

CLONACIÓN Y ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE QUITINA SINTASAS DE *ENTAMOEBEA HISTOLYTICA*

PERFIL DE EXPRESIÓN DURANTE EL ENQUISTAMIENTO

EDUARDO CAMPOS G. *, **, FRANK EBERT*, UTE WILLHOEFT*, SALVADOR SAID F.***, EGBERT TANNICH*



La amibiasis es una enfermedad causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*, se caracteriza por la producción de lesiones en el hígado y el colon de las personas infectadas. *E. histolytica* infecta cerca del 10% de la población mundial y anualmente la amibiasis es causa de 50 millones de casos de colitis o absceso amibiano extraintestinal, y ha provocado la muerte de casi 50,000 personas.¹

En su ciclo de vida, *E. histolytica* presenta dos etapas: el trofozoito y el quiste. Los trofozoitos son las formas vegetativas del parásito y los responsables de las lesiones producidas en los órganos de los enfermos con amibiasis. Los quistes son las formas infectivas y responsables de la transmisión de la enfermedad ya que pueden permanecer viables por períodos relativamente largos (hasta 14 días), en un amplio rango de condiciones medio-ambientales adversas.² En *E. invadens*, un protozooario patógeno de reptiles, se ha demostrado que el componente mayoritario de la pared de los quistes es

quitina y se sugiere que las paredes de quistes naturales de *E. histolytica* y *E. coli* también.³

La quitina es un polímero lineal formado por pares de N-acetilglucosamina unidas por enlaces β 1 \rightarrow 4 (N, N' diacetilquitobiosa) cuya síntesis es catalizada por quitina sintasas (UDP-GlcNAc:chitin 4- β -N-acetylglucosaminyl-transferase, EC 2.4.1.16) que requieren la presencia de cationes divalentes (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}) y GlcNAc como activador los trofozoitos de *E. histolytica* se cultivan en medio suplementado con Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} , se forman estructuras con características similares a las de los quistes⁴ que además presentan un mayor contenido de GlcNAc que los trofozoitos.⁵ Estas evidencias sugieren que se induce a un proceso de diferenciación celular y las estructuras resultantes son capaces de sintetizar un polisacárido (presumiblemente quitina) rico en GlcNAc, lo cual implica la presencia de una o varias quitina sintasas.

Debido a que la quitina es muy abundante en artrópodos, insectos, hongos y protozoarios, pero

□ El presente artículo está basado en la investigación «Clonación y análisis de la estructura primaria de quitina sintasas de *Entamoeba histolytica*: Perfil de expresión durante el enquistamiento», galardonada con el Premio de Investigación UANL 2004 en la categoría de Ciencias Naturales, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre de 2005.

* Departamento de Parasitología Molecular, Instituto de Medicina Tropical Bernhard Nocht, Hamburgo, Alemania.

** Facultad de Salud Pública y Nutrición, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

*** Departamento Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, México.

está ausente en plantas y mamíferos, las quitina sintasas son un blanco atractivo en el desarrollo de drogas antiparasitarias.^{6,7} Las quitina sintasas de *E. histolytica*, por lo tanto, son moléculas muy dignas de estudiarse, porque un compuesto efectivo e inocuo capaz de inhibir la actividad de estas enzimas podría interrumpir el ciclo biológico del parásito.

Los objetivos del presente trabajo fueron clonar y secuenciar los genes (EhCHS) que codifican para las quitina sintasas de *E. histolytica*, analizar y comparar la estructura primaria de éstas en el género *Entamoeba*, así como el patrón de expresión de los genes responsables de la síntesis, usando como modelo de enquistamiento al protozoo parásito de reptiles *E. invadens*.

Metodología

Cultivos, enquistamiento y obtención del material genético de *E. histolytica*

Los cultivos amibianos se mantuvieron en el medio TYI-S-33.⁸ Los cultivos se realizaron en botellas de polipropileno para cultivo de tejidos de 70 ml de capacidad (o de 250 ml de capacidad, para la obtención de grandes cantidades de biomasa). El proceso de enquistamiento de *E. histolytica* (cepa HM-1) se hizo de acuerdo al método descrito por Campos-Góngora *et al.*,⁴ en medio TYI-S-33 suplementado con MgCl₂, MnCl₂ y CoCl₂ a una concentración final en el medio de 4, 10 y 10 mM, respectivamente. El enquistamiento de *E. invadens* (cepa IP-1) se hizo en medio LG (Low-Glucose) con el método descrito por Vázquezdelara-Cisneros *et al.*⁹ Para los ensayos de Northern blot y de transcripción reversa, la extracción del ARN de los cultivos en proceso de enquistamiento se realizó a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas después de iniciado el proceso.

La extracción de ADN genómico se hizo con el Kit «Easy DNA» (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la extracción del ARN se empleó el agente TRIZOL de acuerdo con las instrucciones del proveedor (GIBCO BRL).

Amplificación de fragmentos correspondientes a genes EhCHS

El alineamiento de las secuencias de ChS obtenidas en las páginas de internet del GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/nucleotide.html y www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/protein.html, se hizo

con ayuda de los programas ClustalW (EMBL) y BLAST (NCBI); se identificaron las regiones consenso de las proteínas y sobre éstas se diseñaron oligonucleótidos degenerados, tomando en cuenta el uso preferencial de codones en el género *Entamoeba*.¹⁰ Se amplificó por PCR sobre el ADN genómico de *E. histolytica* y los productos obtenidos se clonaron en el vector PCR^R 2.1 TOPO (TOPO™ TA Cloning® Kit) con la posterior transformación de células de *E. coli* para facilitar la determinación de su secuencia, la cual se realizó con ayuda de un secuenciador de ADN ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer). El análisis de las secuencias de ADN y aminoácidos obtenidas se hizo con ayuda del programa computacional DNA-SYS y la comparación de las secuencias con el programa BLAST.

Clonación de los genes EhCHS de *E. histolytica*

Una vez conocida la homología de los fragmentos clonados, se emplearon como sonda (marcados con α³²P dATP) para el tamizaje de una biblioteca de ADN de *E. histolytica* construida en el bacteriófago λ ZAP (ZAP Express^α Predigested Vector Kit de Stratagene). La cepa hospedadora del bacteriófago fue la cepa XL1-Blue MRF' de *E. coli*. La secuencia completa de los insertos en las clonas de λ ZAP seleccionadas se determinó por medio de la secuenciación con oligonucleótidos diseñados sobre los extremos de las nuevas secuencias determinadas, o haciendo PCR anidados (*nested-PCR*) con la subsecuente clonación y secuenciación de los productos obtenidos.

Identificación de secuencias homólogas de CHS del género *Entamoeba* reportadas en bancos de datos

La búsqueda de secuencias homólogas de CHS de *Entamoeba* en las bases de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), TIGR (www.tigr.org/tdb/e2k1/eha1/) y en el Centro Sanger (www.sanger.ac.uk/Projects/E_histolytica/) se hizo con ayuda de los programas BLSTN, BLASTP O TBLASTN.

Hibridación tipo Southern y Northern blot

Para la hibridación se usaron los fragmentos de ADN, obtenidos por PCR marcados con ³²P-dATP en condiciones estándar de hibridación.

Resultados

Amplificación de fragmentos correspondientes a CHS de *E. histolytica*

Se identificaron cinco regiones conservadas al nivel de aminoácidos y sobre éstas se diseñaron ocho oligonucleótidos degenerados (tabla I). Como producto de la amplificación por PCR se obtuvieron dos fragmentos: uno de 365 pb y otro de 543 pb, los cuales se clonaron y se determinó su secuencia.

El análisis mostró que las secuencias determinadas son contiguas en el ADN genómico de *E. histolytica*, y que presentan una región de traslape correspondiente a la secuencia que codifica para el dominio QRRRW. Dicha secuencia tiene una homología relativamente alta (43 a 53%, al nivel de Aa) con las secuencias de los genes de CHS de otras especies reportadas en los bancos de datos.

Tamizaje de la biblioteca de ADN de *E. histolytica* y secuenciación del gen EhCHS1

Para obtener la secuencia completa del gen, se realizó el tamizaje de una biblioteca de ADN de *E. histolytica* construida en el bacteriófago I ZAP. Empleando como sonda el fragmento de 543 pb, se obtuvieron tres clonas que se secuenciaron. Debido a que en estas secuencias no se encontró el codón de inicio del gen, se realizó otro tamizaje de la biblioteca usando como sonda un fragmento de 200 pb

correspondiente a la región 5' del fragmento de ADN de 365 pb, amplificado previamente y que se obtuvo digiriendo dicho fragmento con la enzima *Sau* 3A. Se aisló una clona y se determinó la secuencia de nucleótidos del inserto de ADN. En la región 3' de esta secuencia se identificó el codón de inicio del gen de la presunta quitina sintasa de *E. histolytica*.

La secuencia completa de ambas clonas representa un fragmento de 7940 pb. En la figura 1A se muestra el locus ocupado por el gen de la quitina sintasa (1900 pb) en el genoma de *E. histolytica*; también se identificaron los marcos de lectura abiertos (ORF) de los genes vecinos al gen EhCHS1 en dicho locus.

Con la hibridación sobre ADN de *E. histolytica*

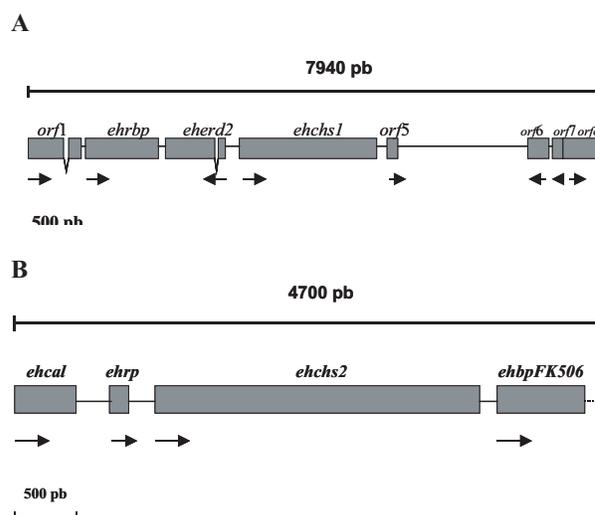


Fig. 1. Representación esquemática de las regiones ocupadas por los genes que codifican para las quitina sintasas EhChS-1 (A) y EhChS-2 (B). Las regiones codificantes están representadas por cuadros grises y la orientación de los marcos de lectura abiertos (ORFs) está indicada por flechas. Los espacios conectados indican la posición de intrones. La asignación de los genes se hizo con base en la homología de la secuencia deducida del ADN a la secuencia de proteínas conocidas en las bases de datos. A) *orf 1*, ORF de 600 pb; *rbp*, Proteína B de unión a ARN; *erd2*, receptor KDEL/HDEL; *chs1*, quitina sintasa; *orf 5*, ORF de 194 pb; *orf 6*, ORF de 371 pb; *orf 7*, ORF de 194 pb; *orf 8*, ORF de más de 472 pb. Los ORF numerados no tienen homología significativa con respecto a secuencias de proteínas reportadas en las bases de datos. En (B) *cal*, calmodulina; *rp*, proteína ribosomal L39; *chs2*, quitina sintasa; *bpFK506*, proteína de unión FK506.

Tabla I. Secuencia de los oligonucleótidos degenerados, diseñados sobre secuencias conservadas de genes CHS.

Primer*	Sec. consenso**	Sec. de nucleótidos***
P1 (s16)	GxACG	TWGGAGSWGWCWTGTGG
P2 (s14)	PGxFS	CCAGGAKSTTTYWS
P3 (s17)	EDRxLx	GAAGATAGAWKKYTWWS
P4 (as17)	EDRxLx	SWWARMWWTCTATCTTC
P5 (s15)	QRRRW	CAAAGAAGAAGATGG
P6 (as15)	QRRRW	CCATCTTCTCTTTG
P7 (s17)	DxSWGt	GATNTTWSWTGGGGAAC
P8 (as17)	DxSWGt	GTTCCCAWSWAANATC

*Entre paréntesis se indica la orientación (s=sense; as=antisense) así como el número de nucleótidos de cada primer. **Secuencia de Aa considerada consenso en las regiones conservadas sobre las cuales se diseñaron los primers. ***En la secuencia de los primers, W, S, K, Y, N, R y M representan la presencia de los nucleótidos siguientes: W = A/T; S = G/C; K = G/T; M = A/C; Y = T/C; R = A/G; N = G/A/T ó C.

digerido con diferentes enzimas de restricción (figura 2B), y utilizando como sonda la secuencia completa del gen (1.9 Kb), se determinó la presencia de un solo gen EhCHS1 en *E. histolytica*.

Tamizaje virtual en TIGR-Bank: identificación de un segundo gen CHS en *E. histolytica*

Empleando como sonda la secuencia del gen EhCHS de 1.9 Kb, se realizó un «Tamizaje virtual» sobre las secuencias de ADN de *E. histolytica* reportadas en el banco de datos de TIGR. Se encontró que las secuencias de algunas clonas presentan una homología del 94 y 99% (tanto en la secuencia aminoacídica como en la nucleotídica), mientras que en otras, la homología va del 44 al 47% con respecto a la secuencia del gen EhCHS1. El análisis y alineamiento de las secuencias de estas clonas permitió obtener un fragmento de 448 Aa que muestra una homología del 42%, con respecto al extremo carboxi-terminal del gen EhCHS1, y una similitud del 45-50% con respecto a las secuencias de CHS de otros organismos.

El diseño de oligonucleótidos específicos sobre

las secuencias de las clonas y sus respectivos extremos complementarios sirvió para amplificar fragmentos correspondientes a este nuevo gen EhCHS2. Para la clonación y secuenciación del gen completo se repitió la estrategia, realizando, de manera secuencial, nuevos tamizajes electrónicos sobre las secuencias reportadas en TIGR.

Análisis del gen EhCHS2 de *E. histolytica*

La secuencia completa del gen EhCHS2 de *E. histolytica* tiene un ORF de 2943 pb (981 Aa). En la secuencia total determinada (4700 pb), se identificaron también los ORF de los genes adyacentes al gen EhCHS2 (figura 1B).

Análisis de la estructura primaria de las EhChS

La secuencia de los genes EhCHS1 y EhCHS2 presentan potenciales ORF de 643 y 981 Aa, respectivamente, con una homología del 23% al nivel de Aa. El análisis de hidrofobicidad (figura 3) de las presuntas proteínas permitió identificar tres regiones: una hidrofóbica hacia el extremo N-terminal,

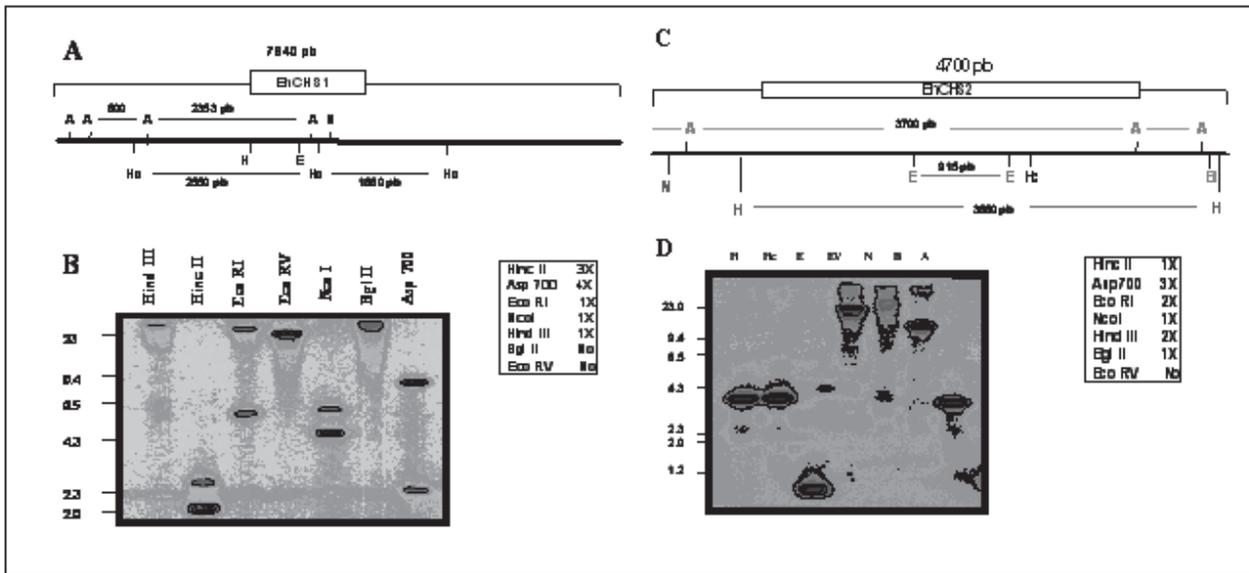


Fig. 2. Análisis tipo Southern blot de los genes EhCHS1 y EhCHS2 de *E. histolytica* y de la región ocupada por éstos. A y C) Representación esquemática de la secuencia total de ADN determinada para cada gen y su vecindad. Se indican los sitios de corte predichos en la secuencia; también se indica el tamaño de los fragmentos esperados en la digestión con cada una de las enzimas. B y D) El ADN genómico de *E. histolytica* (80 µg/línea) se digirió con cada una de las enzimas de restricción Hinc II, Asp 700, Eco RI, Nco I, Hind III, Bgl II y Eco RV. Para la hibridación se usaron los fragmentos de ADN correspondientes a los genes EhCHS1 (1.9 Kb) y EhCHS2 (910 pb correspondientes a la región catalítica) marcados con ³²P. En el lado izquierdo de la imagen se indica (en Kb) el tamaño de los marcadores de talla molecular. En el cuadro de la derecha se indica el número (X) de sitios de corte para cada una de las enzimas. Hc=Hinc II, A=Asp 700, E=Eco RI, N=Nco I y H=Hind III.

una C-terminal que también presenta dominios hidrofóbicos y una región central hidrofílica (aprox. 350 - 400 Aa). Esta última se denomina como la «región catalítica» de las quitina sintasas y comprende la región de mayor homología entre ambas EhChS, y también con respecto a las ChS de otras especies. El análisis computacional revela, además, la presencia de siete y 17 dominios transmembranales para EhCHS1 y EhCHS2, respectivamente. Los dominios representados por las secuencias QxFEY, QRRRW y SWG, que presumiblemente están formando el sitio catalítico de estas enzimas, responsables de la unión al sustrato^{11, 12} están presentes también en las secuencias EhCHS.

Obtención y comparación de las secuencias de CHS de diferentes especies de *Entamoeba*

Para la búsqueda de secuencias de proteínas homólogas en otras especies de *Entamoeba*, las dos secuencias de EhCHS se emplearon para analizar el genoma de *E. dispar* y de *E. invadens* en las bases de datos. Las secuencias genómicas que codifican porciones considerables de proteínas homólogas a EhCHS1 o a EhCHS2 fueron identificadas en ambas especies del género *Entamoeba*. Acorde a la estrecha relación filogenética entre *E. histolytica* y *E. dispar*, la similitud de las dos EhCHS fue más alta con las secuencias correspondientes a *E. dispar* (98.3 y 87.5%, para ChS1 y ChS2, respectivamente) que con las secuencias de *E. invadens* (84.0 y 67.3% para ChS1 y ChS2, respectivamente).

Expresión de ARN de ChS-1 y de ChS-2

Los Northern blots preparados con ARN obtenido de trofozoítos de *E. histolytica*, *E. dispar* o *E. invadens* no mostraron señales cuando la hibridación se hizo usando como sonda fragmentos de ChS-1 o ChS-2 específicas para cada especie. La expresión de ambos genes CHS se incrementó sustancialmente en el enquistamiento *in vitro* de *E. invadens* (datos no mostrados). Tanto el ARN de EiCHS1 como el de EiCHS2 pudo ser detectado cuatro a ocho horas después de la inducción al enquistamiento en medio de cultivo sin glucosa. Posteriormente, durante el siguiente periodo de observación, los niveles de ARN de EiCHS1 permanecieron constantes durante ocho horas más y después empezaron a disminuir, mientras los de EiCHS2 se mantuvieron constantes.

Discusión y conclusiones

Debido a la carencia de un modelo *in vitro* que permita el enquistamiento de *E. histolytica* en condiciones axénicas, no es posible identificar la actividad de las enzimas implicadas en dicho proceso. La estrategia seguida para determinar la presencia de las enzimas responsables de la síntesis de quitina fue la secuenciación de los genes que codifican para estas enzimas, a partir del ADN genómico de *E. histolytica*. Como resultado, en este trabajo se describen las secuencias de dos genes (EhCHS1 y EhCHS2) que reúnen las características y requerimientos necesarios para ser considerados como los genes que

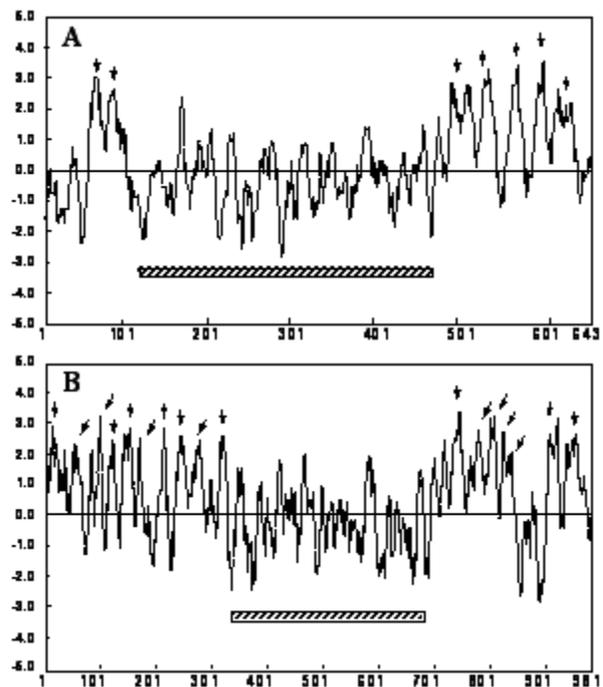


Fig. 3. Perfil de hidrofobicidad de las presuntas quitina sintasas de *E. histolytica* codificadas por los genes EhCHS1 (A) y EhCHS2 (B). Las gráficas muestran los resultados del análisis que se hizo con ayuda del programa computacional Kyte and Doolittle (Software DNASIS). Las flechas indican los picos identificados como dominios transmembranales. La línea media en cada gráfica marca el límite entre la zona hidrofóbica (números positivos) y la zona hidrofílica (números negativos). Los números debajo de cada gráfica representan la posición de los aminoácidos para cada proteína. Las barras sombreadas con líneas diagonales representan la región central hidrofílica de las proteínas (aprox. 400 Aa), conocida como el «dominio catalítico» de las quitina sintasas.

codifican para las quitina sintasas en el protozoario patógeno *E. histolytica*.

Dos genes EhCHS en el genoma de *E. histolytica*

En numerosos estudios se ha demostrado la presencia de tres o más genes responsables de la síntesis de quitina. En el género *Entamoeba*, se ha descrito la actividad de dos formas de quitina sintasa.¹³ En este trabajo se dan fuertes evidencias de la presencia de dos genes CHS en *E. histolytica*: patrones de hibridación diferentes para cada gen EhCHS, presencia de secuencias diferentes que flanquean a uno y a otro gen; presencia de dos genes CHS en otras especies de *Entamoeba*. Además, los resultados negativos de posteriores «tamizajes electrónicos» del banco de datos TIGR-*Entamoeba*, usando como sonda las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de los genes EhCHS1 y EhCHS2, son evidencias que permiten predecir la presencia de sólo dos genes EhCHS en el genoma de *E. histolytica*.

Estructura de las quitina sintasas de *Entamoeba*

En la región central hidrofílica de las EhChS se identificaron los dominios estructurales característicos de las ChS, y se determinó que los residuos que conforman las regiones conservadas EDR, QRRRW¹¹ y WGT¹² identificados por medio de análisis mutacional como esenciales para la actividad de quitina sintasa en *Saccharomyces cerevisiae* (ScChS2), están conservados en ambas proteínas EhChS y en las presuntas ChS de *E. dispar* y de *E. invadens*. Por otra parte, la presencia de segmentos transmembranales en los extremos N- y C-terminal sugiere fuertemente que las ChS de *E. histolytica* son proteínas integrales de membrana.

Expresión de CHS-RNA en trofozoítos de *E. invadens* inducidos al enquistamiento

La expresión de ambos genes de quitina sintasa (EiCHS1 y EiCHS2) de *E. invadens* pudo ser determinada cuando se usaron como sonda los fragmentos correspondientes específicos de esta especie, observándose un incremento sustancial en la cantidad de mRNA durante las primeras horas, en proporción directa al tiempo de inducción al enquistamiento, con caída en los niveles de expresión después de 16 a 24 horas de la inducción, hasta no observarse ninguna señal a las 48 horas, tiempo en

el cual la mayoría de trofozoítos han alcanzado su diferenciación.

La presencia de dos genes (EhCHS1 y EhCHS2) que presumiblemente codifican para quitina sintasas en *E. histolytica* y en las especies relacionadas *E. dispar* y *E. invadens* constituyen el primer reporte de estas enzimas en protozoarios patógenos. El conocimiento de los genes que codifican para las quitina sintasas de *E. histolytica* representa un punto más de apoyo para que estas enzimas sean consideradas como blancos para el diseño de drogas específicas que permitan inhibir su actividad y, por lo tanto, bloquear el enquistamiento del parásito.

Resumen

Entamoeba histolytica, parásito responsable de la amebiasis, presenta dos etapas en su ciclo de vida: trofozoito y quiste. Los quistes (forma infectiva) poseen una pared compuesta principalmente por quitina, polímero de β -(1 \rightarrow 4)-N-acetil-D-glucosamina cuya síntesis es catalizada por quitina sintasas (CHS). Las CHS se han descrito en hongos, insectos y nemátodos, pero no en protozoarios como *Entamoeba*. Se clonaron y secuenciaron dos genes CHS de *E. histolytica*. Se determinó que ambas EhCHS contienen segmentos transmembranales en sus extremos, y que la mayor similitud está restringida a la «región catalítica»; los aminoácidos importantes para la actividad de CHS están completamente conservados en ambas EhCHS

Palabras clave: Quitina sintasas, Genes CHS, *Entamoeba*, Enquistamiento, Síntesis de quitina.

Abstract

Entamoeba histolytica, causal agent of amebiasis, presents two stages in his life cycle: trophozoite and cyst. The cysts (infective form) have a wall whose main component is chitin, a polymer of β -1-4 linked N-acetyl-D-glucosamine, whose synthesis is catalyzed by chitin synthases (CHS). CHS have been described by fungi, insects, and nematodes, but not in protozoa such as *Entamoeba*. Two *E. histolytic* CHS-genes were cloned and sequenced. It was determined that both EhCHS have transmembrane helices in their N- and C-terminal end, and that the major similarity is limited to the "catalytic domain". The amino acid residues important for the CHS activity are conserved in both EhCHS.

Keywords: Chitin Synthase, CHS genes, Entamoeba, Encysting, Chitin synthesis.

Referencias

- Petri Jr WA, Haque R., Lyerly D and Vines RR. Estimating the impact of amebiasis on health. *Parasitol Today*. 2000;16(8):320-321.
- Martínez-Palomo A. Biology of *Entamoeba histolytica*: Cyst differentiation. In *Human Parasitic Diseases: Amebiasis*. Ed by Martínez-Palomo. Elsevier, New York. 1986.
- Arroyo-Begovich A, Carabez-Trejo A and Ruiz-Herrera J. Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens* *J Parasitol*. 1980;66:735.
- Campos-Góngora E, Viader-Salvado J.M., Martínez-Rodríguez H.G., Zúñiga-Charles M.A., Mora Galindo J and Said-Fernández S. Mg, Mn and Co Ions Enhance the formation of *Entamoeba histolytica* Cyst-like Structures Resistant to Sodium Dodecyl Sulfate» *Arch Med Res*. 2000;31:162-168.
- Said-Fernández S., Campos-Góngora E., González-Salazar F., Martínez-Rodríguez H., Vargas-Villarreal J. and Viader Salvado J.M. Mg²⁺, Mn²⁺ and Co²⁺ Stimulate *Entamoeba histolytica* to Produce Chitin-like Material. *J Parasitol*. 2001; 87(4):919-923.
- Cohen E. Chitin Biochemistry: synthesis and inhibition. *Annu Rev Entomol*. 1987; 32:71-93.
- Spindler DK, Spindler-Barth M and Londershausen M. Chitin Metabolism: a target for the drugs against parasites. *Parasitol Res*. 1990;76:283-288.
- Diamond LS, Harlow DR and Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other Entamoeba. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1978; 72:431.
- Vázquezdelara-Cisneros LG and Arroyo-Begovich A. Induction of encystation of *Entamoeba invadens* by removal of glucose from the culture medium. *J Parasitol*. 1984;70: 629-633.
- Tannich E. and Horstmann R.D. Codon Usage in Pathogenic *Entamoeba histolytica*; *J Mol Evol*. 1992; 34:272-273.
- Nagahashi S., Sudoh M., Ono N., Sawada R., Yamaguchi E., Uchida Y., Mio T., Takagi M., Arisawa M. and Yamada-Okabe H. Characterization of Chitin Synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*: Implication of two highly conserved domains as possible catalytic sites. *J Biol Chem*. 1995; 270(23):13961-13967.
- Yabe T., Yamada-Okabe T., Nakajima T., Sudoh M., Arisawa M. and Yamada-Okabe H. Mutational analysis of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of additional amino acid residues involved in its catalytic activity. *Eur J Biochem*. 1998; 258(3):941-947.
- Das S. and Gillin F.D. Chitin synthase in encysting of *Entamoeba invadens*. *Biochem J*. 1991;280:641-647.