculas. Actualmente, se pueden utilizar varios métodos para caracterizar el perfil de expresión de miRNAs en tejidos específicos, tales como: la hibridación *in situ*, northern blot, ensayos de proyección con RNAsa, RT-PCR y análisis de expresión microarreglos. Todos estos métodos dependen de un conocimiento previo de las secuencias de los miRNAs. El conocimiento del perfil exacto de expresión de un miRNA es una herramienta importante para la investigación en estados fisiológicos y patológicos, por ello el descubrimiento de nuevos miRNAs es muy importante. Se han desarrollado herramientas bioinformáticas para tamizar secuencias genómicas e identificar miRNAs (Kim y Nam, 2006). Los algoritmos bioinformáticos trabajan tamizando el genoma de la especie a estudiar en la búsqueda de secuencias cortas de nucleótidos conservadas filogenéticamente y que sean capaces de formar estructuras secundarias características de precursores de miRNAs. Sin embargo, estos algoritmos no son capaces de descubrir todos los miRNAs, en especial aquellos que no están filogenéticamente conservados, además estas predicciones realizadas *in silico* requieren de verificación experimental. En contraste los experimentos de clonación de miRNAs permiten el descubrimiento de nuevos miRNAs sin necesidad de recurrir a algoritmos que traten de predecir la presencia de miRNAs (Landgraf *et al.*, 2007) este tipo de ensayos tienen la limitante de solo identificar los miRNAs presentes en un momento específico del órgano u organismo en estudio y deben ser validados experimentalmente en sus genes blanco.

7.11 Presencia de microRNAs en diferentes organismos

Muchos miRNAs se expresan en una amplia variedad de organismos desde plantas, gusanos, insectos y humanos. Se ha visto que están bien conservados entre especies y muchos componentes de la maquinaria de los miRNA se han encontrado incluso en Archaea y Eubacterias, lo que revela que su origen es muy antiguo. Desde su descubrimiento, los miRNAs han tratado de ser localizados en diversos organismos y no solo han sido reportados en organismos eucariotes, también han sido reportados en procariotes, tales como *Escherichia coli* y otras bacterias (Gottesman, 2005), en virus, principalmente en la familia de los herpesvirus, así como, en citomegalovirus (Dolken *et al.*, 2009). Incluso se ha reportado que los miRNAs juegan un papel importante en la interacción virus-hospedero, y se piensa que tanto los miRNAs codificados por humanos como por virus podrían ser utilizados en el futuro como blancos terapéuticos (Kurzynska-Kokorniak *et al.*, 2009, Campbell *et al.*, 2013). Algunos investigadores han buscado miRNAs en parásitos de importancia humana y a continuación se describen algunos.

7.11.1 microRNAs en *Schistosoma japonicum*

Schistosoma japonicum, produce una enfermedad conocida como esquistosomiasis, la cual es relativamente común en los países en vías de desarrollo especialmente en África y aunque su tasa de mortalidad es baja, la esquistosomiasis es altamente incapacitante debido a las fiebres que se manifiestan. Hasta el momento han sido clonados y caracterizados 5 nuevos miRNAs en este organismo (Xue *et al.*, 2008).

7.11.2 microRNAs en *Trichomonas vaginalis*

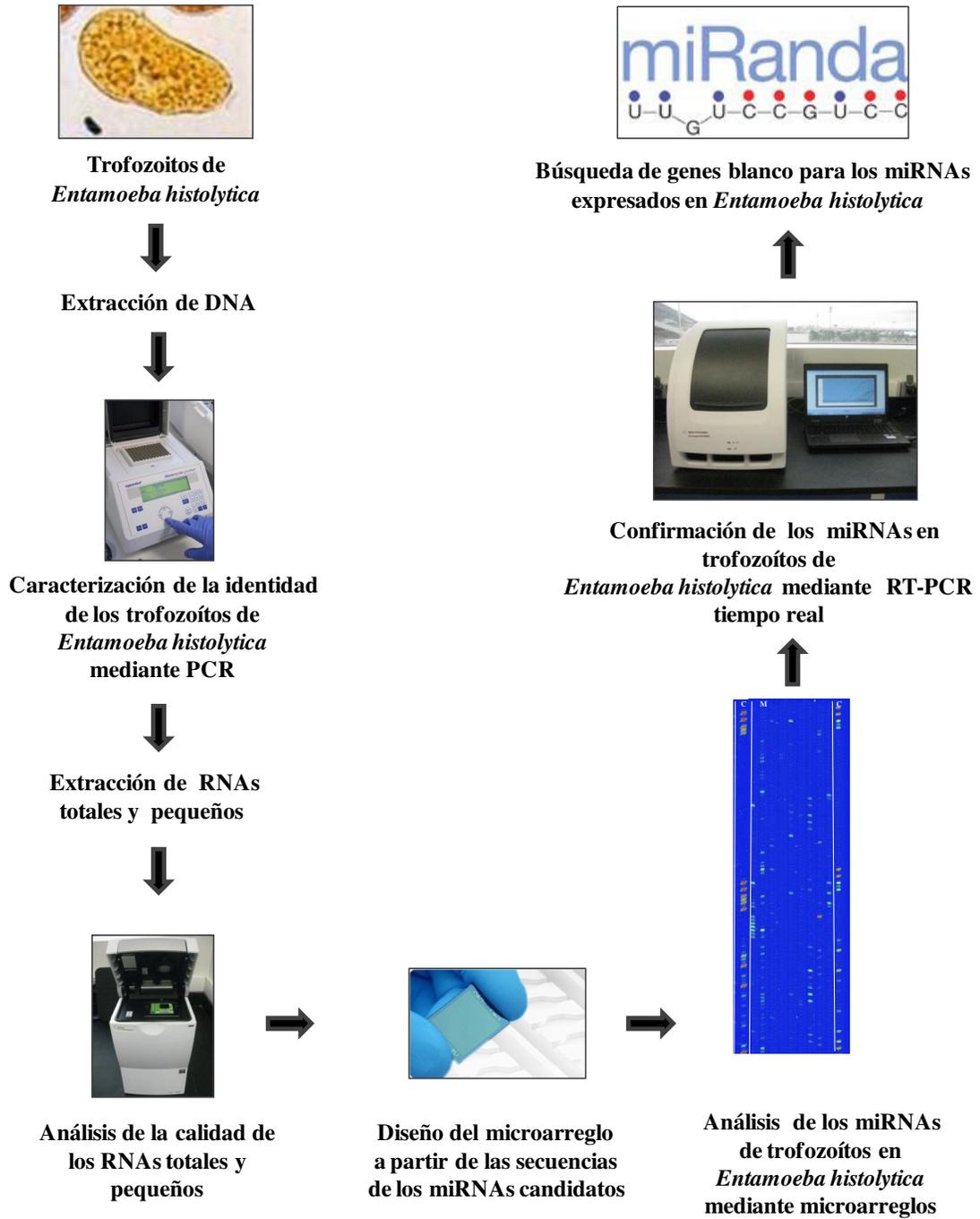
Trichomonas vaginalis es un patógeno flagelado que parasita el trato urogenital tanto de hombres como de mujeres, pero únicamente en humanos y produce una patología denominada tricomoniasis urogenital. En este microorganismo se han identificado 9 miRNAs candidatos y mediante análisis bioinformático se reveló que contenían la clásica estructura tallo-asa-tallo (Lin *et al.*, 2009).

7.11.3 microRNAs en *Entamoeba histolytica*

De y colaboradores en 2006 realizaron un análisis *in silico* para la búsqueda de miRNAs en *E. histolytica*, reportando el hallazgo de 17 probables miRNAs, sin embargo hasta ese momento no se había realizado ningún experimento de clonación que valide este hallazgo (De *et al.*, 2006). Recientemente, en nuestro laboratorio a partir de un cultivo de trofozoitos de *E. histolytica* en condiciones axénicas se aisló el RNA total y se purificó una fracción de 15 a 50 nucleótidos los cuales se utilizaron para construir una biblioteca de RNAs pequeños que posteriormente fueron secuenciados y en donde se descubrieron 199 miRNAs potenciales para este parásito (Tamez-Guerrero, 2013).

Debido a lo anterior, en esta tesis analizamos la expresión de estos miRNAs identificados en *E. histolytica* mediante microarreglos y verificamos su presencia mediante la técnica de RT-PCR tiempo real. Esta propuesta pretende aportar nuevo conocimiento sobre los miRNAs en este parásito su regulación génica, así como para descubrir nuevos mecanismos moleculares que pueden ser útiles para combatir a este parásito de impacto en la salud mundial.

8. ESTRATEGIA GENERAL



9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Cultivo de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS

Los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS en fase logarítmica fueron cultivados y proporcionados por la Dra. Ma. Porfiria Barrón. Los trofozoitos procedían de un cultivo a una concentración de (2×10^4) células/ml los cuales fueron cultivados en tubos de 18x150 mm de borosilicato con tapa de rosca que contenían 20 mL de medio TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1978), 4.0 mL de suero bovino (suero bovino esterilizado por radiación gamma de 2 mrad), y 0.2 mL de los antibióticos (400 IU de penicilina y 4 mg de estreptomicina), los cuales fueron incubados a 37°C por cuatro días. Posteriormente, los tubos fueron enfriados a 4°C por 20 minutos, centrifugados a 978g por 10 min a temperatura ambiente, y finalmente se eliminó el medio de cultivo TYI-S-33 y la pastilla de trofozoítos se lavó 3 veces con PBS pH 7.4 para su uso inmediato o almacenaje a -80°C.

9.2 Extracción de DNA genómico de *Entamoeba histolytica*

La extracción del DNA genómico de *E. histolytica* se aisló mediante el estuche comercial de extracción de DNA (Agilent technology, La Jolla, CA). Esto consistió en cosechar 1×10^8 células, las cuales fueron centrifugadas a 1500 rpm a 4°C por 15 minutos, al termino se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular en PBS (se repite en paso de la centrifugación nuevamente), se descartó el PBS y se añadió 11 mL de la solución 2, se mezcló la solución mediante un homogenizador mecánico a velocidad mediana y se añadió la enzima pronasa (0.44µL/mL de muestra), incubando la muestra a 60°C con movimiento constante (180 rpm) por una hora. Al termino se

incubó en hielo por 10 minutos y posteriormente se añadieron 4 mL de la solución 3 y se mezcló 10 veces por inversión (se observó un precipitado pero esto es normal). Se incubó nuevamente en hielo por 5 minutos y se centrifugó por 15 minutos a 3,400 rpm a 4°C. Se transfirió con cuidado el sobrenadante usando una micropipeta a un tubo cónico de 50 mL (se evitó transferir cualquier partícula durante el proceso). Se añadió RNAsa (2µL/ mL de muestra) y se incubó a 37°C por 15 minutos. El DNA se precipitó agregando 2 volúmenes de etanol absoluto al sobrenadante, se mezcló por inversión suavemente, se incubó por 2 horas a -20°C y centrifugó a 1500 rpm por 20 minutos a 25°C, la pastilla obtenida se lavó con 400 µL de etanol al 70% y se resuspendió y transfirió a un tubo de centrifuga de 1.5 mL, se centrifugó por 5 minutos a temperatura ambiente a 14,000 rpm, al termino se eliminó el sobrenadante y se dejó secando a temperatura ambiente, la pastilla obtenida se resuspendió en 30 µL agua estéril libre de nucleasas. La concentración del DNA de las muestras se cuantificó en el NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

9.3 Caracterización molecular de trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS

Para la caracterización molecular del DNA de *E. histolytica* se usó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) reportada por Paglia y Visca en el 2004. La descripción de los oligonucleótidos usados se encuentra en la Tabla I.

Tabla I
Oligonucleótidos para la identificación de *E. histolytica*

Nombre	Secuencia del oligonucleótido	Longitud (nt)	T _m (°C)
Eh-L	5'-ACA TTT TGA AGA CTT TAT GTA AGT A-3'	25	47
Eh-R	5'-CAG ATC TAG AAA CAA TGC TTC TCT-3'	24	52

La mezcla de reacción para la PCR se realizó de acuerdo a las cantidades establecidas por el estuche comercial Taq PCR de la compañía New England Biolabs, en la Tabla II se describe las cantidades para una reacción de PCR, la reacción se ajustó a un volumen final de 50 μ L.

Tabla II
Amplificación mediante PCR de *Entamoeba histolytica*

Reactivo	Cantidad (μ L)
Buffer estandar para la Taq (10X)	5 μ L
Mezcla de nucleótidos fosfatados (10 mM)	1 μ L
Oligonucleótido Eh-L (3.125 μ M)	1 μ L
Oligonucleótido Eh-R (3.125 μ M)	1 μ L
Taq DNA polimerasa (5000 U/mL)	0.25 μ L
DNA de <i>E. histolytica</i> (68.9 ng/ μ L)	1.5 μ L
Agua libre de nucleasas	40.5 μ L
Total	50 μ L

Una vez que se obtuvo la mezcla de reacción se utilizó el programa que se muestra en la Tabla III, cabe mencionar que las condiciones en esta Tabla fueron las óptimas para la obtención de nuestro fragmento de interés y no se utilizaron las condiciones mencionadas por el autor del cual se tomó el diseño de los oligonucleótidos.

Tabla III
Programa para la PCR

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	3 minutos	1X
94	50 segundos	40X
53	1.5 minutos	
72	2 minutos	
72	7 minutos	1X

La identidad del fragmento amplificado se caracterizó mediante cortes con la enzima de restricción *Xba* I, la mezcla de reacción para una muestra se encuentra en la Tabla IV, el volumen final fue de 10 μ L.

Tabla IV
Mezcla de reacción para la digestión del DNA con *Xba* I

Reactivo	Cantidad (μ L)
Agua	3.7
Buffer # 4 (10X)	1
Enzima <i>Xba</i> I (15u/ μ L)	0.3
Producto amplificado (40 ng/ μ L)	5
Total	10

9.4 Extracción de RNAs totales y pequeños de *Entamoeba histolytica*

La extracción de los RNAs totales y pequeños se aislaron siguiendo el protocolo del estuche comercial miRNAeasy (Qiagen, Valencia, CA). La pastilla celular de 25 mg se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 700 μ L de

Qiazol el reactivo para la lisis y se dio vórtex por un 1 minuto, se añadió 140 μL de cloroformo grado molecular libre de RNasas y nuevamente se dió vórtex por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo colector y se añadieron 1.5 volúmenes de etanol absoluto grado molecular, se mezcló suavemente por inversión. Se transfirió el sobrenadante a una columna de purificación y se colocó un tubo colector y se centrifugó por 15 segundos a 10000 rpm a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Se adicionó 700 μL del buffer RWT a la columna y se centrifugó 10 segundos a 10000 rpm y se descartó el sobrenadante nuevamente. Se añadió 500 μL del buffer RPE a la columna se centrifugó 15 segundos a 10000 rpm para lavar la columna y se descartó el sobrenadante, se añadieron otros 500 μL del buffer RPE y se repitió el paso anterior, se transfirió la columna a un tubo colector de 1.5 mL y se añadió 30 μL de agua libre de RNasas a la columna y se centrifugó por 1 minutos a 12000 rpm, se colectó el eluente en un tubo de centrifuga de 1.5 mL y la concentración del RNA de todas las muestras se cuantificó usando el NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

9.4.1 Análisis de la calidad de los RNAs

Para analizar la calidad de los RNAs aislados utilizando el Agilent 2100 bioanalyzer se procedió a utilizar el protocolo Agilent RNA 6000 pico el cual consistió en varias etapas. Etapa 1. Preparación del gel: se pipetió 550 μL del gel matrix RNA 6000 pico y se colocó en un tubo colector, se centrifugó a 1500g por 10 minutos a temperatura ambiente y se alicuotaron 65 μL del gel filtrado dentro de un tubo de

microcentrifuga libre de RNAsas. Etapa 2. Preparación de la mezcla del gel con el colorante: se dejó por 30 minutos a temperatura ambiente el colorante concentrado RNA 6000 pico, al término de la incubación se le dio vortex por 10 segundos y se centrifugó rápidamente y se agregó 1 μL del colorante a los 65 μL del gel filtrado. Se mezcló la solución mediante vórtex y se centrifugó a 13000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla funciona solamente para un día. Etapa 3. Cargado del gel preparado con colorante: Se colocó el RNA 6000 Pico chip en su estación de cargado, se pipeteó 9 μL del gel preparado y se depositó en el pocillo marcado con la letra G. Se aseguró de que el émbolo estuviera posicionado en 1 mL y se cerró el chip donde se cargó el gel. Se presionó el émbolo hasta que ese se sujetó por el clip, se esperó exactamente 30 segundos y se liberó el clip. Se esperó 5 segundos y suavemente se regresó el émbolo a la posición de 1 mL. Se abrió el chip y se pipeteó 9 μL del gel preparado en el pocillo marcados con la letra G, y se descartó el residuo del gel. Etapa 4. Cargado de la solución acondicionadora RNA 6000 pico y el marcador: Se pipeteó 9 μL de la solución acondicionadora RNA 6000 pico en el pocillo marcado como CS, posteriormente se pipeteó 5 μL del marcador ladder RNA 6000 pico en los 11 pozos de las muestras y en el pocillo marcado con la figura de una escalera (ladder). Etapa 5. Cargado de las muestras y de la escalera diluída: se pipeteó 1 μL del marcador escalera (ladder) desnaturalizado y alicuotado en el pocillo con la imagen de la escalera. Se pipeteó 1 μL de la muestra en cada uno de los 11 pocillos, se pipeteó 1 μL del marcador RNA 6000 pico en cada uno de los pocillos para las muestras sin usar, se coloca el chip en el adaptador para el IKA vórtex y se procesa por 1 minuto en este equipo a una velocidad de 2400 rpm, el chip ya listo se toma y se coloca en el Agilent 2100

bioanalyzer por 5 minutos. Y el programa nos indicó el resultado de la calidad de la muestra.

9.5 Diseño de microarreglo para el análisis de la expresión de los miRNAs de *E. histolytica*

Para el microarreglo se diseñaron 166 sondas de las secuencias de miRNA obtenidas del trabajo de secuenciación de miRNAs de trofozoítos de *E. histolytica* realizado por Tamez-Guerrero, 2013. Estas sondas fueron hibridadas mediante la tecnología de μ Paraflo Microfluidic Biochip (Zhu Q *et al.*, 2007) y se utilizó la misma preparación de RNAs de *E. histolytica* usada en la secuenciación. El ensayo del análisis de expresión mediante microarreglo se realizó por la compañía LC Sciences. (Houston, Texas). El ensayo requirió de 4 a 8 μ g de RNAs totales al cual se le añadió la cola de poli (A) mediante la enzima Poli (A) polimerasa. Posteriormente, un oligonucleótido marcado fue ligado a la región de poli (A) para después ser teñido con un colorante fluorescente. La hibridación se realizó toda la noche en un microarreglo de μ Paraflo usando una bomba de micro-circulación (Atactic Technologies; Gao X *et al.*, 2004).

En el microarreglo, cada sonda contenía un nucleótido modificado químicamente que codifica al segmento complementario del microRNA blanco (de la miRBase, <http://mirbase.org>) u otro RNA (control o definido por el cliente) un segmento espaciador de polietilen glicol para extender el segmento codificante lejos del sustrato. La detección de las sondas se realizó *in situ* usando un agente fotoregenerador químico o PGR (photogenerated reagent). Las temperaturas de desnaturalización para la hibridación fueron equilibradas por modificaciones químicas en las sondas. Para la hibridación se usaron 100 mL 6xSSPE buffer (0.90 M NaCl, 60 mM Na₂HPO₄, 6 mM EDTA, pH 6.8) conteniendo 25% formamida a 34 °C. Después el RNA hibridizado fue marcado con el colorante Cy3 que circuló a través del microarreglo para su tinción. Las imágenes fluorescentes fueron tomadas usando un scanner láser (GenePix 4000B, Molecular Device) y digitalizadas usando un software (Media Cybernetics). Los datos fueron analizados primero restando el fondo y después normalizando la señal mediante un filtro LOWESS (Locally-weighted Regression, Bolstad *et al.*, 2003).

9.6 Verificación de los miRNAs de *Entamoeba histolytica* mediante RT-PCR tiempo real

Se preparó la muestra de RNA mediante el ensayo de poliadenilación donde se mezclaron 7.19 µL (500 ng) RNA con 7.81 µL de agua libre de RNAsa, 4 µL de buffer de poly A (5x) y 1 µL de rATP (10 mM) con un volumen final de 20 µL, una vez terminada la incubación se añadió 1 µL de polimerasa de *E. coli* a la reacción y se mezcló suavemente, esta se incubó a 37°C por 30 minutos y después otros 5 minutos pero a 95°C, al termino se transfirió inmediatamente al hielo. Para la síntesis del DNAc

se usó 11.2 de agua libre de RNAsa con 2 μ L del buffer de la enzima script (10X), 4 μ L de la reacción de poliadenilación, 0.8 μ L de dNTPs (100mM), 1 μ L de la oligo adaptador para la RT (10 μ M), 1 μ L de la enzima Affinity Script RT/ Rnase block enzyme mix para un volumen final de 20 μ L, se mezcló suavemente y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 segundos, y se incubó a 55°C por 5 minutos, 25°C por 15 minutos, 42°C y finalmente 95°C por 30 minutos. Se añadieron 280 μ L de agua libre de RNAsa a cada reacción y se dejó en hielo. La reacción de PCR cuantitativo se llevó a cabo mediante el estuche comercial High-Specificity miRNA QPCR Core reagent kit de Agilent. El diseño de las secuencias de los oligonucleótidos específicos a los microRNAs fue en base a los datos obtenidos de las secuencias de los posibles candidatos de miRNAs encontrados mediante la secuenciación de *Entamoeba histolytica*.

Para la reacción de RT-PCR tiempo real se añadió cuidadosamente en un tubo de microcentrífuga óptico 14 μ L de agua libre de nucleasas grado PCR, 2.5 μ L del buffer core PCR 10x, 2.75 μ L de MgCl₂ 50 mM, 1 μ L de dNTPs 20 mM, 1.25 μ L del colorante Eva green 20x, 1 μ L de oligonucleótido universal 3.125 μ M, 1 μ L de oligonucleótido específico para cada miRNA 3.125 μ M, 0.5 μ L de la enzima para PCR High-specificity y 1 μ L del cDNA para obtener un volumen final de 25 μ L. Se mezcló todo suavemente teniendo la precaución de no generar burbujas y se utilizó un equipo Stratagene Mx3005P real-time PCR system, utilizando el programa de la Tabla V. Cada muestra se realizó por duplicado para el análisis. Adicionalmente, se corrió una curva de disociación durante el PCR con el fin de asegurar la especificidad de la detección de los productos amplificados.

Tabla V
Programa para la amplificación de los miRNAs
mediante PCR tiempo real

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	10 minutos	1X
95	10 segundos	
60	15 segundos	
72	20 segundos	40X

9.7 Predicción de los genes blanco probables de miRNAs en *E. histolytica*

Para la predicción de los genes blanco probables de miRNAs de *E. histolytica* se utilizó la herramienta bioinformática miRanda, (Enright *et al.*, 2003 y John *et al.*, 2004) que consiste de un algoritmo computacional de código abierto. Para el genoma de *E. histolytica* se identificaron 8201 genes codificantes y el 90% de ellos no tiene descritos el 3' UTR. Además, las regiones 3' UTR encontradas tienen una longitud variable, por lo tanto para este trabajo se usaron 340 genes con sus regiones 3'UTR. Para estimar la longitud máxima se calculó la media de la longitud de las regiones 3'UTR y se sumaron dos desviaciones estándar (media observada=140 y desviación estándar =180). Por lo que se extrajeron de la base de datos secuencias de 500 nucleótidos del 3' UTR más 30 nucleótidos de la parte final de la secuencia codificante. Otro parámetro a considerar con este algoritmo es la energía libre mínima (MFE, Minimum Free Energy) la cual nos indica la estabilidad de la estructura secundaria del miRNA, Wei *et al.*, en el 2009 propuso $-14 \text{ kCal mol}^{-1}$, mientras que Huang *et al.*, 2009 sugiere $-25 \text{ kCal mol}^{-1}$, por lo que para realizar este análisis se eligió un valor intermedio de $-18 \text{ kCal mol}^{-1}$.

10. RESULTADOS

10.1 Extracción de DNA genómico y RNAs totales y pequeños de *E. histolytica*

La extracción de DNA genómico de *E. histolytica* se procesó usando el estuche comercial Agilent technology (La Jolla, CA, U.S.A), y la extracción de los RNAs totales mediante miRNAeasy de acuerdo a lo descrito en la sección de materiales y métodos (Secciones 9.2 y 9.4). El DNA genómico extraído de los trofozoitos de *E. histolytica* presentaba buena calidad, sin degradación como se observa en la Figura 3A. Por otro lado, en la Figura 3B se muestra el análisis del los RNAs totales en el Bioanalyzer 2100, Agilent techhnology (La Jolla, CA, U.S.A) los cuales presentaron buena calidad, sin degradación por lo que procedimos a continuar con el análisis del microarreglo.

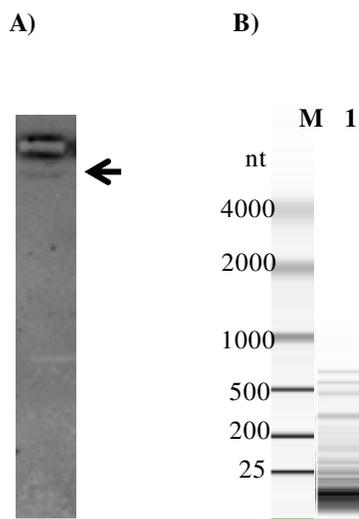


Figura 3 . Extracción de DNA genómico y RNAs totales de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. En A se visualizan 283 ng del DNA genómico de *Entamoeba histolytica* (señalado con la flecha) obtenido mediante el estuche comercial de extracción de DNA genómico de la compañía Agilent, esta electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 0.8%. En B se visualizan los RNAs totales de *Entamoeba histolytica* obtenidos con el estuche comercial de extracción de RNA total miRNeasy que incluyen microRNAs (carril 1) analizados usando el Bioanalyzer 2100 de Agilent. M corresponde al marcador Ladder RNA 6000 pico de la compañía Agilent.

10.2 Caracterización de los ácidos nucleicos de trofozoitos en *E. histolytica*

La identificación molecular de *E. histolytica* se llevó a cabo mediante amplificación usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction). Como resultado se obtuvo la amplificación de un fragmento de 427 pb (Figura 4A), el cual correspondió con lo reportado por Paglia *et al.*, 2004. Para corroborar el resultado se realizó una digestión con la enzima de restricción *Xba* I, con lo que se obtuvo un fragmento de 387 pb lo cual corresponde a lo esperado según el análisis de la secuencia codificante para la región del genoma característico de *E. histolytica* como se observa en la Figura 4B.

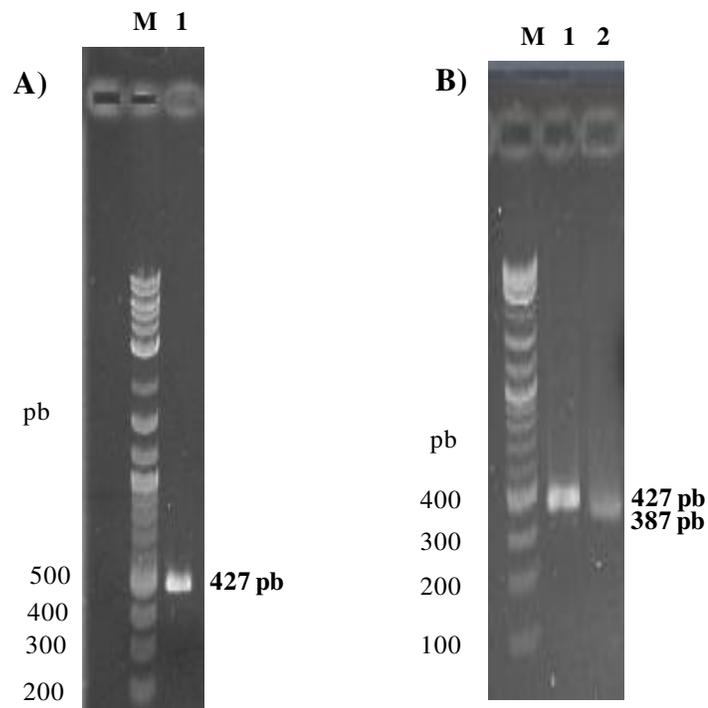


Figura 4 Digestión del DNA genómico amplificado de *Entamoeba histolytica* con *Xba* I. En **A** se muestra el fragmento de 427 pb correspondiente al producto amplificado del DNA genómico *E. histolytica* en un gel de agarosa al 1.2% (carril 1) . M= Marcador de peso molecular 2-Log ladder de NEB. En **B** muestra el fragmento del producto amplificado de 427 pb del DNA genómico *E. histolytica* (carril 1) y el fragmento de 387 pb obtenido de la digestión del producto amplificado de 427 pb con la enzima *Xba* I. Los fragmentos fueron analizados en un gel de agarosa al 1.2%. M= Marcador de peso molecular 2-Log ladder de NEB.

10.3 Análisis de la expresión de los miRNAs de *E. histolytica* mediante microarreglo

Para confirmar la presencia de los nuevos candidatos a miRNAs identificados en los trofozoítos de *E. histolytica*, se hibridizó la misma muestra de RNAs totales y pequeños usada para la secuenciación profunda de los miRNAs (Taméz-Guerrero., 2013) mediante la tecnología de μ Paraflo Microfluidic Biochip, tal como se describió previamente en la sección 9.7 de materiales y métodos.

La Figura 5 corresponde a una imagen representativa del perfil de expresión de los miRNAs candidatos analizados con las 166 sondas diseñadas, se observó la intensidad de la señal desde el color azul, verde, amarillo y rojo lo cual corresponde proporcionalmente a los valores que varían desde 1 hasta 65,535 en la intensidad normalizada de fluorescencia.

La Tabla VI muestra los valores de la intensidad normalizada de fluorescencia obtenidos en la hibridación donde solamente 41 candidatos a miRNAs de los 166 posibles analizados mostraron la señal de hibridación, la variación en la intensidad fue desde 1 hasta 43,780. A cada miRNA se le asignó un nombre provisional, por ejemplo PC-3p-2829_230, donde PC significa candidato potencial a nuevo miRNA, 3p indica que el miRNA maduro proviene del brazo 3' del precursor, si proviene del 5' se anotará como 5p, la siguiente parte es el número de *Sequ Seq* que se le ha asignado durante la secuenciación y la parte final representa el número de copias con las que cuenta.

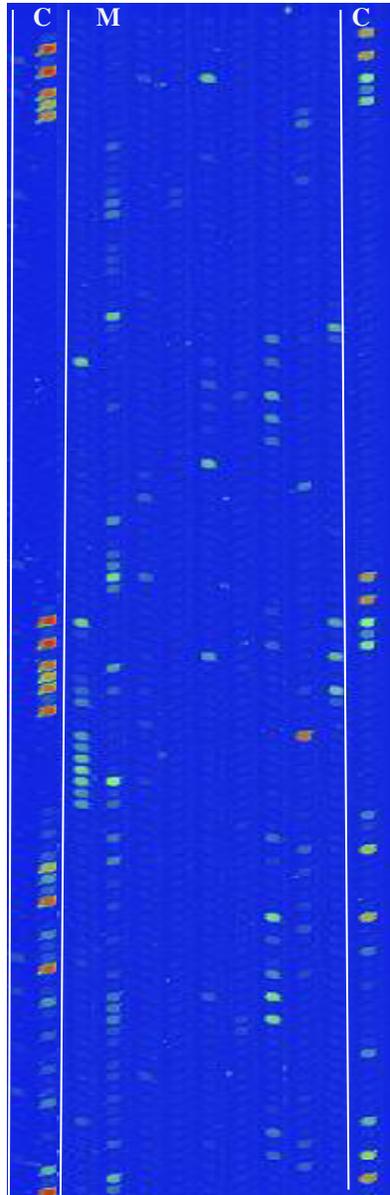


Figura 5. Microarreglo de la expresión de los miRNAs candidatos de los trofozoítos en *Entamoeba histolytica*. Esta imagen corresponde a los perfiles de expresión de los miRNAs candidatos de los trofozoítos de *E. histolytica*. La intensidad de la señal como se observa cambia de color azul a verde, amarillo y rojo proporcionalmente a los valores de expresión de 1 a 65,535. C corresponde al control, M la muestra de los RNAs totales y pequeños de trofozoítos.

Tabla VI
Expresión de posibles candidatos a miRNAs en trofozoítos
de *E. histolytica*

Nombre del posible candidato de miRNA	Expresión en el microarreglo (Intensidad normalizada de fluorescencia)
* PC-3p-149309_2	43,780
*PC-3p-34944_10	11,671
PC-5p-2015_319	9,031
*PC-5p-65104_5	5,761
*PC-5p-16975_24	2,806
PC-3p-191230_2	2,434
*PC-3p-482_1864	2,320
PC-3p-50007_11	2,004
PC-5p-22178_18	1,784
PC-3p-22178_18	1,579
PC-3p-18099_23	1,542
*PC-5p-2829_230	1,140
PC-3p-192094_3	827
PC-3p-154964_2	821
PC-3p-59561_5	682
PC-5p-93041_3	619
PC-3p-75976_4	462
PC-5p-93035_3	366
PC-3p-282975_1	337
PC-5p-25842_15	298
PC-5p-57770_5	297
PC-3p-85867_4	267
PC-5p-27148_14	266
PC-5p-469_1867	260
PC-5p-271448_1	239
PC-5p-103724_4	205
PC-3p-23933_16	171
PC-5p-21545_20	165
PC-3p-143628_2	161
*PC-3p-9740_50	151
PC-3p-222893_1	146
PC-3p-76111_4	141

*PC-5p-26437_14	128
PC-3p-97135_5	121
PC-3p-11757_42	100
PC-5p-43533_8	74
*PC-3p-13867_34	70
PC-5p-50990_6	69
PC-5p-377981_1	58
PC-3p-50990_6	51
*PC-5p-61776_6	1
* Posibles candidatos de miRNAs analizados mediante RT-PCR tiempo real.	

10. 4 Confirmación de la expresión de miRNAs mediante RT-PCR tiempo real

De los 41 candidatos miRNAs detectados se seleccionaron 10 miRNAs en *E. histolytica*. Para ello, se diseñaron 10 oligonucleótidos de acuerdo al número de copias obtenidas en la secuenciación previa reportada por Tamez-Guerrero en 2013, así como los niveles de expresión en el microarreglo. Como se muestra en la Tabla VII, seis miRNAs fueron seleccionados en base al número de copias que fueron de 6 hasta 1864. Así mismo, también se seleccionaron cuatro miRNAs en base a su expresión en el microarreglo. La Tabla VIII muestra los oligonucleótidos usados para validar la presencia de éstos en *E. histolytica* mediante RT-PCR tiempo real. Los cuatro miRNAs seleccionados en el microarreglo correspondieron a valores de expresión de 2,806 a 43,780 en la intensidad normalizada de fluorescencia.

Tabla VII
Lista de oligonucleótidos respecto al número de copias de la secuenciación

Nombre	Secuencia del oligonucleótido	Longitud (nt)	Tm (°C)
PC-3p-482_1864 (Ehi-miR-2)	5'GGTCTAGGATTCTGTCT 3'	17	57
PC-3p-2829_230 (Ehi-miR-6)	5'CATGATCTGAAGGGATGA 3'	18	55
PC-3p-9740_50 (Ehi-miR-8)	5'GAATAAATTGTAATACTCGATT 3'	22	50
PC-3p-13867_34 (Ehi-miR-12)	5' AATAAACGAAGGAACATCTATTT 3'	23	55
PC-5p-26437_14 (Ehi-miR-13)	5' AGTTCAATGAAGCACG 3'	16	54
PC-5p-61776_6 (Ehi-miR-46)	5' ATACCTCCTGAACCAAATA 3'	19	54

* En negrillas se muestra el número de copias para cada miRNA seleccionado

Tabla VIII**Lista de oligonucleótidos respecto a la expresión en el microarreglo**

Nombre	INF	Secuencia del oligonucleótido	Tm	
			(nt)	(°C)
PC-3p-482_149309_2 (Ehi-miR-144)	43,780	5'CTTAGTGGTGATAGATCG 3'	18	53
PC-3p-34944_10 (Ehi-miR-29)	11,671	5'TAATTAAGGATAGTAAGTGG 3'	20	50
PC-5p-65104_5 (Ehi-miR-47)	5,761	5'TCATTTACACCTTATTTATTAGG 3'	23	53
PC-5p-16975_24 (Ehi-miR-24)	2,806	5'CTCGTCTATTATTTCTTCAAATC 3'	24	55

INF, se refiere a la Intensidad Normalizada de Fluorescencia

Previo a la amplificación mediante RT-PCR tiempo real se realizó una curva de disociación y como resultado se obtuvo un pico único de amplificación para cada uno de los oligonucleótidos diseñados corroborando la especificidad en la detección de los miRNAs amplificados (Fig. 6).

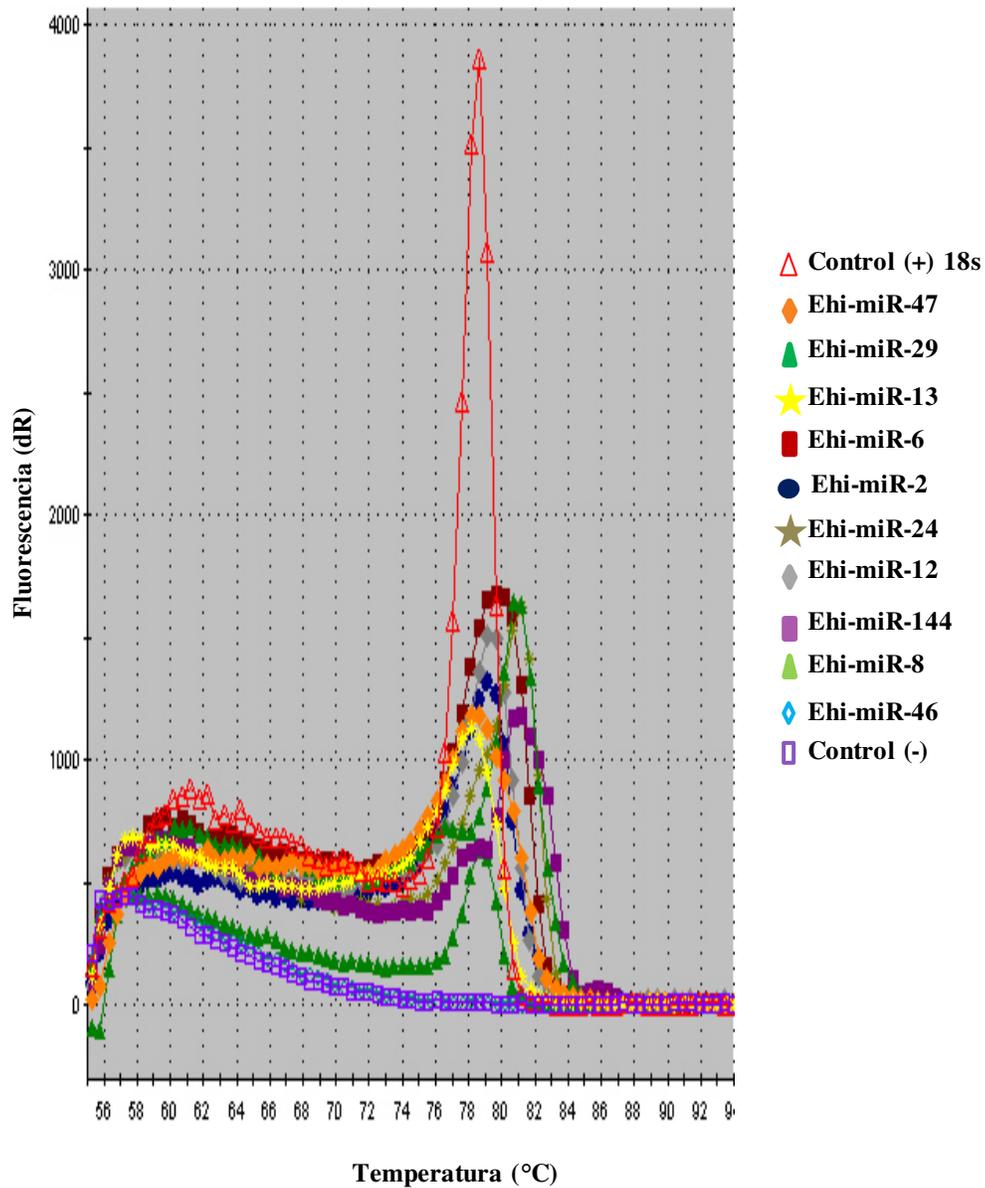


Figura 6. Curva de disociación del PCR tiempo real de los miRNAs candidatos en trofozoítos de *E. histolytica*. Esta gráfica muestra la presencia de picos únicos para cada miRNA analizado, indicando que la amplificación obtenida es específica para cada uno de los genes. En la parte superior derecha se observan los nombres de cada uno de los posibles miRNAs candidatos amplificados.

Posteriormente, se realizó la reacción de RT-PCR tiempo real por duplicado para los candidatos a miRNAs analizados (Tablas VII y VIII) y el RNAr 18s como control positivo (Fig.7). Como resultado se obtuvo la amplificación de 9 de los 10 candidatos a miRNAs confirmando su presencia en los trofozoítos de *E. histolytica*, el miRNA que no amplificó fue el PC-5p-61776_6 (Ehi-miR-46). De los candidatos que amplificaron se seleccionaron los miRNAs Ehi-miR-29, Ehi-miR-47, Ehi-miR-2, Ehi-miR-6 y Ehi-miR-13 que amplificaron antes del ciclo 35, para confirmar el resultado obtenido previamente, esto se observa en la Figura 8. Los resultados obtenidos muestran la presencia de 9 de los 10 miRNAs analizados en los trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. Sin embargo, no se encontró una correlación entre su amplificación con respecto al número de copias de la secuenciación y la intensidad de la fluorescencia del microarreglo previamente obtenidos.

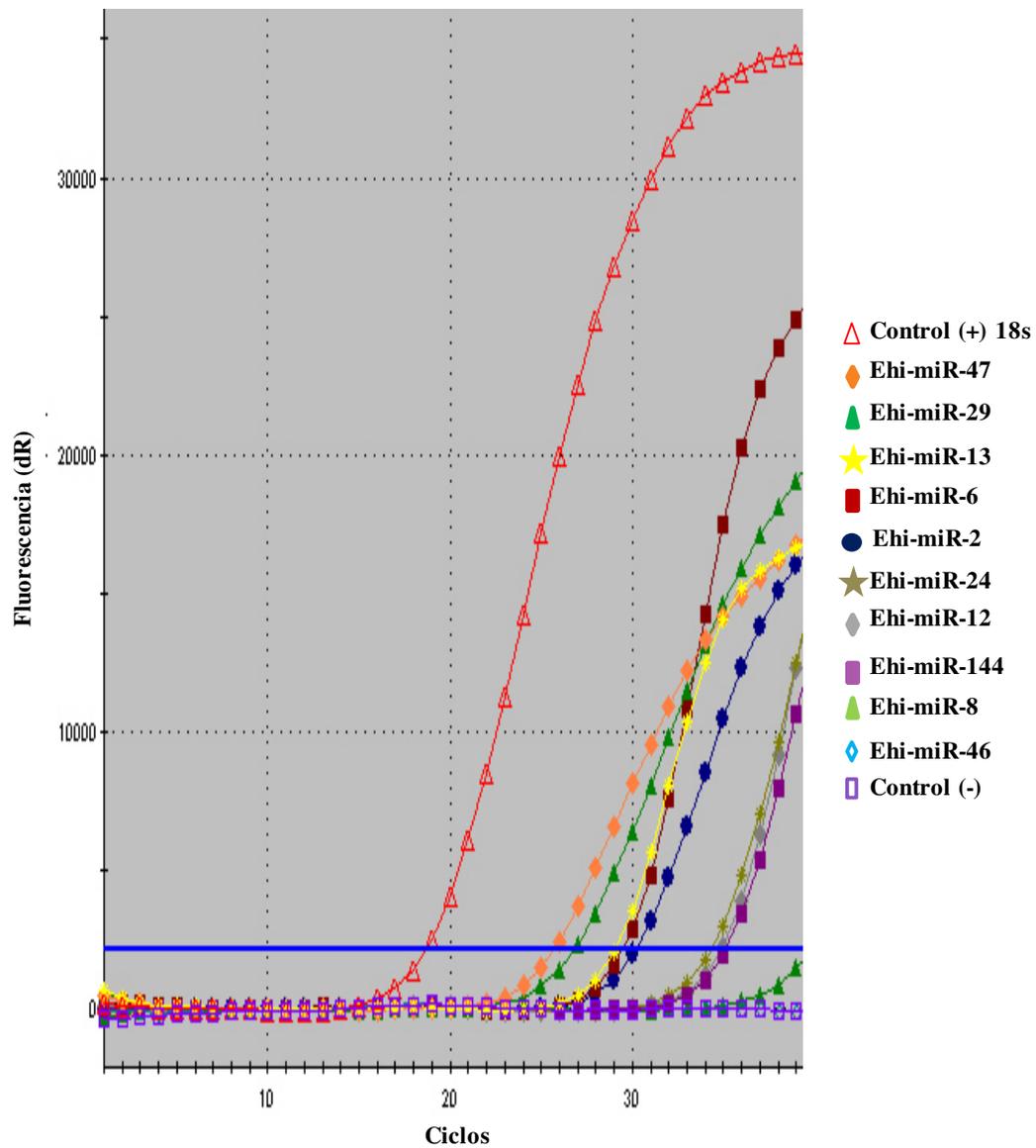


Figura 7 Amplificación mediante PCR tiempo real de los miRNAs candidatos en trofozoítos de *E. histolytica*. Este gráfico muestra la amplificación de los miRNAs candidatos encontrados en trofozoítos de *E. histolytica*. Δ 18s de *E. histolytica* (ciclo 18), \diamond Ehi-miR-47 (ciclo 25), \blacktriangle Ehi-miR-29 (ciclo 26), \star Ehi-miR-13 (ciclo 29), \blacksquare Ehi-miR-6 (ciclo 29), \bullet Ehi-miR-2 (ciclo 30), \star Ehi-miR-24 (ciclo 33), \blacklozenge Ehi-miR-12 (ciclo 34), \blacksquare Ehi-miR-144 (ciclo 34), \blacktriangle Ehi-miR-8 (ciclo 39), \blacklozenge Ehi-miR-46 (sin amplificación), \square Control negativo (sin amplificación).

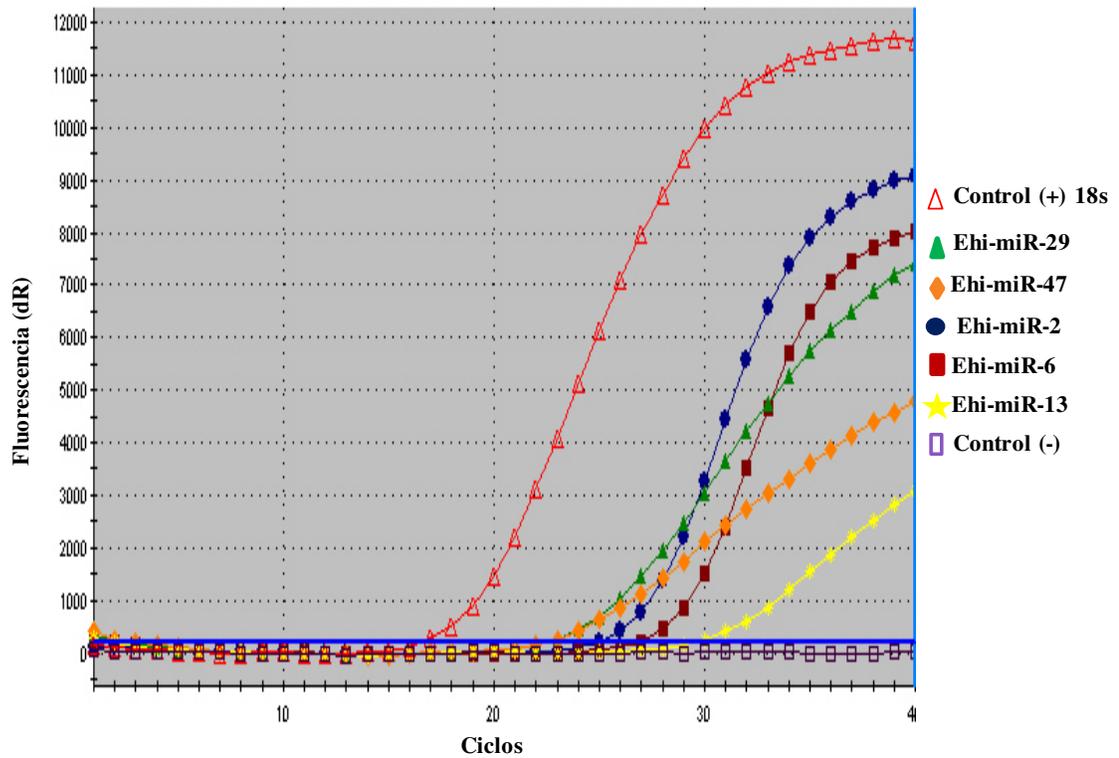


Figura 8. Amplificación mediante PCR tiempo real de los miRNAs candidatos en trofozoítos de *E. histolytica* amplificados en menos de 35 ciclos. Esta gráfica nos muestra los ciclos a los cuales fueron detectados los candidatos a miRNAs encontrados en trofozoítos de *E. histolytica*. Δ 18s de *E. histolytica* (ciclo 18), \blacktriangle Ehi-miR-29 (ciclo 25), \blacklozenge Ehi-miR-47 (ciclo 25), \bullet Ehi-miR-2 (ciclo 27), \blacksquare Ehi-miR-6 (ciclo 29), \star Ehi-miR-13 (ciclo 32), \square Control negativo (sin amplificación).

10.5 Análisis de los genes blanco probables de los miRNAs en *E. histolytica*

Como resultado del análisis de miRNAs de *E. histolytica* mediante la herramienta bioinformática miRanda, se obtuvieron 66 genes blanco probables de los cuales 32 son hipotéticos y 34 genes ya se encuentran descritos (Tabla IX).

Tabla IX
Lista de miRNA candidatos y sus posibles genes blanco en trofozoítos de *E. histolytica*

Probable miRNA	Descripción del gen blanco
PC-3p-88868_3_	Dominio de dedos de zinc
PC-5p-61776_6_	Posible, actina
PC-5p-85672_5_	Precursor del péptido ameboporo B, posible formador de poros
PC-5p-39239_9_	Posible, 40S proteína ribosomal S28
PC-3p-97135_5_	Proteína que contiene el dominio C2
PC-5p-85672_5_	Sistema N-amino transportador
*PC-5p-26437_14_	Proteína con el dominio TBC
PC-5p-162139_2_	Proteína con el dominio TBC
PC-5p-27148_14_	Dominio proteico del factor transcripcional CBF/NF-Y
PC-5p-146260_2_	Proteína hipotética
PC-5p-85672_5_	Miosina IB no convencional
PC-3p-135617_2_	Posible, subunidad 3 del factor de iniciación de la traducción eucariótica
PC-3p-145644_2_	Proteína hipotética
PC-3p-143628_2_	Posible, proteína anti-silenciante
PC-5p-85672_5_	Proteína hipotética
PC-3p-194526_2_	Posible, pequeño complejo cadena adaptador de clatrina
PC-3p-138999_2_	Posible, tioredoxina
PC-5p-168014_2_	Proteína hipotética
PC-5p-80674_5_	Proteína hipotética
PC-3p-168538_2_	Proteína hipotética
PC-3p-75976_4_	Proteína hipotética
PC-3p-88868_3_	Proteína hipotética
PC-5p-85672_5_	Posible, proteína 60S ribosomal L12
PC-5p-146260_2_	Posible, transportador ABC
PC-5p-354719_1_	Posible, precursor de dextranasa
PC-5p-354719_1_	Proteína hipotética
* PC-3p-149309_2_	Proteína hipotética
PC-5p-26437_14_	Proteína hipotética
PC-3p-447119_1_	GTPasa familia Ras
PC-5p-93041_3_	GTPasa familia Ras
PC-3p-194526_2_	Proteína hipotética
PC-5p-39239_9_	Proteína hipotética
PC-3p-81077_4_	Posible, proteína ribosomal L13
* miRNAs analizados por PCR tiempo real	

Continuación Tabla IX

Probable miRNA	Descripción del gen blanco
PC-5p-39239_9__	Adaptador de la Familia Proteica (AP)
PC-3p-133460_2__	Proteína hipotética
PC-5p-272253_1__	Proteína hipotética
PC-5p-163458_2__	Proteína hipotética
PC-5p-93041_3__	Posible, activador proteico Rap/Ran GTPasa
PC-5p-85672_5__	Posible, proteína 60S ribosomal L12
PC-5p-163458_2__	Posible, proteína 60S ribosomal L6
PC-5p-314216_1__	Proteína hipotética
PC-5p-116644_3__	Posible, proteína 40S ribosomal S3a
PC-3p-75976_4__	Posible, proteína Quinasa
PC-5p-85672_5__	Proteína hipotética
PC-3p-154964_2__	Proteína hipotética
PC-5p-157343_2__	Proteína hipotética
PC-3p-138999_2__	Proteína hipotética
PC-5p-39239_9__	Proteína hipotética
PC-5p-168014_2__	Proteína hipotética
PC-5p-168014_2__	Proteína hipotética
PC-5p-95785_3__	Proteína hipotética
PC-3p-195775_1__	Posible, proteína 40S ribosomal S3
PC-5p-157343_2__	Posible, Polifosfato inorgánico /ATP-NAD Quinasa
PC-3p-118177_3__	Proteína dominio SH3
PC-3p-118177_3__	Proteína que contiene un dominio dedos de zinc LIM
PC-5p-39239_9__	Proteína hipotética
PC-5p-167539_2__	Posible Proteína 60S ribosomal L26 genómico
PC-5p-149870_2__	Posible, Copina
PC-5p-149870_2__	Proteína hipotética
PC-3p-194526_2__	Posible, proteína Tola
PC-3p-331082_1__	Proteína 60S ribosomal ácida P2
PC-5p-85672_5__	Proteína hipotética
PC-5p-387627_1__	Proteína hipotética
* miRNAs analizados por PCR tiempo real	

11. DISCUSIÓN

Entamoeba histolytica es el protozooario parásito responsable de la amibiasis en humanos. Esta enfermedad afecta al 10% de la población mundial, es frecuente en países subdesarrollados con clima tropical y es responsable de aproximadamente 100 mil muertes por año en el mundo (WHO, 1997). La amibiasis también se presenta en urbes localizadas en grandes altitudes como la Ciudad de México e inclusive dentro del círculo polar ártico, como en San Petersburgo, Rusia, ciudad en donde fue descubierto su agente etiológico. Cuando el parásito invade el intestino grueso del ser humano se puede comportar como un comensal inofensivo o bien invadir la mucosa intestinal y causar destrucción tisular; dentro de estas alteraciones, la más habitual es la colitis amibiana ulcerativa. Con menor frecuencia, el parásito también puede invadir el hígado, los pulmones, el cerebro y la piel. Se ha sugerido que la microbiota intestinal, los factores de histocompatibilidad y la composición de los carbohidratos de la mucosa intestinal, los cuales tienen una gran variabilidad entre los individuos, pueden facilitar o limitar la invasividad amibiana, lo que podría explicar, al menos en parte, la diversidad de cuadros clínicos que presenta esta enfermedad (Arellano, 1987; Variyam, 2007).

A pesar de que *E. histolytica* fue descubierta hace más de 100 años, no fue sino hasta que se estableció su cultivo axénico (sin asociación con otros microorganismos) que se inició el estudio de su biología a nivel molecular (Diamond, 1978). La cepa de *E. histolytica* inicialmente axenizada y actualmente más utilizada en los laboratorios de investigación de todo el mundo es la HM1:IMSS, denominada así por ser la primer

amiba aislada en forma axénica del intestino de un paciente hospitalizado en el Centro Médico Nacional IMSS en 1967. Actualmente, la amibiasis continúa siendo un grave problema de salud para los países pobres. Sabemos que la solución a este problema consiste en elevar el nivel educativo y dotar de agua limpia y servicios sanitarios a toda la población. Sin embargo, como esto no es factible en el corto y mediano plazo, una alternativa racional para erradicar a esta enfermedad es producir conocimiento sobre los mecanismos moleculares del parásito, de esta manera se generarán nuevas alternativas terapéuticas.

Interesantemente, en la última década se descubrieron una clase de RNAs pequeños no codificantes denominados microRNAs (miRNAs), estos juegan un papel muy importante en la regulación de la traducción y degradación de los RNAs mensajeros de distintos organismos, sin embargo en *histolytica* no se habían caracterizado. De *et al.*, 2006; identificaron 17 miRNAs candidatos en *histolytica in silico* y recientemente Taméz-Guerrero, 2013 en nuestro laboratorio identificó en trofozoítos de *E. histolytica* 199 posibles miRNAs de acuerdo al criterio que distingue los miRNAs de otros RNAs pequeños (Grimson *et al.*; 2008, Ruby *et al.*; 2006 y Ruby *et al.*; 2007), mediante secuenciación profunda. Los posibles candidatos encontrados por secuenciación no mostraron ningún miRNA identificado previamente mediante bioinformática por De *et al.*, 2006. Esta diferencia podría deberse a los siguientes factores: 1) diferencias en el armado de los genomas, De y cols utilizó secuencias obtenidas del Instituto de Investigación Genómica (TIGR), específicamente de la base de datos para *Entamoeba* (Loftus, Anderson *et al.*, 2005), mientras que nosotros usamos secuencias obtenidas de

Amoeba DB (EupathDBs) (Aurrecochea *et al.*, 2007). 2) deficiencias en los procesos bioinformáticos que no detectan la presencia de miRNAs aún no descritos.

Para la realización de esta tesis, primeramente confirmamos la identidad de *Entamoeba histolytica* mediante caracterización enzimática para lo cual extrajimos su DNA genómico el cual presentó buena calidad sin degradación y posteriormente realizamos la identificación molecular mediante PCR punto final en donde apreciamos la amplificación de una banda de 427 pares de bases que se reporta como característica de la especie de *histolytica* (Paglia *et al.*, 2004). Después, se extrajo el RNA el cual fue analizado mediante el equipo Bioanalyzer 2100 presentando una calidad óptima para el análisis de microarreglos. Ya verificado la identidad de *E. histolytica* utilizamos las secuencias de 166 candidatos a miRNAs de los 199, esto fue porque 33 sondas faltaron de enviar para el análisis, por lo que solo 166 sondas se diseñaron para determinar su expresión mediante microarreglos. Se utilizó la técnica de μ Paraflo® microfluidic microchip (LC Sciences, USA) debido a que se ha empleado con éxito en múltiples experimentos de expresión de miRNAs de diversas especies (Shiboleth *et al.*, 2007; He *et al.*, 2008; Zhang Z. *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2009).

Los resultados de la expresión de los miRNAs en el microarreglo confirmaron la presencia de sólo 41 miRNAs de los 166 estudiados y no se encontró una correlación entre el número de copias encontradas de los miRNAs por secuenciación profunda y su expresión en el microarreglo, Agarwal *et al.*, 2010 mencionó que las técnicas de detección de la expresión génica comparadas con la secuenciación presentan variabilidad y existe discrepancia debido a la complejidad de las técnicas.

Adicionalmente, de los miRNAs encontrados en el microarreglo se eligieron 10 y se diseñaron 10 oligonucleótidos basados en el número de copias y en los niveles de expresión, esto con el objetivo de confirmar su presencia en los trofozoítos de *E. histolytica*. Se utilizó RT-PCR tiempo real la cual es considerada una técnica simple y precisa para identificar y cuantificar los niveles de expresión de los miRNAs (Lu *et al.*, 2005). Como resultado se confirmó la presencia de 9 de los 10 miRNAs seleccionados (Ehi-miR-47, Ehi-miR-29, Ehi-miR-13, Ehi-miR-6, Ehi-miR-2, Ehi-miR-24, Ehi-miR-12, Ehi-miR-144, Ehi-miR-8) mientras que el Ehi-miR-46 no fue detectado, probablemente al diseño del oligonucleótido o quizá a un error en la síntesis del mismo, ya que nuestro control positivo el RNA ribosomal 18s si presentó amplificación. De estos miRNAs amplificados solamente dos presentaron un gen blanco. En el análisis bioinformático Ehi-miR-13 podría regular una proteína con el dominio TBC las cuales contienen actividad GTPasa para proteínas Rab y se han encontrado desde la levadura hasta el humano (Gao *et al.*, 2008), y juegan un papel importante en la división celular (Copper y Nelson., 2006), exocytosis polarizada (Chesneau, *et al.*, 2004), polaridad celular (Tcheperegine *et al.*, 2005) transporte de proteínas del retículo endoplásmico al golgi (De Antoni *et al.*, 2002) y transporte vesicular (Martinu *et al.*, 2004). En cuanto al Ehi-miR-144 su gen blanco es una proteína hipotética, debido a que el genoma de *E. histolytica* no se encuentra totalmente descrito hay genes que codifican a proteínas hipotéticas que aún no se han descrito su función. Los demás genes blanco encontrados pero no confirmados en este trabajo por PCR tiempo real se encontraban involucrados con quinasas, proteínas Tol A, precursor del péptido ameboporo B, la miosina IB no convencional que interesantemente se encuentra presente en este parásito en conjunto

con la miosina II, ya que se ha propuesto que la sobrevivencia y patogenicidad este parásito requiere un citoesqueleto activo de miosina-actina (Labruyere, 2006).

Es importante mencionar que los miRNAs candidatos fueron analizados en el genoma de *E. histolytica* utilizando el banco de datos de Amoeba DB (EupathDBs).

La combinación entre las características de los miRNAs (presencia en fluidos biológicos, facilidad de colecta y estabilidad de las moléculas en las muestras) y la posibilidad de diferenciar varios organismos por medio de sus secuencias específicas de miRNAs, debería de ser tomado en cuenta para diseñar herramientas de diagnóstico para enfermedades parasitarias como ya se ha diseñado para otras enfermedades (Vaz *et al.*, 2010). Tomando en cuenta todas estas características, la detección de miRNAs en *E. histolytica* podría ser utilizada para el diagnóstico de amibiasis en fluidos corporales de paciente, específicamente en suero.

12. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permitieron concluir:

- 1.- La identidad molecular del DNA genómico extraído de los trofozoítos correspondió a *Entamoeba histolytica* debido a la amplificación de la banda de 427 y la digestión específica con *Xba* I.
- 2.- La expresión de los probables miRNAs identificados en los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* mediante el microarreglo, mostró la expresión de 41 miRNA de los 166 analizados, por lo que faltaría analizar los 33 miRNAs restantes de los 199 descritos.
- 3.- Se encontró la amplificación de 9 candidatos a miRNAs por RT-PCR tiempo real y el miRNA (Ehi-miR-46) no fue posible detectarlo.
- 4.- El análisis bioinformático determinó 66 genes blanco probables de los miRNAs que correspondieron a 32 ya descritos y 34 probables genes hipotéticos.
- 5.- De los 9 candidatos a miRNAs de *Entamoeba histolytica* confirmados, dos miRNAs podrían regular lo genes blanco, el Ehi-miR-13 podría regular una proteína con el dominio TBC las cuales contienen actividad GTPasa y el Ehi-miR-144 su gen blanco es una proteína hipotética de la cual no se ha descrito aún su función.

5.- En esta tesis se encontró la expresión en microarreglo de 41 miRNAs de *Entamoeba histolytica*, en contraste con la predicción *in silico* reportada por De *et al.*, 2006.

13. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en ésta tesis representan la primera caracterización del transcriptoma de miRNAs en éste parásito y podrían ser usados como una nueva plataforma para estudiar la estructura del genoma, su regulación y la evolución de *E. histolytica* así como sus interacciones huésped-parásito.

Los 9 miRNAs de *Entamoeba histolytica*, validados en éste trabajo abren la posibilidad para confirmar la funcionalidad de los miRNAs ya sea *in vitro* en los genes blanco o *in vivo* en la amiba. Además, sería interesante validar una cantidad mayor de miRNAs para complementar el estudio de cuales más se encuentran presentes, y ésto ampliaría la información obtenida hasta el momento de estas moléculas y su actividad funcional en *Entamoeba histolytica*.

Adicionalmente, la expresión de miRNAs y otros genes podrían estar involucrados en el proceso de enquistamiento de *Entamoeba histolytica*. Barrón *et al.*, 2008 realizó la diferenciación celular de la amiba *in vitro* y hasta la fecha solamente se existen evidencias de algunas proteínas involucradas en el proceso de enquistamiento analizado mediante espectrofotometría de masas (Ali *et al.*, 2012) y en muestras de heces fecales en pacientes. Por lo que sería de gran importancia analizar cómo los miRNAs podrían regular el enquistamiento y aportar en un futuro información para el control adecuado de la amibiasis a nivel molecular, así como para generar conocimiento nuevo en su ciclo de vida, virulencia y patogenicidad.

Finalmente, descubrimientos recientes sobre la presencia de microRNAs en sangre, suero, plasma y otros fluidos como orina y saliva han elevado el interés del posible uso de estas moléculas como biomarcadores (Cortez *et al.*, 2011). La presencia de miRNAs en estos fluidos biológicos se atribuye tanto a la estabilidad como a su pequeño tamaño, adicionalmente se ha demostrado que la mayoría de los miRNAs detectables en suero y saliva se encuentra dentro de exosomas que podrían evitar la degradación de estas moléculas y servir como medio de transporte para facilitar la actividad de los miRNAs en otras células (Gallo *et al.*, 2012).

La presencia y la concentración relativa de miRNAs específicos en diferentes fluidos biológicos está relacionada con el tejido, así como su estado fisiológico, lo cual resulta en un perfil de expresión de proteínas definido como se ha demostrado en varias patologías (Wang *et al.*, 2011). Esta característica podría ser utilizada para el diagnóstico específico de agentes infecciosos bien definidos. La combinación entre las características de los miRNAs (presencia en fluidos biológicos, facilidad de colecta y estabilidad de las moléculas en las muestras) y la posibilidad de diferenciar varios organismos por medio de sus secuencias específicas de miRNAs, debería de ser tomado en cuenta para diseñar herramientas de diagnóstico para enfermedades parasitarias, este tipo de herramientas ya se ha diseñado para otras enfermedades (Vaz *et al.*, 2010). Tomando en cuenta todas estas características, la detección de miRNAs en *E histolytica* podría ser utilizada para ampliar el conocimiento molecular de los miRNAs y el diagnóstico de amibiasis en fluidos corporales de pacientes. Por lo que sería interesante

confirmar los miRNAs detectados en el transcriptoma para seleccionar los miRNAs con potencial funcional en la amiba.

14. LITERATURA CITADA

- Abbott A.L., Alvarez-Saavedra E., Miska E.A., Lau N.C., Bartel D.P., Horvitz H.R., Ambros V., (2005). The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell*. 9:403-14.
- Abed, M., Ankri, S., 2005. Molecular characterization of *Entamoeba histolytica* RNase III and AGO2, two RNA interference hallmark proteins. *Experimental Parasitology* 110, 265–269.
- Agarwal A, Koppstein D, Rozowsky J, Sboner A, Habegger L, Hillier LW, Sasidharan R, Reinke V, Waterston RH, Gerstein M: Comparison and calibration of transcriptome data from RNA-Seq and tiling arrays. *BMC Genomics* 2010, 11:383.
- Ali IKM, Haque R, Siddique A, Kabir M, Sherman NE, *et al.* (2012). Proteomic analysis of the cyst stage of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl Trop Dis* 6 (5): e1643. doi:10.1371/journal.pntd.000164
- Ambros, V., (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431: 350-355.
- Arellano J, Isibasi A, Miranda R, *et al.* (1987). HLA antigens associated to amoebic abscess of the liver in Mexican mestizos. *Parasite Immunol.* 9(6):757-60.

- Baptiste, E., H. Brinkmann, J. A. Lee, D. V. Moore, C. W. Sensen *et al.*, (2002). The analysis of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: Dictyostelium, Entamoeba, and Mastigamoeba. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 1414-1419.
- Barrón-González, M. P., L. Villarreal-Trevino, D. Resendez-Perez, B. D. Mata-Cardenas and M. R. Morales-Vallarta., (2008). *Entamoeba histolytica*: cyst-like structures *in vitro* induction. Exp Parasitol 118: 600-603.
- Bartel, D. P., (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116:281-297.
- Berezikov, E., F. Thummler, L. W. van Laake, I. Kondova, R. Bontrop *et al.*, (2006a). Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. Nat Genet 38:1375-1377.
- Berezikov, E., G. van Tetering, M. Verheul, J. van de Belt, L. van Laake *et al.*, (2006b). Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis. Genome Res 16:1289-1298.
- Bohnsack, M. T., K. Czaplinski and D. Gorlich, (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. RNA. 10:185-191.

- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP., (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19: 185-193
- Burnside, J., M. Ouyang, A. Anderson, E. Bernberg, C. Lu *et al.*, (2008). Deep sequencing of chicken microRNAs. *BMC Genomics* 9: 185.
- Byers, T.J. (1986). Molecular biology of DNA in *Acanthamoeba*, *amoeba*, *Entamoeba* and *Naegleria*. *International Journal of Cytology* 99:311-341.
- Caballero-Salcedo, A., M. Viveros-Rogel, B. Salvatierra, R. Tapia-Conyer, J. Sepulveda-Amor *et al.*, (1994). Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 50: 412-419.
- Cai, X., C. H. Hagedorn and B. R. Cullen (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10: 1957-1966.
- Campbell CL, Harrison T, Hess AM, Ebel GD. (2013). MicroRNA levels are modulated in *Aedes aegypti* after exposure to Dengue-2. *Insect Mol Biol*. doi: 10.1111
- Carrington, J. C., and V. Ambros., (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*. 301: 336-338.
- Castanon-Sanchez, C. A., J. P. Luna-Arias, M. G. de Dios-Bravo, M. E. Herrera-Aguirre, J. J. Olivares-Trejo *et al.*, (2009). *Entamoeba histolytica*: A unicellular

organism containing two active genes encoding for members of the TBP family.
Protein Expr Purif.

Cooper, J.A. and Nelson, S.A., (2006). *The Journal of Cell Biology*, 172, 331-3.

Chesneau, L. Dupre, S. Burdina, A. Roger, J. Le Panse, S. Jacquet, M. and Cuif, M.H.
(2004). *Journal of Cell Science*, 117, 4757-67.

Clark, C. G., (2000). The evolution of *Entamoeba*, a cautionary tale. *Res Microbiol* 151:
599-603.

Clark, C. G., and L. S. Diamond., (1991). Ribosomal RNA genes of 'pathogenic' and
'nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol Biochem Parasitol* 49:
297-302.

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

Cortez, M. A., C. Bueso-Ramos, J. Ferdin, G. Lopez-Berestein, A. K. Sood and G. A.
Calin (2011). "MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and
biomarkers." *Nat Rev Clin Oncol* 8(8): 467-477.

Davis, P. H., J. Schulze and S. L. Stanley, Jr., (2007). Transcriptomic comparison of two
Entamoeba histolytica strains with defined virulence phenotypes identifies new
virulence factor candidates and key differences in the expression patterns of
cysteine proteases, lectin light chains, and calmodulin. *Mol Biochem Parasitol*
151: 118-128.

- De Antoni, A. Schmitzova, J. Trepte, H.H. Gallwitz, D. and Albert, S., (2002). The Journal of biological chemistry, 277, 41023-31.
- De, S., D. Pal and S. K. Ghosh., (2006). *Entamoeba histolytica*: computational identification of putative microRNA candidates. Exp Parasitol 113: 239-243.
- Denli, A. M., B. B. Tops, R. H. Plasterk, R. F. Ketting and G. J. Hannon., (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. Nature 432: 231-235.
- Diamond LS, Harlow, DR, Cunnick, CC., (1978). A new médium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 72:431-32.
- Diamond, L. S., and C. G. Clark., (1993). A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J Eukaryot Microbio 1 40: 340-344.
- Dolken, L., S. Pfeffer and U. H. Koszinowski., (2009). Cytomegalovirus microRNAs. Virus Genes 38: 355-364.
- Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, *et al.*, (2003). MicroRNA targets in Drosophila. Genome Biol 5: R1.
- Floyd, S.K., Bowman, J.L., (2004). Gene regulation: ancient microRNA target sequences in plants. Nature, 428:485-486.

- Gallo, A., M. Tandon, I. Alevizos and G. G. Illei (2012). "The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes." PLoS One 7(3): e30679.
- Gao X, Gulari E, Zhou X., (2004). In situ synthesis of oligonucleotide microarrays. Biopolymers 73: 579-596.
- Gao X, Jin C, Xue Y, Yao X., (2008). Computational analyses of TBC protein family in eukaryotes. Protein Pept Letters.;15(5):505-9.
- Garcia, L.S., and D.A. Bruckner. (1997). Diagnostic medical parasitology, 3rd ed. ASM Press.
- Gilchrist,C.A., Holm,C.F., Hughes,M.A., Schaenman,J.M., Mann,B.J. and Petri,W.A. Jr (2001). Identification and characterization of an *Entamoeba histolytica* upstream regulatory element 3 sequence-specific DNA-binding protein containing EF-hand motifs. J. Biol. Chem., 276, 11838–11843.
- Gilchrist,C.A., Leo,M., Line,C.G., Mann,B.J. and Petri,W.A. Jr (2003). Calcium modulates promoter occupancy by the *Entamoeba histolytica* Ca²⁺-binding transcription factor URE3-BP. J. Biol. Chem., 278, 4646–4653.
- Glazov, E. A., P. A. Cottee, W. C. Barris, R. J. Moore, B. P. Dalrymple *et al.*, (2008). A microRNA catalog of the developing chicken embryo identified by a deep sequencing approach. Genome Res 18: 957-964.
- Gottesman, S., (2005). Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. Trends Genet 21: 399-404.

- Gregory, R. I., T. P. Chendrimada, N. Cooch and R. Shiekhattar., (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123: 631-640.
- Grimson A, Srivastava M, Fahey B, Woodcroft BJ, Chiang HR, *et al.*, (2008). Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* 455: 1193–1197.
- He PA, Nie Z, Chen J, Lv Z, Sheng Q, Zhou S, Gao X, Kong L, Wu X, Jin Y, *et al.*, (2008). Identification and characteristics of microRNAs from *Bombyx mori*. *BMC Genom.* 9(1):248. doi: 10.1186/1471-2164-9-248.
- Hon CC, Weber C, Sismeiro O, Proux C, Koutero M, Deloger M, Das S, Agrahari M, Dillies MA, Jagla B, Coppee JY, Bhattacharya A, Guillen N. (2013). Quantification of stochastic noise of splicing and polyadenylation in *Entamoeba histolytica*. *Nucleic Acids Res.* 1;41(3):1936-52. doi: 10.1093/nar/gks1271. Epub 2012 Dec 20.
- Huang J, Hao P, Chen H, Hu W, Yan Q, *et al.*, (2009). Genome-wide identification of *Schistosoma japonicum* microRNAs using a deep-sequencing approach. *PLoS One* 4: e8206.
- John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, *et al.*, (2004). Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2: e363.

- Kaur, G., Lohia, A., (2004). Inhibition of gene expression with double strand RNA interference in *Entamoeba histolytica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320, 1118–1122.
- Katz M., Despommier DD. and Gwadz RW. (1989). *Parasitic diseases*. Springer-Verlag, New York, N.Y., pp.129-135.
- Kim, V. N., and J. W. Nam, (2006) Genomics of microRNA. *Trends Genet* 22: 165-173.
- Kurzynska-Kokorniak, A., P. Jackowiak and M. Figlerowicz (2009). Human- and virus-encoded microRNAs as potential targets of antiviral therapy. *Mini Rev Med Chem* 9: 927-937.
- Labruyere E, Guillen N., (2006). Host tissue invasion by *Entamoeba histolytica* is powered by motility and phagocytosis. *Arch Med Res* 37: 253–258.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel and T. Tuschl., (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294: 853-858.
- Lai, E. C., (2002). microRNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature Genetics* 30: 363-364.
- Landgraf, P., M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino *et al.*, (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129: 1401-1414.

Lin, W. C., S. C. Li, J. W. Shin, S. N. Hu, X. M. Yu *et al.*, (2009). Identification of microRNA in the protist *Trichomonas vaginalis*. *Genomics* 93: 487-493.

Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U. C., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R. P., Mann, B. J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., Willhoeft, U., Bhattacharya, A., Chillingworth, T., Churcher, C., Hance, Z., Harris, B., Harris, D., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Squares, R., Whitehead, S., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Norbertczak, H., Price, C., Wang, Z., Guillen, N., Gilchrist, C., Stroup, S. E., Bhattacharya, S., Lohia, A., Foster, P. G., Sicheritz-Pontén, T., Weber, C., Singh, U., Mukherjee, C., El-Sayed, N. M., Petri WA, J. R., Clark, C. G., Embley, T. M., Barrell, B., Fraser, C. M., & Hall, N., (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *NATURE*, 433(7), 865-868.

López-Rosas I, Orozco E, Marchat LA, Garcí'a-Rivera G, Guillen N, *et al.* (2012) mRNA Decay Proteins Are Targeted to poly(A)+ RNA and dsRNA-Containing Cytoplasmic Foci That Resemble P-Bodies in *Entamoeba histolytica*. *PLoS ONE* 7(9): e45966. doi:10.1371/journal.pone.0045966

Lorenzi HA, Puiu D, Miller JR, Brinkac LM, Amedeo P, *et al.* (2010) New Assembly, Reannotation and Analysis of the *Entamoeba histolytica* Genome Reveal New Genomic Features and Protein Content Information. *PLoS Negl Trop Dis* 4(6): e716. doi:10.1371/journal.pntd.0000716

- Love, T. M., H. F. Moffett and C. D. Novina., (2008). Not miR-ly small RNAs: big potential for microRNAs in therapy. *J Allergy Clin Immunol* 121: 309-319.
- Lu DP, Read RL, Humphreys DT, Battah FM, Martin DI, *et al.*, (2005). PCR based expression analysis and identification of microRNAs. *J RNAi Gene Silencing* 1: 44-49.
- Mai, Z., S. Ghosh, M. Frisardi, B. Rosenthal, R. Rogers *et al.*, (1999). Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Biol* 19: 2198-2205.
- Martinez-Palomo, A., A. Gonzalez-Robles and M. De la Torre., (1973). Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced con A. *Nat New Biol* 245: 186-187.
- Martinu, L. Masuda-Robens, J.M. Robertson, S.E. Santy, L.C. Casanova, J.E. and Chou, M.M., (2004). *Molecular and cellular biology*, 24, 9752-62.
- Melendez-Hernandez, M. G., M. L. Barrios, E. Orozco and J. P. Luna-Arias., (2008). The vacuolar ATPase from *Entamoeba histolytica*: molecular cloning of the gene encoding for the B subunit and subcellular localization of the protein. *BMC Microbiol* 8: 235.
- Mendell, J. T., (2008). miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* 133: 217-222.

- Meng Y, Huang F, Shi Q, Cao J, Chen D, Zhang J, Ni J, Wu P, Chen M., (2009).
Genome-wide survey of rice microRNAs and microRNA-target pairs in the root
of a novel auxin-resistant mutant. *Planta*. 230(5):883–898. doi:
10.1007/s00425-009-0994-3.
- Pasquinelli A.E., Reinhart B.J., Slack F., Martindale M.Q., Kuroda M.I., Maller B.,
Hayward D.C., Ball E.E., Degan B., Muller P., Spring J., Srinivasan A.,
Fishman M., Finnerty J., Corbo J., Levine M., Leahy P., Davidson E., Ruvkun G.,
(2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7
heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 408:86-89.
- Paglia MG., Visca P., (2004). An improved PCR-based method for detection and
differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in formalin-fixed
stools. *Acta Trop*. Nov-Dec;92(3):273-7.
- Quintas-Granados, L. I., E. Orozco, L. G. Brieba, R. Arroyo and J. Ortega-Lopez.,
(2009). Purification, refolding and autoactivation of the recombinant cysteine
proteinase EhCP112 from *Entamoeba histolytica*. *Protein Expr Purif* 63: 26-32.
- Ravdin J., (1995). Amebiasis. *Clin Infect Dis*. 20 (6), 1453-1466.
- Rosenfeld, N., R. Aharonov, E. Meiri, S. Rosenwald, Y. Spector *et al.*, (2008).
MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol* 26: 462-
469.

- Schaenman, J.M., Gilchrist, C.A., Mann, B.J. and Petri, W.A. Jr (2001). Identification of two *Entamoeba histolytica* sequence-specific URE4 enhancer-binding proteins with homology to the RNA binding motif RRM. *J. Biol. Chem.*, 276, 1602–1609.
- Sargeant, P. G., J. E. Williams and J. D. Grene., (1978). The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72: 519-521.
- Sehgal D., Bhattacharya A., Bhattacharya S., (1996). Pathogenesis of infection by *Entamoeba histolytica*. *J. Biosci.* 21 (3), 423-432.
- Shiboleth YM, Haronsky E, Leibman D, Arazi T, Wassenegger M, Whitham SA, Gaba V, Gal-On A., (2007). The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediate symptom development. *J Virol.* 81(23):13135–13148. doi: 10.1128/JVI.01031-07.
- Sijen, T., F. A. Steiner, K. L. Thijssen and R. H. Plasterk., (2007). Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science* 315: 244-247.
- Singh, U. and Rogers, J.B. (1998) The novel core promoter element GAAC in the hgl5 gene of *Entamoeba histolytica* is able to direct a transcription start site independent of TATA or initiator regions. *J. Biol. Chem.*, 273, 21663–21668.

- Singh,U., Gilchrist,C.A., Schaenman,J.M., Rogers,J.B., Hockensmith,J.W., Mann,B.J. and Petri,W.A. (2002) Contextdependent roles of the *Entamoeba histolytica* core promoter element GAAC in transcriptional activation and protein complex assembly. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 120, 107–116.
- Strachan, W. D., P. L. Chiodini, W. M. Spice, A. H. Moody and J. P. Ackers., (1988). Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* 1: 561-563.
- Sunkar, R., and G. Jagadeeswaran., (2008). *In silico* identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. *BMC Plant Biol* 8: 37.
- Tamez, G.M.M, (2013). Secuenciación y verificación de microRNAs de *Entamoeba Histolytica* HM1-IMSS. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Tannich, E., R. D. Horstmann, J. Knobloch and H. H. Arnold., (1989). Genomic DNA differences between pathogenic and non pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5118-5122.
- Tcheperegine, S.E. Gao, X.D. and Bi, E. (2005). *Molecular and cellular biology*, 25, 8567-80.
- Tolia, N. H., and L. Joshua-Tor., (2007). Slicer and the argonautes. *Nat Chem Biol* 3: 36-43.

- Tolstrup, J., E. Krause, E. Tannich and I. Bruchhaus., (2007). Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology* 134: 289-298.
- Ullu, E., Tschudi, C., Chakraborty, T., 2004. RNA interference in protozoan parasites. *Cellular Microbiology* 6, 509–519.
- Variyam EP. Luminal., (2007). Host-defense mechanisms against invasive amebiasis. *Trends Parasitol.* 23(3):108-11.
- Walsh, J. A., (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 8: 228-238.
- Wang, Y., D. Zheng, Q. Tan, M. X. Wang and L. Q. Gu (2011). "Nanopore-based detection of circulating microRNAs in lung cancer patients." *Nat Nanotechnol* 6(10): 668-674.
- Wei Y, Chen S, Yang P, Ma Z, Kang L., (2009). Characterization and comparative profiling of the small RNA transcriptomes in two phases of locust. *Genome Biol* 10: R6.
- World Health Organization. Amoebiasis. *Weekly Epidemiologic Record.* (1997); 72:97-100.
- Willhoeft, U., and E. Tannich., (1999). The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 99: 41-53.

- Wilson KD, Venkatasubrahmanyam S, Jia F, Sun N, Butte AJ, Wu JC., (2009). MicroRNA profiling of human-induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Devel.* 18(5):749–758.
- Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 11(3):228-34.
- Ximénez, C., (2000). Parasitosis intestinales en México. Fundación Mexicana para la Salud.
- Xue, X., J. Sun, Q. Zhang, Z. Wang, Y. Huang *et al.*, (2008). Identification and characterization of novel microRNAs from *Schistosoma japonicum*. *PLoS One* 3 (12).
- Zamore, P. D., and B. Haley., (2005). Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* 309: 1519-1524.
- Zeng, Y., R. Yi and B. R. Cullen., (2005). Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J* 24: 138-148.
- Zhang, H., G. M. Ehrenkauf, J. M. Pompey, J. A. Hackney and U. Singh., (2008). Small RNAs with 5'-polyphosphate termini associate with a Piwi-related protein and regulate gene expression in the single-celled eukaryote *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog* 4: e1000219.

Zhu Q, Hong A, Sheng N, Zhang X, Matejko A, *et al.*, (2007). microParaflo biochip for nucleic acid and protein analysis. *Methods Mol Biol* 382: 287-312

Zhang B., Pan X., Cannon C.H., Cobb G.P. Anderson T.A., (2006b). Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Plant J*, 46:243-259.

Zhang B.H., Pan X.P., Cox S.B., Cobb G.P., Anderson T.A., (2006f). Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cell Mol Life Sci*, 63:246-254.

Páginas electrónicas

- <http://mirbase.org>

- http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Entamoeba_histolytica_life_cycle-en.svg

- Ruiz Villarreal, 2008.

- SUIVE/DGE/SALUD/Información Epidemiológica de Morbilidad, Anuario 2011.

http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/ver_ejecutiva_2011.pdf

15. APÉNDICE

PUBLICACIONES Y CONGRESOS

Publicaciones

Mar-Aguilar F, Trevino V, Salinas-Hernandez JE, Tamez-Guerrero MM, Barron-Gonzalez MP, *et al.* (2013). Identification and Characterization of microRNAs from *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. PLoS ONE 8(7): e68202. doi:10.1371/journal.pone.0068202

Congresos

Presentación en poster en el Congreso Internacional “2011 Drosophila research conference”, celebrado en San Diego, CA del 30 Marzo al 3 de Abril del 2011.

RESUMEN CURRICULAR

M.C. Jannet Edith Salinas Hernández

Candidato para el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS en la Especialidad en Microbiología

Tesis: “Análisis de la expresión de *miRNAs* en trofozoitos de *Entamoeba histolytica*”

Campo de estudio:

Microbiología, Parasitología y Biología Molecular con énfasis en amibiasis.

Educación:

- **Maestría:** Estudios realizados en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León

- **Licenciatura:** Estudios realizados en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Premios

Mejor Tesis de Licenciatura en Ciencias Naturales en el año de 2002, otorgado por la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Primer lugar: Otorgado por el Poder Ejecutivo del Estado de Nuevo León a través en el Encuentro del Premio Estatal de la Juventud en el área de Innovación Tecnológica 2004.

Mejor Tesis de Maestría en Ciencias Naturales en el año de 2005, otorgado por la Universidad Autónoma de Nuevo León

Tercer lugar mundial 2012 y 2013 en Competencia Internacional de Biología Sintética iGEM (international Genetically Engineered Machine Competition) edición Preparatoria, organizada anualmente por el prestigioso Instituto Tecnológico de Massachusetts mejor conocido por sus siglas en inglés como MIT.

Experiencia profesional

-Docencia: Maestro de nivel medio superior en el área de Química y Biología en la Preparatoria # 7 y CIDEB desde el 2004 a la fecha.

- Investigación: Estancia de Investigación como asistente de investigación en la Universidad de Texas del área Médica (University of Texas Medical Branch, UTMB) en el Departamento de Neurología, durante el periodo comprendido del 5 de Julio al 1 de Septiembre del 2007.

Estancia de Investigación como asistente de investigación en la Universidad de Texas del área Médica (University of Texas Medical Branch, UTMB) en el Departamento de Neurología, durante el periodo comprendido del 4 de Diciembre, 2006 al 26 de Enero, 2007.

Departamento de Biología Celular, en el Lab. Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, durante el periodo de Septiembre de 2004 a Septiembre 2013.

Publicaciones:

- 1) Fernandez-Funez P, Salinas J, Nino-Rosales L, and Rincon-Limas DE (2008). Novel suppressors of Abeta neurotoxicity. In *New Trends in Alzheimer and Parkinson Related Disorders*, eds Hanin, I, Windisch M, Poewe W, and Fisher A, 37-41, Medimont Ed., Bologna, Italy.

- 2) Clara E. Isaza, Cristina Rodriguez, Lyzett Uribe, Hugo A. Perez, Jannet Salinas & Mauricio Cabrera-Rios (2011): The use of central composite designs to improve cytotoxicity data generation: a case study, *IIE Transactions on Healthcare Systems Engineering*, 1:4, 226-231.

- 3) Mar-Aguilar F, Trevino V, Salinas-Hernandez JE, Tamez-Guerrero MM, Barron-Gonzalez MP, *et al.* (2013). Identification and Characterization of microRNAs from *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. *PLoS ONE* 8(7): e68202. doi:10.1371/journal.pone.0068202

Identification and Characterization of microRNAs from *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS

Fermín Mar-Aguilar¹*, Víctor Trevino²*, Jannet E. Salinas-Hernández¹, Marcela M. Taméz-Guerrero¹, María P. Barrón-González¹, Eufemia Morales-Rubio¹, Jaime Treviño-Neávez¹, Jorge A. Verduzco-Martínez¹, Mario R. Morales-Vallarta¹, Diana Reséndez-Pérez¹*

¹ Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México,

² Departamento de Ingeniería Biomédica, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Monterrey, Nuevo León, México

Abstract

Background: *Entamoeba histolytica* is the causative agent of amebiasis, a disease that is a major source of morbidity and mortality in the developing world. MicroRNAs (miRNAs) are a large group of non-coding RNAs that play important roles in regulating gene expression and protein translation in animals. Genome-wide identification of miRNAs is a critical step to facilitating our understanding of genome organization, genome biology, evolution, and post-transcriptional regulation.

Methodology/Principal Findings: We sequenced a small RNA library prepared from a culture of trophozoites of *Entamoeba histolytica* Strain HM1-IMSS using a deep DNA sequencing approach. Deep sequencing yielded 16 million high-quality short sequence reads containing a total of 5 million non-redundant sequence reads. Based on a bioinformatics pipeline, we found that only 0.5% of these non-redundant small RNA reads were a perfect match with the drafted *E. histolytica* genome. We did not find miRNA homologs in plant or animal miRNAs. We discovered 199 new potential *Entamoeba histolytica* miRNAs. The expression and sequence of these Ehi-miRNAs were further validated through microarray by μ Paraflo Microfluidic Biochip Technology. Ten potential miRNAs were additionally confirmed by real time RT-PCR analysis. Prediction of target genes matched 32 known genes and 34 hypothetical genes.

Conclusions/Significance: These results show that there is a number of regulatory miRNAs in *Entamoeba histolytica*. The collection of miRNAs in this parasite could be used as a new platform to study genomic structure, gene regulation and networks, development, and host-parasite interactions.

Citation: Mar-Aguilar F, Trevino V, Salinas-Hernández JE, Tamez-Guerrero MM, Barrón-González MP, et al. (2013) Identification and Characterization of microRNAs from *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. PLoS ONE 8(7): e68202. doi:10.1371/journal.pone.0068202

Editor: Panela Rameshwar, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, United States of America

Received: March 26, 2013; **Accepted:** May 27, 2013; **Published:** July 12, 2013

Copyright: © 2013 Mar-Aguilar et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Funded by Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica grant GCN040-10. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: diana.resendezpr@uanl.edu.mx

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Entamoeba histolytica causes amebic dysentery and liver abscesses. Most infections with *E. histolytica* are asymptomatic and only one in five infections leads to disease [1,2,3]. The parasite and host factors that control the outcome of this infection (asymptomatic infection versus amebic dysentery and/or liver abscesses) are not well understood, although there is emerging evidence that host, parasite and environmental factors influence the outcome of infection [1,2,3]. Alteration in the transcription of certain crucial genes is also likely to contribute to the outcome of infection. The latent period between infection and disease in humans suggests that the parasite adapts to the host via altered gene expression [4]. This is best illustrated by the ability of *E. histolytica* to select for increased virulence of an axenic strain of *E. histolytica* by multiple rounds of passage through animals [5].

MicroRNAs (miRNAs) are part of the interference RNA (iRNA) machinery for post-transcriptional regulation. miRNAs are 21–24 nucleotide-long RNA fragments that repress mRNA by partially

binding to target mRNAs by base-pairing. Because a large fraction of protein-coding genes are under miRNA control, production of the appropriate level of specific miRNAs at the right time and place is integral to most gene regulation pathways [6].

The RNAi machinery seems to be functional in *Entamoeba* but it appears to be different compared with the RNAi machinery in other model systems. Most components of typical RNAi pathway genes are present in the *E. histolytica* genome. For example the AGO gene (*EHI_125650*), part of the RNAi pathway, has been proven to be functional *in vivo*. Nevertheless, Dicer, a key enzyme that cleaves un-mature miRNAs for activation is still elusive in *E. histolytica*. In contrast, small RNA cloning efforts have revealed the existence of a complex population of small RNAs that are likely to be involved in regulating gene expression. Interestingly, since the 5'-polyP small RNAs are Dicer-independent, it is possible that *E. histolytica* could have evolved some unknown mechanism to manipulate gene expression without a Dicer enzyme. The discovery of an abundant population of 27-nucleotide-long small iRNAs (siRNA) with an unusual 5'-polyP structure suggests that

the siRNA pathway is functional in *E. histolytica* [7,8]. This implies that *E. histolytica* can generate miRNAs that play important roles in post-transcriptional regulation.

Some putative miRNAs from *E. histolytica* were predicted using a bioinformatic approach [9]. However, experimental identification of small RNA molecules may increase our knowledge of microRNAs, reveal unique classes of riboregulators [10], and develop novel biomarkers for this parasitic disease [11]. Therefore, the goal of this study was to identify putative miRNA from an isolate of small RNA molecules from *E. histolytica*. We used throughput Solexa technology to sequence the *E. histolytica* small RNA library. The sequencing data were further analyzed and filtered for miRNA criteria. The miRNAs described here add to the growing database of novel miRNAs.

Results

Overview of the Sequencing Results

An Illumina GAIIX high throughput sequencing generated 16,688,748 individual sequencing reads with satisfactory base quality scores for trophozoites of *Entamoeba histolytica* strain HM1-IMSS. After removing the sequencing adaptor, artificial sequences, or unresolved nucleotides, we generated 5,239,324 mappable sequences, as shown in Figure 1. We performed several “mappings” on unique seqs against pre-miRNA and mature miRNA sequences listed in the latest release of miRBase [12], or genome based on the public releases of appropriate species. The filtered unique seqs were aligned against *pre-miRNAs* of *E. histolytica* specified in miRBase. The mapped unique seqs were grouped as “unique seqs mapped to selected *pre-miRNA* in miRbase”, while the remaining ones were grouped as “unique seqs un-mapped to selected *pre-miRNA* in miRbase”. Unique seqs were divided in 4 groups; the first 3 groups have sequences of pre-miRNA mapped to miRbase, but not mapped to *E. histolytica* genome, while group 4 contains unique seqs not mapped to miRbase. Group 4 was further divided depending on potential to form hairpins (group 4a), or inability to form hairpins (group 4b). A flowchart of the data analysis and number of mappable reads for each group is shown in Figures S1 and S2, respectively.

The relative abundance of these mappable reads by RNA size (15–30 nt) is shown in Figure 2. Most of the reads that are likely to be miRNAs are of 25 to 26 nucleotides in size, accounting for 40% of the total mappable reads.

Identification of Novel miRNAs in Trophozoites of *Entamoeba histolytica*

To further identify potential *E. histolytica* miRNAs, we considered properties that have proved useful for distinguishing bilaterian miRNAs from other types of small RNAs (see Materials and Methods section).

We aligned the small RNAs (5,239,324 total reads) to known animal miRNA precursors to identify conserved miRNAs. We obtained 1,706 (0.03%) sequences mapped to miRbase (*pre-miRNAs*) but these cannot form hairpins (group 2b in Figure S1). We did not observe any sequence mapped to other genomes (group 1a in Figure S1). Interestingly we counted 96,880 reads (78,754 for group 3a and 18,126 for 3b) that contain sequences that map to mature miRNA or *pre-miRNA* in miRbase but not map to *E. histolytica* genome. These sequences may be caused by the presence of bacteria in the vacuoles of *E. histolytica* and therefore were discarded.

Most of the reads not mapped to miRbase mapped to *E. histolytica* genome but cannot form hairpins (61.2%, group 4b in Figures S1 and S2) or do not represent RNA families, mRNAs, or

repetitive elements (24.4%, “Others” in Figures S1 and S2). Twelve percent were not mapped to *E. histolytica* (nohit in Figures S1 and S2). The remaining reads, 27,444 or 0.5% of all mapped reads not mapped to miRbase, potentially form hairpins and therefore may be strong miRNAs candidates in *Entamoeba histolytica*.

After filtering reads, the analysis revealed 199 miRNAs that were recognized in *E. histolytica* (Table S2). *E. histolytica* miRNA precursors are 58–142 nucleotides (nt) long and most showed the typical RNA hairpin structure, as denoted in Additional File 1. The length of these novel miRNAs ranged from 15 to 30 nt, and the minimum free energy (MFE) of the novel miRNAs varied from -65.70 to -7.19 kcal mol⁻¹. The average MFE of novel miRNAs was -21.65 kcal mol⁻¹, which is lower than the MFE of tRNA and rRNA. This result was similar to those of Bonnet et al. [13] indicating that the majority of miRNAs exhibit a folding free energy that is lower than the MFE of shuffled sequences.

Other authors have obtained miRNA sequences by bioinformatic approaches [9]. To date, these predictions have not been confirmed experimentally.

We compared the 199 putative miRNA sequences we obtained with the 32 sequences (grouped in 17 miRNAs) proposed by De et al. [9] using blast. We found only one 12-nt hit in the Ehi-miR-141 sequence (27 nt long) that matches the sequence of Eh-mir-17 predicted by De et al. We also compared the surrounding putative genomic regions (139 nt in average) and found 8 hits; the largest match was 13 nt. These results suggest that our putative miRNAs sequences are not similar to those proposed by De et al. [9].

Target Gene Prediction for miRNAs in *Entamoeba histolytica*

Prediction of target genes is a complex process and requires further experimentation to estimate the false-discovery rate. We used miRanda, an open-source computational algorithm with a known false-discovery rate [14,15]. There are 8201 protein-coding genes annotated for *E. histolytica*, and 90% of them do not have an annotated 3' UTR. Moreover, the annotated genes have 3' UTR sequences with variable length. Therefore we used the 340 genes with annotated 3' UTR to estimate the expected maximum length of their 3' UTR region by the mean plus two standard deviations (observed mean = 140 and sd = 180). Thus, we extracted -30 to $+500$ nucleotides relative to the stop codon. Wei et al. [16] set the parameter of minimum free energy (MFE) in -14 kcal mol⁻¹ but other authors, such as Huang et al., [17] set MFE in -25 kcal mol⁻¹. For this research, we choose an intermediate value of MEF (-18 kcal mol⁻¹) to perform the analysis with miRanda Algorithm [14]. We obtained 66 putative target genes; 32 are hypothetical and 34 genes have known functions (Table S1). These results suggest that miRNAs in *E. histolytica* could regulate 1 to 8 different targets including transcription factors.

Microarray Validation of Putative *E. histolytica* miRNAs

To confirm the existence of the newly identified *E. histolytica* miRNA candidates, we hybridized the same RNA preparation used in deep sequencing with μ Parafluo Microfluidic Biochip Technology [18]. Probes were based on the 199 candidate miRNA sequences obtained in this work. We used microarray spots and sequencing counts greater than 1 to avoid comparisons of poorly hybridized spots and unique sequences that could be caused by non-biological effects. Figure 3 shows an acceptable correlation of 0.532, suggesting agreement between expression estimates from the microarray and deep sequencing.

Raw reads: 16,688,748

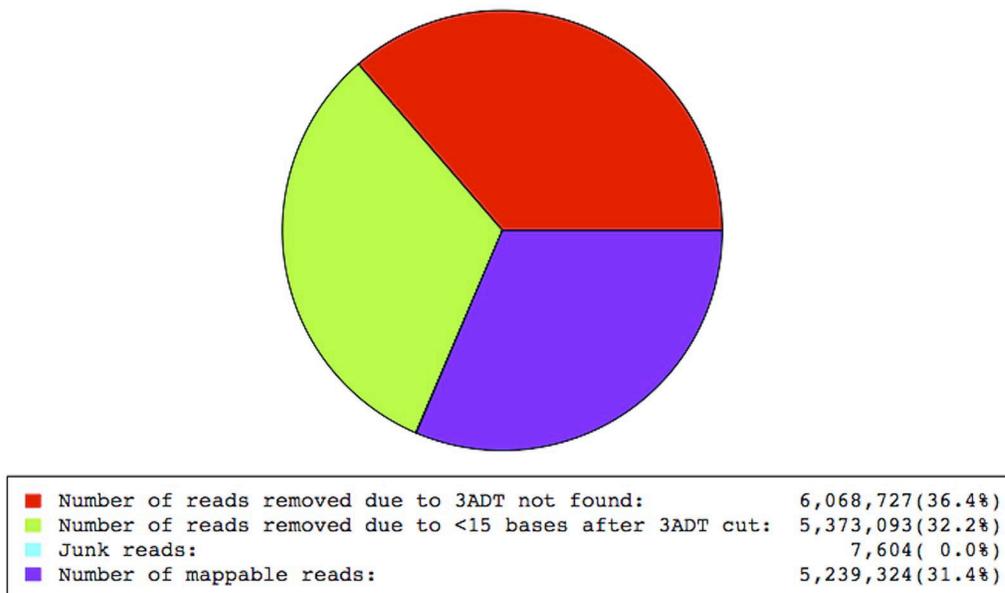


Figure 1. Pie plot of data filtering and database mapping. Distribution of reads obtained by deep Sequencing of trophozoites from *Entamoeba histolytica*.

doi:10.1371/journal.pone.0068202.g001

Real Time PCR Validation of Putative *E. histolytica* miRNAs

Some miRNAs were amplified by RT-PCR to further validate the presence of candidate miRNAs of *E. histolytica* identified from the sequencing results. We selected 10 candidate miRNAs from sequencing data across a wide range of copy levels (Ehi-miR-2, Ehi-miR-5, Ehi-miR-8, Eh-miR-12, Ehi-miR-13, Ehi-miR-24, Ehi-miR-29, Ehi-miR-46, Ehi-miR-47, Ehi-miR-144) and used rRNA 18S as control. The results shown in Figure S3 suggest that 9 out of 10 RT-PCR runs showed a level of amplification validating the presence of these candidate miRNAs.

Discussion

In cells, precise regulation of gene and protein expression is a fundamental mechanism for development, homeostasis, and adaptation to the environment. In eukaryotes, every step in the process of gene expression is subject to dynamic regulation. Studies have identified diverse biological processes involved in the regulation of gene expression in protozoa parasites.

Entamoeba histolytica is a parasite that causes amebic dysentery and liver abscesses. The parasite and host factors that control the outcome of this infection are not well understood, although there is emerging evidence of host, parasite, and environmental factors influencing the outcome of infection [1,2,3]. Altered transcription of certain crucial genes is also likely to contribute to the outcome of infection. The latent period between infection and disease in humans suggests that the parasite adapts to the host via altered gene expression [4]. Over the past decade, it has become clearer that a large class of small noncoding RNAs, known as microRNAs (miRNAs), function as important regulators of a wide range of cellular processes by modulating the translation and degradation of mRNAs. However, miRNA mechanisms have not been studied

in *Entamoeba histolytica*. To continue the rapid advancements surrounding miRNA discoveries we need applicable and validated experimental tools to enable researchers to study the expression and biological function of miRNAs.

Next-generation sequencing became available for the sequencing of small RNA molecules, including miRNAs. The sensitivity of deep sequencing allows us to measure absolute abundance and aids in the discovery of novel miRNAs. In this study, we obtained 16 million raw reads from a purified fraction of about 22 nt containing a total 5,239,324 mappable sequences with high-quality reads.

We found that only 0.5% of these non-redundant small RNA reads were a perfect match with the draft *E. histolytica* genome and were candidates to be miRNAs because their corresponding genomic region showed potential to form hairpins.

We experimentally identified the first 199 putative *E. histolytica* miRNAs according to criteria for distinguishing bilaterian miRNAs from other types of small RNAs [10,19,20] currently implemented in the bioinformatics pipeline script ACGT101-miR v4.2 [21,22]. Surprisingly, we found no similarities with known plant and animal miRNAs. This result is consistent with the finding that *Chlamydomonas reinhardtii*, a unicellular green alga, contains no homolog miRNAs. [23] This result suggests that unicellular miRNAs may represent a novel class of miRNAs that deserves to be studied further. Additionally, the lack of universally conserved miRNA among plants, animals, and green algae suggests that miRNA genes may have evolved independently in the lineages leading to these groups [23]. Our results suggest that the evolution of *E. histolytica* could be similar to that of green algae.

De and his colleagues identified seventeen candidate microRNAs in *Entamoeba histolytica* using a bioinformatic approach [9]; we have not observed similarities between the 199 miRNAs

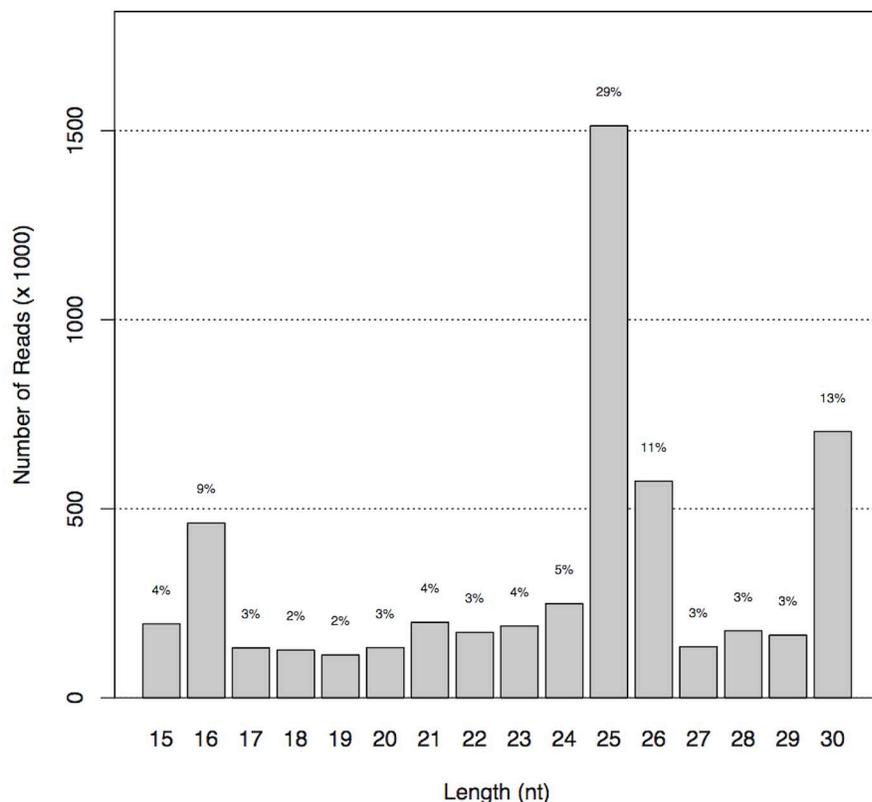


Figure 2. Length distribution of mappable reads. Most of the reads that are likely to be miRNAs are of 25 to 26 nucleotides in size accounting for 40% of the total mappable reads.
doi:10.1371/journal.pone.0068202.g002

obtained in this study and those proposed by De et al. This difference may be due to these three factors: the different genome assemblies—De et al. used data from The Institute of Genome Research (TIGR) *Entamoeba* genome database [24] while we used data from AmoebaDB (EuPathDBs) [25]; to the lack of representativity of the transcripts in the sample used in our study (trophozoite) or; to unknown deficiencies in the bioinformatics pipelines used in both studies.

We confirmed by microarray the presence of all predicted miRNA candidates. Additionally, Real-time PCR has proven to be a simple and accurate method to identify and measure the expression levels of miRNAs [26]. Using this approach, we validated the presence of 9 out of 10 selected novel miRNAs.

As an initial step toward understanding the biological function of miRNAs in *E. histolytica*, we searched for miRNA targets among annotated protein-coding transcripts of *E. histolytica*. Applying a cutoff value of $-18 \text{ kCal mol}^{-1}$, we predicted a total of 32 genes as miRNA targets (Table S2). The putative target genes appear to be involved in various biological processes. However, since the *E. histolytica* genome is not fully annotated and a great proportion of *E. histolytica* protein-coding genes have no known function, it is difficult to draw a conclusion as to whether these miRNA targets have any functional bias.

Our results suggest that miRNA-controlled mechanisms may be involved in human infection of *E. histolytica*. Some of the predicted target genes with annotated functions that we found are involved in gene regulation (zinc finger protein) and signal transduction, such as Ras family GTPase. These proteins have been implicated

in key pathogenic processes of *E. histolytica*. Some Ras and Rho GTPase effectors, particularly kinases such as the PAKs and members of the mitogen-activated protein kinase cascade, have also proven tractable as pharmacological targets in humans [27,28]. However, the importance of Ras effectors and downstream kinases in *E. histolytica* pathogenesis has not yet been explored [29].

The liver is also a prime target for amoeba infection. This organ contains a plentiful source of iron, which is essential for the growth of this parasite. Amoeba trophozoites are able to take up ferritin from the liver and internalize this protein via clathrin-coated vesicles. The capacity to use ferritin as an iron source may explain *E. histolytica*'s high pathogenic potential in the liver [30]. Since clathrin is a protein required for receptor-mediated internalization of lipid and protein molecules, [31,32] its regulation by miRNAs as potential target detected here could help to reduce the pathogenic functions of this parasite in the liver.

Another predicted target, the TolA protein, is involved in the translocation of group A colicins. The colicins are bacterial proteins that are active against *Escherichia coli* and other related species. TolA is anchored to the cytoplasmic membrane by a single membrane-spanning segment near N-terminus, leaving most of the protein exposed to the periplasm [33].

It is noteworthy that one miRNA regulates the unconventional myosin IB protein. The pathogenicity of *E. histolytica* includes its capacity to phagocyte human cells. Motility requires polarization of *E. histolytica* that involves protrusion of a pseudopod containing actin and associated proteins (myosin IB, ABP-120 and a p21-

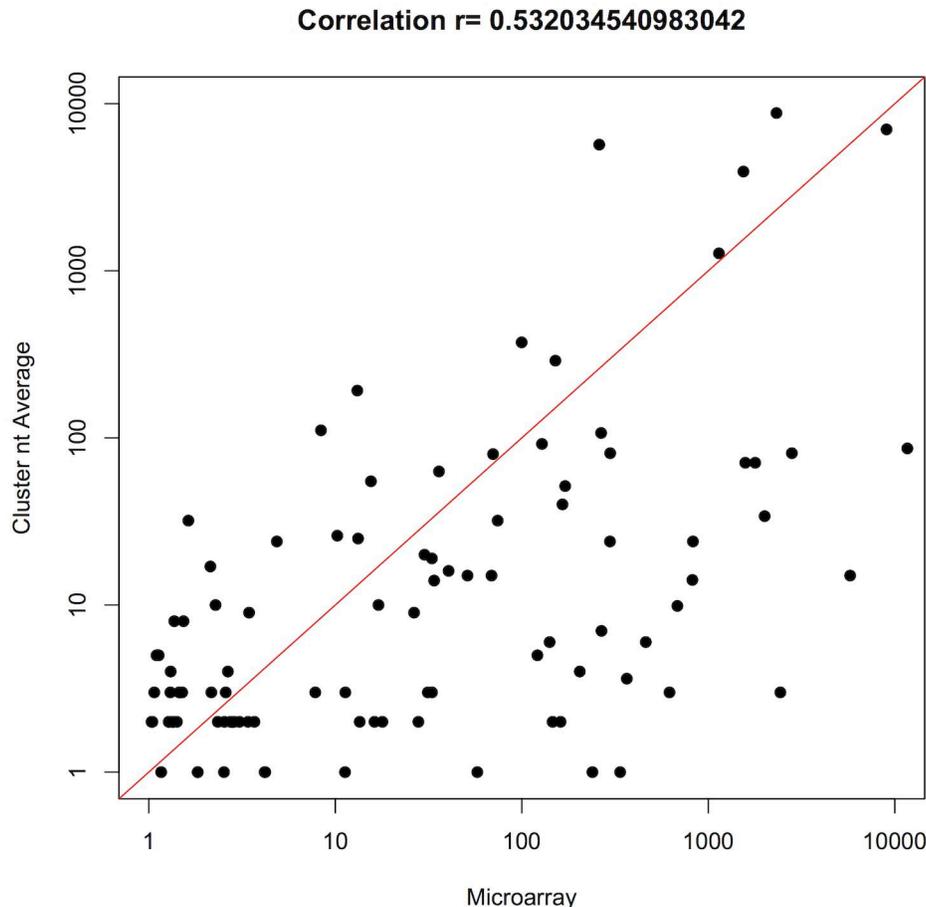


Figure 3. Correlation of cluster nt average vs microarray. The correlation of 0.532 suggesting agreement between expression estimations from the microarray and deep sequencing.
doi:10.1371/journal.pone.0068202.g003

activated kinase [PAK]) and whole-cell propulsion after contraction of the rear of the cell, where myosin II and F-actin are concentrated. An interesting characteristic of *E. histolytica* is the presence of two unique myosins (myosin II and unconventional myosin IB) in contrast to several actin genes. as been proposed that survival and pathogenicity of *E. histolytica* require an active actin-myosin cytoskeleton to cap surface receptors, adhere to host components, migrate through tissues, and phagocyte human cells and liver abscesses [34].

Finally, the recent discovery that miRNAs are present in blood, plasma, serum, and other fluids like urine and saliva, has raised the interest of their use as potential biomarkers and diagnostic tools [35]. The presence of miRNA molecules in those biological fluids is attributed both to their stability and small size. It has also been demonstrated that the majority of miRNAs detectable in serum and saliva are found inside exosomes that could avoid miRNA degradation and serve as transport particles to facilitate miRNA actions in neighboring cells [36].

The presence and relative concentration of specific miRNAs in different biological fluids is related with the tissue, and also with the physiological status of the tissue, resulting in the expression of defined protein expression profiles, as demonstrated for several pathologies [36,37]. This difference could be exploited for the specific diagnosis of defined infectious agents,

by using novel technologies that allow the detection of subpicomolar levels of miRNAs in biological fluids like plasma samples, since these technologies could discriminate single nucleotide differences between miRNA family members [11].

The combination between the characteristics of the miRNAs (presence in biological fluids and thus ease of collection, stability in those samples), and the possibility of differentiating various organisms through their specific miRNA sequences, should raise the interest in the detection of miRNA as diagnostic tools for parasitic diseases, an utility that has been already shown for other diseases [38].

Taking in account all these considerations, detection of microRNAs in *E. histolytica* described in this paper could be used as potential biomarkers in the specific diagnosis of amoebiasis using biological fluids.

In conclusion we identified 199 potential miRNAs by deep sequencing of short RNAs from *Entamoeba histolytica* trophozoites. This study represents the first characterization of miRNA transcriptome in this parasite and could be used as a new platform to study the genomic structure, gene regulation and evolutionary processes of *E. histolytica* as well as host-parasite interactions.

Materials and Methods

Culture of Trophozoites of *Entamoeba histolytica* Strain HM1-IMSS

Trophozoites in log phase of *E. histolytica* strain HM1-IMSS were cultivated (2×10^4 cells/ml) in 18×150 mm borosilicate screw-capped tubes containing 20 mL of TYI-S-33 medium [39], 4.0 mL bovine serum (bovine serum sterilized by gamma radiation at 2 mrad), and 0.2 mL antibiotic mixture (50,000 IU penicillin/ml and streptomycin 50 mg/ml) and incubated at 37°C for four days. The tubes were cooled at 4°C for 20 minutes and then centrifuged at 978 *g* for 10 min at room temperature, the TYI-S-33 medium was eliminated and the pellet was washed three times with PBS pH 7.4.

RNA Extraction

We isolated total RNA that contained small RNA from 25 mg of cells using miRNAeasy kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's protocol. RNA was eluted with 50 µL of RNase free water. We quantified the concentration of all RNA samples using NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

Sequencing and Analysis of *E. Histolytica* miRNAs

miRNAs were sequenced by LC Sciences (Houston, TX). In brief, small RNA fraction of 15–50 nt from trophozoites of *E. histolytica* total RNA was isolated from a 15% Tris-Borate-EDTA-Urea polyacrylamide gel. Following ligations of the small RNAs with adaptors (Illumina, San Diego, CA), the 64–99-nt-long RNAs were isolated through gel elution and ethanol precipitation. A small RNA library was generated using the Illumina Truseq™ Small RNA Preparation kit according to the manufacturer's guidelines. The purified cDNA library was used for cluster generation on Illumina's Cluster Station and then sequenced on Illumina GAIIx following vendor's instructions. Raw sequencing reads (40 nt) were obtained using Illumina's Sequencing Control Studio software version 2.8 (SCS v2.8) following real-time sequencing image analysis and base-calling by Illumina's Real-Time Analysis version 1.8.70 (RTA v1.8.70). Sequencing data analysis was performed by proprietary pipeline script, ACGT101-miR v4.2 (LC Sciences) [21,22,40].

Identification of Putative miRNAs

We used the following criteria to identify potential miRNAs: (1) reads mapped to an inferred RNA hairpin with pairing characteristics of known miRNA hairpins; (2) the seed sequence is similar to known miRNAs from other species (miRBase release 18.0) [12]; and (3) the RNA was not mapped to a genomic region with an annotation suggesting a non-miRNA biogenesis [19,20,41]. For this, we used a proprietary pipeline script, ACGT101-miR v4.2 (LC Sciences, Houston, TX, USA), to predict novel miRNAs [21,22]. The complete genome of *Entamoeba histolytica* (<http://amoebadb.org>) was used as reference for annotation of *Entamoeba histolytica* miRNAs. All clean reads were mapped using several databases including GenBank, Rfam, animal miRNAs (miRBase) and Rепbase.

Paraflo™ MicroRNA Microarray Assay

Microarray assay was performed using LC Sciences. The assay started from a 4-to-8-µg total RNA sample whose 3' was extended with a poly(A) tail using poly(A) polymerase. An oligonucleotide tag was then ligated to the poly(A) tail for later fluorescent dyeing. Hybridization was performed overnight on a µParaflo microfluidic

chip using a micro-circulation pump (Atactic Technologies) [42]. On the microfluidic chip, each detection probe consisted of a chemically modified nucleotide coding segment complementary to target microRNA (from miRBase, <http://mirbase.org>) or other RNA (control or customer defined sequences) and a spacer segment of polyethylene glycol to extend the coding segment away from the substrate. The detection probes were made by *in situ* synthesis using PGR (photogenerated reagent) chemistry. The hybridization melting temperatures were balanced by chemical modifications of the detection probes. Hybridization used 100 µL 6xSSPE buffer (0.90 M NaCl, 60 mM Na₂HPO₄, 6 mM EDTA, pH 6.8) containing 25% formamide at 34°C. After RNA hybridization, tag-conjugating Cy3 dye was circulated through the microfluidic chip for staining. Fluorescence images were collected using a laser scanner (GenePix 4000B, Molecular Device) and digitized using Array-Pro image analysis software (Media Cybernetics). Data were analyzed by first subtracting the background and then normalizing the signals using a LOWESS filter (Locally-weighted Regression) [43].

Real Time PCR

We used SYBR green PCR assay. In brief, 500 ng of *Entamoeba histolytica* RNA was polyadenylated and reverse transcribed to cDNA using the High-Specificity miRNA QPCR Core reagent kit from Agilent. Real-time PCR was performed on the Stratagene Mx3005P real-time PCR system. The miRNA-specific forward primer sequences were designed based on the miRNA sequences obtained from this work. The miRNA-specific primer sequences for Real Time PCR are listed in Table S3. Each sample was run in duplicates for analysis.

Supporting Information

Figure S1 Data analysis flowchart. Sequencing data analysis was performed by proprietary pipeline script, ACGT101-miR v4.2 from LC Sciences. (TIF)

Figure S2 Pie plot of database mapping. Number of mappable reads for each group. (TIF)

Figure S3 Amplification plot of Real Time PCR. The results suggest that 9 out of 10 RT-PCR runs showed a level of amplification validating the presence of these candidate miRNAs. (TIF)

Table S1
(XLSX)

Table S2
(DOC)

Table S3
(DOC)

Acknowledgments

We thank Alejandra Arreola-Triana for editorial review of this article.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FMA. Performed the experiments: JSH MTG MBG. Analyzed the data: VT FMA. Contributed reagents/materials/analysis tools: EMR JTN JVM MMV DRP. Wrote the paper: FMA VT DRP.

References

- Duggal P, Haque R, Roy S, Mondal D, Sack RB, et al. (2004) Influence of human leukocyte antigen class II alleles on susceptibility to *Entamoeba histolytica* infection in Bangladeshi children. *J Infect Dis* 189: 520–526.
- Ali IK, Mondal U, Roy S, Haque R, Petri WA Jr, et al. (2007) Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 45: 285–289.
- Mondal D, Petri WA Jr, Sack RB, Kirkpatrick BD, Haque R (2006) *Entamoeba histolytica*-associated diarrheal illness is negatively associated with the growth of preschool children: evidence from a prospective study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100: 1032–1038.
- Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr (2003) Amebiasis. *N Engl J Med* 348: 1565–1573.
- Houpt ER, Glembocki DJ, Obrigg TG, Moskaluk CA, Lockhart LA, et al. (2002) The mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4+ T cells. *J Immunol* 169: 4496–4503.
- Finnegan EF, Pasquinelli AE (2012) MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol*.
- Zhang H, Ehrenkaufer GM, Pompey JM, Hackney JA, Singh U (2008) Small RNAs with 5'-polyphosphate termini associate with a Piwi-related protein and regulate gene expression in the single-celled eukaryote *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog* 4: e1000219.
- Zhang H, Pompey JM, Singh U (2011) RNA interference in *Entamoeba histolytica*: implications for parasite biology and gene silencing. *Future Microbiol* 6: 103–117.
- De S, Pal D, Ghosh SK (2006) *Entamoeba histolytica*: computational identification of putative microRNA candidates. *Exp Parasitol* 113: 239–243.
- Grimson A, Srivastava M, Fahey B, Woodcroft BJ, Chiang HR, et al. (2008) Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* 455: 1193–1197.
- Manzano-Roman R, Siles-Lucas M (2012) MicroRNAs in parasitic diseases: potential for diagnosis and targeting. *Mol Biochem Parasitol* 186: 81–86.
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34: D140–144.
- Bonnet E, Wuyts J, Rouze P, Van de Peer Y (2004) Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics* 20: 2911–2917.
- Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, et al. (2003) MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* 5: R1.
- John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, et al. (2004) Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2: e363.
- Wei Y, Chen S, Yang P, Ma Z, Kang L (2009) Characterization and comparative profiling of the small RNA transcriptomes in two phases of locust. *Genome Biol* 10: R6.
- Huang J, Hao P, Chen H, Hu W, Yan Q, et al. (2009) Genome-wide identification of *Schistosoma japonicum* microRNAs using a deep-sequencing approach. *PLoS One* 4: e8206.
- Zhu Q, Hong A, Sheng N, Zhang X, Matejko A, et al. (2007) microParaflo biochip for nucleic acid and protein analysis. *Methods Mol Biol* 382: 287–312.
- Ruby JG, Jan C, Player C, Axtell MJ, Lee W, et al. (2006) Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell* 127: 1193–1207.
- Ruby JG, Stark A, Johnston WK, Kellis M, Bartel DP, et al. (2007) Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Res* 17: 1850–1864.
- Li M, Xia Y, Gu Y, Zhang K, Lang Q, et al. (2010) MicroRNAome of porcine pre- and postnatal development. *PLoS One* 5: e11541.
- Wei Z, Liu X, Feng T, Chang Y (2011) Novel and conserved microRNAs in Dalian purple urchin (*Strongylocentrotus nudus*) identified by next generation sequencing. *Int J Biol Sci* 7: 180–192.
- Zhao T, Li G, Mi S, Li S, Hannon GJ, et al. (2007) A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes Dev* 21: 1190–1203.
- Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UC, Samuelson J, et al. (2005) The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433: 865–868.
- Aurrecochea C, Heiges M, Wang H, Wang Z, Fischer S, et al. (2007) ApiDB: integrated resources for the apicomplexan bioinformatics resource center. *Nucleic Acids Res Jan;35(Database issue):* D427–30.
- Lu DP, Read RL, Humphreys DT, Battah FM, Martin DI, et al. (2005) PCR-based expression analysis and identification of microRNAs. *J RNAi Gene Silencing* 1: 44–49.
- Rusconi P, Caiola E, Broggin M (2012) RAS/RAF/MEK inhibitors in oncology. *Curr Med Chem* 19: 1164–1176.
- Zhao ZS, Manser E (2010) Do PAKs make good drug targets? *F1000 Biol Rep* 2: 70.
- Bosch DE, Siderovski DP (2013) G protein signaling in the parasite *Entamoeba histolytica*. *Exp Mol Med* 45: e15.
- Lopez-Soto F, Gonzalez-Robles A, Salazar-Villatoro L, Leon-Sicairens N, Pina-Vazquez C, et al. (2009) *Entamoeba histolytica* uses ferritin as an iron source and internalises this protein by means of clathrin-coated vesicles. *Int J Parasitol* 39: 417–426.
- Cupers P, Veithen A, Kiss A, Baudhuin P, Courtoy PJ (1994) Clathrin polymerization is not required for bulk-phase endocytosis in rat fetal fibroblasts. *J Cell Biol* 127: 725–735.
- Puri V, Watanabe R, Singh RD, Dominguez M, Brown JC, et al. (2001) Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways. *J Cell Biol* 154: 535–547.
- Lazzaroni JC, Dubuisson JF, Vianney A (2002) The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the translocation of group A colicins. *Biochimie* 84: 391–397.
- Labruyere E, Guillen N (2006) Host tissue invasion by *Entamoeba histolytica* is powered by motility and phagocytosis. *Arch Med Res* 37: 253–258.
- Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, et al. (2011) MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 8: 467–477.
- Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG (2012) The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One* 7: e30679.
- Wang Y, Zheng D, Tan Q, Wang MX, Gu LQ (2011) Nanopore-based detection of circulating microRNAs in lung cancer patients. *Nat Nanotechnol* 6: 668–674.
- Vaz C, Ahmad HM, Sharma P, Gupta R, Kumar L, et al. (2010) Analysis of microRNA transcriptome by deep sequencing of small RNA libraries of peripheral blood. *BMC Genomics* 11: 288.
- Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC (1978) A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72: 431–432.
- Meyer C, Grey F, Kreklywich CN, Andoh TF, Tirabassi RS, et al. (2011) Cytomegalovirus microRNA expression is tissue specific and is associated with persistence. *J Virol* 85: 378–389.
- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, et al. (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9: 277–279.
- Gao X, Gulari E, Zhou X (2004) In situ synthesis of oligonucleotide microarrays. *Biopolymers* 73: 579–596.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19: 185–193.