



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL**

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

**El complejo ESCRT-II de *Entamoeba histolytica*: identificación y
caracterización de EhVps25 y EhVps36 durante la eritrofagocitosis**

Tesis que presenta

Q.F.B. Mitzi Carolina Díaz Hernández

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

en

Infectómica y Patogénesis Molecular

Directora de Tesis

Dra. María Esther Orozco Orozco

Dra. Guadalupe Miriam Huerta Pérez

Asesores de tesis

Dr. José Luis Rosales Encina

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Ciudad de México

Julio 2017

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. María Esther Orozco Orozco y de la Dra. Guadalupe Miriam Huerta Pérez, en el laboratorio 2 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular de CINVESTAV-IPN.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado a través de una beca para realizar los estudios de Maestría. CVU708564 y matrícula 151220018.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Biología de <i>Entamoeba histolytica</i>	13
1.1.1 Ciclo de vida	13
1.2 Patogenicidad de <i>E. histolytica</i>	19
1.2.1 Adhesión.....	19
1.2.2 Citotoxicidad	20
1.2.3 Fagocitosis	22
1.3 Tráfico vesicular en <i>E. histolytica</i>	23
1.4 Cuerpos multivesiculares y la maquinaria ESCRT	23
1.5 Composición de la maquinaria ESCRT	25
1.5.1 Complejo ESCRT-0	28
1.5.2 Complejo ESCRT-I	28
1.5.3 Complejo ESCRT-II	29
1.5.4 Complejo ESCRT-III	30
1.5.5 La maquinaria ESCRT en <i>E. histolytica</i>	33
1.5.6 ESCRT-II en <i>E. histolytica</i>	50
2 JUSTIFICACIÓN.....	51
3 HIPÓTESIS.....	51
4 OBJETIVOS.....	51
4.1.1 Objetivo general.....	51
4.1.2 Objetivos particulares	51
5 DISEÑO EXPERIMENTAL	53
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
6.1 Análisis in silico	54
6.2 Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	55
6.3 Obtención de péptidos inmunogénicos	55
6.4 Producción de anticuerpos.....	55
6.5 Ensayo de eritrofagocitosis	56
6.6 Extracción de ARN total	56

6.7	Cuantificación de los niveles de ARNm de los genes del complejo ESCRT-II mediante RT-qPCR.....	57
6.8	Extracción de proteínas totales	60
6.9	Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) y Western blot.....	60
6.10	Tinción de proteínas con azul de Coomassie.....	61
6.11	Inmunofluorescencia	61
7	RESULTADOS	63
7.1	Análisis in silico	63
7.1.1	Alineamientos de la secuencia	63
7.1.2	Búsqueda de dominios funcionales	70
7.1.3	Análisis de la estructura terciaria del complejo ESCRT-II.....	73
7.1.4	Interacciones proteína-proteína in silico del complejo ESCRT-II	80
7.1.5	SUMOilación en ESCRT-II de <i>E. histolytica</i>	87
7.2	Niveles de ARNm de los genes de la maquinaria ESCRT-II en <i>E. histolytica</i>	98
7.3	Localización y expresión de las proteínas EhVps25 y EhVps36 del complejo ESCRT-II en <i>E. histolytica</i> durante la endocitosis.....	101
7.3.1	Producción de anticuerpos policlonales.....	101
7.3.2	Inmunolocalización	108
8	DISCUSIÓN.....	119
9	CONCLUSIONES	124
	REFERENCIAS.....	125

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.- Estadios biológicos de <i>E. histolytica</i> .	16
Figura 2.- Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .	18
Figura 3.- Interacciones moleculares y composición general de la maquinaria ESCRT.	26
Figura 4.- Niveles de proteínas EhVps25 y EhVp36 durante la eritrofagocitosis.C29	31
Figura 5.- Perfil de expresión de genes correspondientes a proteínas que conforman la maquinaria ESCRT en <i>E. histolytica</i> .	34
Figura 6.- EhTom1 y EhVps23 de <i>E. histolytica</i> durante la eritrofagocitosis.	37
Figura 7.- Detección y localización de la proteína EhVps32 en trofozoítos.	40
Figura 8.- Identificación y localización de EhVps24, EhVps20 y EhVps2.	42
Figura 9.- Localización de EhVps4 en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .	45
Fura 10.- Localización de EhVpsADH112 durante la eritrofagocitosis y asociación con EhVps32.	48
Figura 11.- Alineamiento <i>in silico</i> de las secuencias de EhVps22.	64
Figura 12.- Alineamiento <i>in silico</i> de las secuencias de EhVps25.	67
Figura 13.- Alineamiento <i>in silico</i> de las secuencias de EhVps36 de <i>E. histolytica</i> .	68
Figura 14.- Dominios de EhVps22, EhVps25 y EhVps36 en <i>E. histolytica</i> .	71
Figura 15.- Análisis de la estructura terciaria de EhVps22 de <i>E. histolytica</i> .	74
Figura 16.- Análisis de la estructura terciaria de Vps25 de <i>E. histolytica</i> .	76
Figura 17.- Análisis de la estructura terciaria de Vps36 de <i>E. histolytica</i> .	78
Figura 18.- Análisis de interacción <i>in silico</i> para EhVps22	81
Figura 19.- Análisis de interacción <i>in silico</i> para EhVps25	83
Figura 20.- Análisis de interacción <i>in silico</i> para EhVps36	85
Figura 21.- Sitios de SUMOilación y sitios SIMs en la maquinaria ESCRT de <i>E. histolytica</i> .	91
Figura 22.- Modelo hipotético de interacción del ESCRT-II con complejos ESCRT-I y ESCRT-II de la maquinaria ESCRT en <i>E. histolytica</i> .	94
Figura 23.- Expresión relativa de los genes de la maquinaria ESCRT-II durante la eritrofagocitosis en <i>E. histolytica</i>	97
Figura 24.- Diseño de péptido de EhVps25.	100
Figura 25.- Diseño de péptido de EhVps36.	102
Figura 26 Titulación de anticuerpos α -EhVps25 y α -EhVps36.	104
Figura 27.- Inmunolocalización de proteína EhVps25 durante la eritrofagocitosis.	113
Figura 28.- Inmunolocalización de proteína EhVps36 durante la eritrofagocitosis.	115
Figura 29.- Niveles de proteína EhVps25 durante la eritrofagocitosis.	118
Figura 30.- Niveles de proteínas EhVps36 durante la eritrofagocitosis	120

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.- Iniciadores para RT-qPCR de los genes de la maquinaria ESCRT-II en <i>E. histolytica</i> .	58
Tabla 2.- Análisis de SUMOilación y sitios SIM en la maquinaria ESCRT de <i>E. histolytica</i> .	89
Tabla 3.- Comparación de los sitios de ubiquitinación y SUMOilación en las proteínas de la maquinaria ESCRT.	94

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CP	Cisteína proteasa
DAPI	Diclorohidrato de 4', 6-diamidino-fenilindol
dNTPs	Desoxinucleotidos trifosfato
ESCRT	Del inglés <i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
Fig	Figura
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
h	Hora
IPTG	Isopropil- β -D-tio-galactósido
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar
mA	Miliamperes
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MVB	Cuerpos multivesiculares, del inglés <i>Multivesicular Bodies</i>
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHMB	Para-hidroxi-meruribenzoato
RT	Retrotranscriptasa

s	Segundo
SDS	Duodecilsulfato sódico
T_m	Temperatura de alineamiento
Vps	Del inglés <i>Vacuolar protein sorting</i>
xg	Gravedades
μl	Microlitros

RESUMEN

Entamoeba histolytica es un protozoario con una tasa alta de fagocitosis, uno de sus principales mecanismos de virulencia. En la fagocitosis participa el tráfico vesicular que involucra la formación de cuerpos multivesiculares (MVBs) y vesículas intraluminales (ILVs). A su vez, la generación de estas estructuras se lleva a cabo por complejos multiproteicos conocidos como maquinaria ESCRT (del inglés *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*). Por lo tanto, la maquinaria ESCRT participa en el evento de fagocitosis. La maquinaria ESCRT está formada por los complejos ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III (formados a su vez por las proteínas Vps, del inglés *Vacuolar Protein Sorting*) y proteínas accesorias. En *E. histolytica* se han estudiado algunas Vps's de los complejos ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-III y las proteínas accesorias EhADH112 y EhVps4 ATPasa. Sin embargo, no se ha estudiado el complejo ESCRT-II formado por las proteínas: Vps22, Vps25 y Vps36, descritas en otros eucariontes. En el complejo ESCRT-II de *Homo sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae*, EhVps25 y EhVps36 interactúan con otras proteínas de los complejos ESCRT, con lípidos de membrana, ubiquitina, proteínas cargo, y proteínas de los complejos ESCRT-I y ESCRT-III. Por lo que la función principal de estas proteínas es ser el vínculo entre el ESCRT-I y el ESCRT-III, además de iniciar la activación de este último complejo. Para estudiar el papel de EhVps25 y EhVps36 en la fagocitosis, en este trabajo se analizó la expresión y localización de ambas proteínas tanto en condiciones basales como durante la eritrofagocitosis. Mediante análisis *in silico* se compararon las estructuras secundarias y terciarias de EhVps22, EhVps25 y

EhVps36 con las de sus ortólogos en humano y en levadura. Los resultados mostraron que las proteínas de amiba cuentan con una estructura secundaria y terciaria similar a las proteínas de humano y de levadura. Se produjeron anticuerpos policlonales específicos contra EhVps25 y EhVps36 para estudiar su localización por microscopía confocal. Las imágenes obtenidas mostraron que las dos proteínas cambian su localización durante la fagocitosis ya que, en condiciones basales se encuentran en el citoplasma y ante el estímulo de la fagocitosis se relocalizan hacia membrana, bocas fagocíticas y fagosomas, además, ambas proteínas se localizaron en el núcleo. Los ensayos de RT-qPCR mostraron que la tasa de transcripción de los genes *ehvps25* y *ehvps36* cambia ligeramente a lo largo de este evento. En resumen, estos cambios evidencian que las proteínas EhVps25 y EhVps36 en amiba podrían participar en la fagocitosis. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para elucidar con mayor exactitud cual es su función.

ABSTRACT

Entamoeba histolytica is a protozoan with a high rate of phagocytosis, one of the main virulence mechanisms of this parasite. Phagocytosis is the ingestion of particles larger than 250µm, including cells. In phagocytosis participates the mechanism and molecules related with the machinery ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) and the formation of multivesicular bodies (MVBs). The ESCRT machinery is formed by the ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III complexes, which are composed by Vps (Vacuolar Protein Sorting) proteins and accessory proteins. In *E. histolytica* has been studied some proteins of ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-III complexes and accessory proteins such as EhADH and EhVps4 ATPase. However, it has not been studied the proteins of the ESCRT-II complex: Vps22, Vps25 and Vps36. *Homo sapiens* and *Saccharomyces cerevisiae* Vps25 and Vps36 proteins interact with other proteins of the ESCRT complexes, membrane lipids, ubiquitin, and cargo proteins. In this work, we analyzed the expression and localization of Vps25 and Vps36 proteins in *E. histolytica* during erythrophagocytosis. By *In silico* analysis, we compared the secondary and tertiary structures of EhVps25 and EhVps36 against their human orthologous. The results evidenced that ameba proteins maintain nearly the secondary and tertiary structure of the human orthologues. Using specific antibodies against EhVps25 and EhVps36, both produced in this project, we observed that these proteins changed their localization from cytoplasm to nucleus, phagosomes, and plasma membrane after the erythrophagocytosis stimulus. The protein levels were slightly modified during this event. The RT-qPCR assays show that the transcription rate of *ehvps25* and *ehvps36* genes changed slightly along the erythrophagocytosis. In summary, the presence of EhVps25 and EhVps36 proteins in ameba could be related to phagocytosis. Further experiments will be performed to elucidate with higher precision the mechanisms involved in the participation of ESCRT-II complex in the phagocytosis of *E. histolytica*.

1 INTRODUCCIÓN

La disentería amibiana es causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*, el cual infecta aproximadamente 50 millones de individuos y provoca entre 40,000 y 100,000 muertes al año (WHO, 1985). A pesar de que se conocen datos estadísticos del número de personas infectadas con *E. histolytica*, hay un sesgo en esta información debido a que los métodos de diagnóstico son poco sensibles para identificar al parásito y este suele confundirse con ciertas especies no patogénicas como *E. dispar* y *E. moshkovski* (Ali et al., 2003; Diamond and Clark, 1993). Además, entre el 80-90% de los individuos que se encuentran infectados son asintomáticos, lo que representa un foco de infección y un gran problema para la salud pública a nivel mundial (Ali et al., 2008; Gathiram and Jackson, 1987; WHO, 1985; Ximenez et al., 2009).

En México, la amibiasis ocupa el quinto lugar entre las causas de enfermedades infecciosas (Haque et al., 2003b; Stanley, 2003; Ximenez et al., 2009). A pesar de que la tasa de mortalidad ha disminuido en los últimos años, gracias al empleo de fármacos como el metronidazol, existen estudios serológicos que reportan que un 8.4 % de la población mexicana tiene anticuerpos contra *E. histolytica*, indicando una alta exposición al parásito (Caballero-Salcedo et al., 1994). En 2007 Ximénez y col. reportaron que entre 1995 y 2006, la tasa de morbilidad de amibiasis intestinal fue de 1,000 a 5,000 casos por cada 100,000 habitantes. Esto, junto con los datos de pacientes asintomáticos hacen que el panorama sea preocupante (Ximenez et al., 2009). Es por ello que realizar investigaciones y análisis sobre los signos, los síntomas, los mecanismos de patogénesis y la búsqueda de moléculas blanco en el parásito es importante para mejorar el diagnóstico y el tratamiento contra esta enfermedad (Christy and Petri, 2011; Mora Galindo et al., 1978).

Cómo se dijo anteriormente, la infección por *E. histolytica* puede ser asintomática o invadir la mucosa intestinal y causar diarrea, colitis amibiana o disentería y también puede producir infección extraintestinal. En el primer caso, no hay molestias para el paciente, pero es importante que sea diagnosticada por que contamina el ambiente y puede infectar a otros individuos. En la infección intestinal amibiana se presenta dolor abdominal, pérdida de peso, diarrea acuosa y sanguinolenta (sangre macroscópica en heces) y fiebre en la mayoría de los casos (Adams and MacLeod, 1977; Aristizabal et al., 1991). Los trofozoítos pueden, además del intestino, invadir el hígado y producir absceso hepático amibiano que ocurre cuando las amibas llegan al hígado por vía portal (Adams and MacLeod, 1977; Haque et al., 1998; Katzenstein et al., 1982) y ésta es una de las complicaciones extraintestinales más frecuentes. También se han reportado casos de absceso en pulmón, cerebro y piel, debido a difusión hematogena del parásito (Haque et al., 2003b).

1.1 Biología de *Entamoeba histolytica*

1.1.1 Ciclo de vida

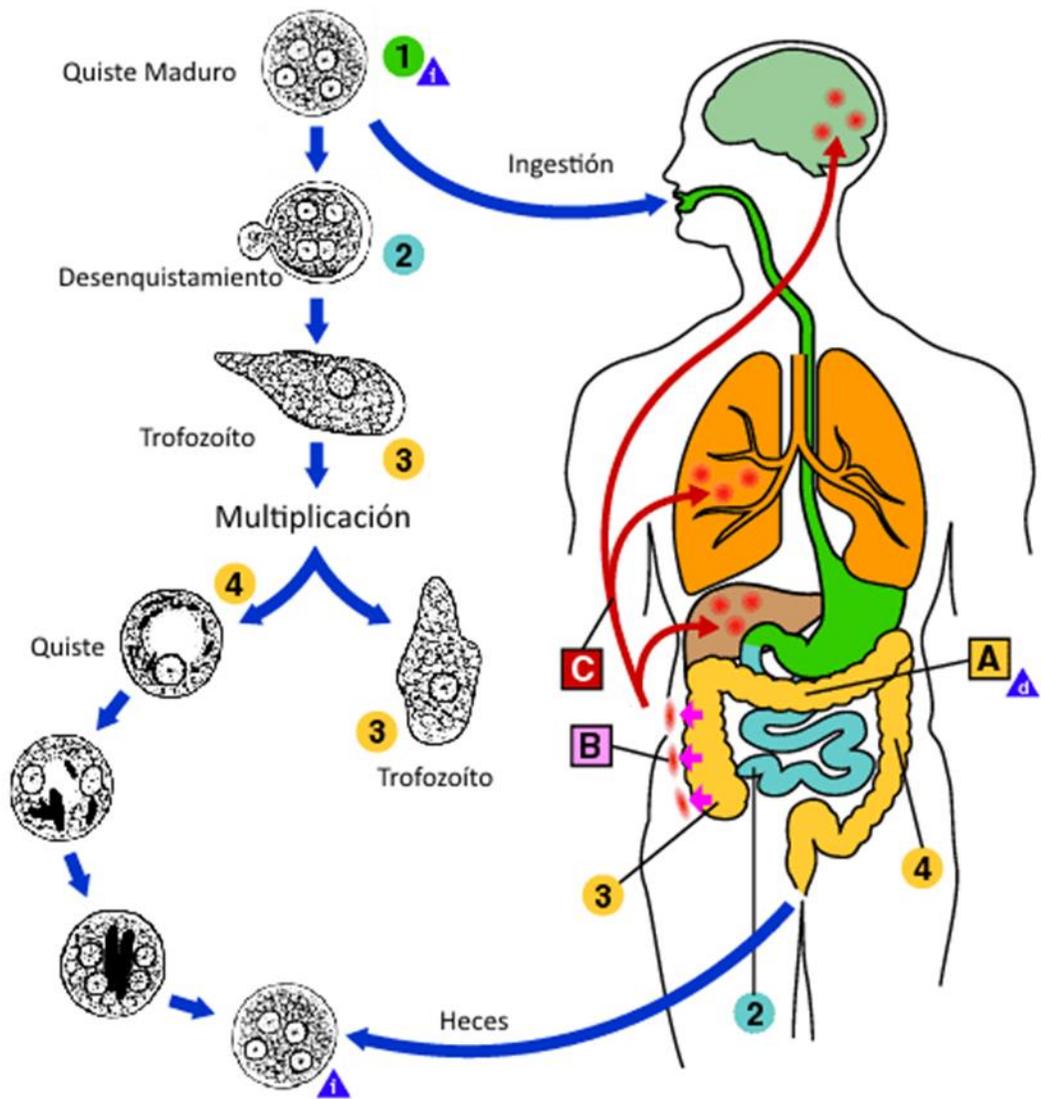
E. histolytica es un protozoario que presenta dos formas en su ciclo vital: quiste y trofozoíto. Los quistes, la forma infectiva de este parásito, son estructuras redondas de 10-16 μm que tienen de 1 a 4 núcleos, poseen una pared gruesa rica en quitina, N-acetil glucosamina ligada $\alpha\beta$ -1-4 (GlcNAc), así como lectinas de unión a quitina como la lectina Jacob2. Los quistes pueden permanecer en el medio ambiente externo durante días, debido a la protección que les brinda la composición de su pared (Figura 2) (Samuelson and Robbins, 2011, Frisardi et al., 2000; Spadafora et al., 2016; Van Dellen et al., 2006).

El trofozoíto, la fase móvil e invasiva, tiene un diámetro de 20-40 μm (Figura 2B), posee movimiento gracias a su ectoplasma que le permite formar pseudópodos. Su citoesqueleto participa activamente en el movimiento. Su núcleo presenta un

cariosoma compacto central y cromatina en gránulos uniformes en tamaño y localización(Haque et al., 2003b; Petri, 2002; Tanyuksel and Petri, 2003).

La infección por *E. histolytica* (Figura 1) ocurre por la ingestión de quistes maduros que se encuentran en alimentos y en agua contaminados con quistes del parásito. Al ser ingeridos es probable que no sobrevivan ya que la cubierta externa del quiste es reblandecida por los jugos gástricos y pancreáticos, sin embargo, cuando algunos de ellos llegan al intestino delgado sufren un proceso de desenquistamiento y surgen ocho trofozoítos que pueden volver a enquistarse o migrar hacia el intestino grueso, donde se multiplican por fisión binaria. En muchos casos, los trofozoítos se mantienen confinados al lumen intestinal (infección no invasiva) de portadores asintomáticos, los cuales liberan los quistes en sus heces. Los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (enfermedad amibiana intestinal) y a través de la corriente sanguínea llegan a sitios extraintestinales como el hígado, el cerebro y el pulmón (enfermedad amibiana extraintestinal), donde producen daños severos(consultado en:(<http://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/pathogen.html>)

Figura 1.- Ciclo de vida de *E. histolytica*. Existen dos fases de este parásito, la fase móvil e invasiva: el trofozoíto, y la fase estacionaria o infectiva: el quiste. Este tipo de parásito es capaz de infectar al ser humano vía fecal-oral, a través de alimentos y/o bebidas contaminadas con quistes, así como la exposición directa con las heces contaminadas durante el contacto sexual (CDC, 2015a; CDC, 2015b)(<http://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/pathogen.html>).



▲ = Forma infectante

- A** = Colonización no invasiva
- B** = Enfermedad intestinal
- C** = Enfermedad extra-intestinal

Figura 2.- Estadios biológicos de *E. histolytica*. A) Quiste de *E. histolytica*. B) Trofozoíto de *E. histolytica*. Flechas negras: núcleos (Haque et al., 2003a).

A



QUISTE

B



TROFOZOÍTO

1.2 Patogenicidad de *E. histolytica*

La patogénesis de *E. histolytica* se evidencia en el daño a tejidos, afectando principalmente al epitelio intestinal grueso y en menor grado al hígado, al pulmón, al cerebro y la piel (Olivos-García y col., 2011). Las lesiones se caracterizan por una zona central de necrosis, con parásitos conservados en la periferia y rodeados por un infiltrado inflamatorio de tipo linfocitario y mononuclear, principalmente (Faust y col., 2011). Los mecanismos moleculares involucrados en el daño a estos tejidos son la adhesión al epitelio colónico, la citotoxicidad hacia células hospederas y la fagocitosis de éstas (Christy and Petri, 2011; Garcia-Rivera *et al.*, 1982; Martinez-Palomo *et al.*, 1985; Ravdin, 1986). A continuación, se describen cada uno de estos eventos:

1.2.1 Adhesión

La adherencia al epitelio intestinal es un requisito para la infección del trofozoito en el medio ambiente del colon, principalmente en sitios que involucran el desarrollo de úlceras amebianas (Anaya-Velazquez *et al.*, 1985). La importancia de este mecanismo fue demostrada *in vitro* a partir de la selección de clones deficientes en adhesión partiendo de una cepa virulenta y se demostró que estas clones tenían un bajo efecto citopático sobre las monocapas de células epiteliales, la fagocitosis de eritrocitos y la virulencia *in vivo* (Rodríguez y Orozco, 1986). Por otro lado, se ha demostrado que al inhibir la adherencia del parásito a su célula blanco también inhibe la patogénesis sobre ésta, lo que sugiere que existen interacciones específicas que median el contacto con la célula del hospedero, y que la adhesión es necesaria para que la fagocitosis y la citólisis se lleven a cabo (Arroyo & Orozco, 1987; Cano-Mancera & Lopez-Revilla, 1987; Hughes *et al.*, 2003). Existen diferentes moléculas que han sido estudiadas por su participación en este mecanismo, entre ellas se encuentran las lectinas, las cuales participan en la adhesión del trofozoito a la mucosa intestinal, epitelio y a las células inflamatorias del huésped. Una de las lectinas más estudiadas es la Gal/GalNac un receptor transmembranal formado por tres subunidades: una subunidad pesada de 170 kDa (Hg), una subunidad ligera de

35 kDa (Lgl) y una subunidad intermedia de 150 kDa (Igl) que se une a residuos de galactosa/N-acetil-galatosamina de la capa de mucina (Allen et al., 1998; Petri et al., 2002; Ravdin y Guerrant, 1981; Ravdin et al., 1985). Además hay evidencia de que esta lectina sirve como un receptor durante la ingestión de eritrocitos (Katz et al., 2002; Petri et al., 1987). También, se ha estudiado una segunda lectina de 220 kDa que es inhibida por oligómeros de N-acetil-glucosamina y se localiza en la superficie de los trofozoitos (Rosales-Encina *et al.*, 1987; Meza *et al.*, 1987).

El complejo EhCPADH112 (Arroyo y Orozco, 1987; García-Rivera y col., 1999), formado por una cisteína proteasa de 49 kDa y una adhesina de 112 kDa (EhADH112), se encuentra en la superficie de los trofozoitos y, al ser bloqueado por anticuerpos monoclonales disminuye la adhesión, la fagocitosis y los efectos citopáticos y citotóxico (Arroyo y Orozco, 1987; García-Rivera et al., 1999; Rodríguez y Orozco, 1986). La EhADH112 se localiza en vacuolas y en membrana plasmática de trofozoitos, y durante la eritrofagocitosis esta proteína se localiza en sitios de contacto focal con entre el trofozoito y el eritrocito (Garcia-Rivera *et al.*, 1997).

1.2.2 Citotoxicidad

La infección por *E. histolytica* tiene resultados variables, pero cuando ocurre la enfermedad invasiva, la actividad citotóxica del parásito es probablemente el mecanismo más implicado en el extenso daño al tejido. El parásito es capaz de provocar la muerte celular de una manera dependiente o independiente del contacto directo con la célula blanco. Su efecto citopático ha sido comprobado al poner contacto trofozoitos con monocapas de células MDCK (del inglés *Madin-Darby Canine Kidney*) (Martinez-Palomo *et al.*, 1985) y CHO (del inglés *Chinese Hamster Ovary*) (Ravdin *et al.*, 1980). Además, *E. histolytica* puede matar e ingerir células del hospedero de una manera dependiente del contacto en minutos. Existen diferentes efectos citotóxicos sobre la célula del huésped como la producción de especies reactivas de oxígeno, la pérdida de integridad de membrana, la fragmentación de ADN, el incremento de calcio, la exposición de fosfatidilserina y la activación de caspasa-3 (Ralston y Petri, 2011).

Dentro de este mecanismo de virulencia participan moléculas citotóxicas como los amebaporos A, B y C (Leippe et al., 1994), las cuales son proteínas formadoras de poros, que tienen una secuencia similar a las proteínas permeabilizadoras de membrana NK-lisina y granulicina en mamíferos. Los amebaporos de *E. histolytica* presentan actividad sobre la membrana plasmática de linfocitos y macrófagos (Young et al., 1982), además, hay evidencia de que la inhibición de la expresión del amebaporo A disminuye la virulencia del parásito (Bracha y col., 1999). La actividad de estas proteínas se ve aumentada en parásitos más patogénicos (Lynch et al., 1982) y contribuye a la formación del absceso hepático amebiano (Andra et al., 2003; Zhang et al., 2004).

Otro mecanismo de citotoxicidad se basa en la secreción de cisteína proteasas (CPs: EhCP-A1, EhCP-A2, EhCP-A5, EhCP-A7 y EhCP112) que sirven no sólo para romper la matriz del epitelio intestinal y lisis de las células blancas (García-Rivera et al., 1999; Irmer et al., 2009; Lushbaugh et al., 1985), sino también como inmunomoduladores del parásito, ya que pueden degradar IgA, quimiocinas y miembros del complemento (García-Nieto et al., 2008; Hou et al., 2010; Pertuz Belloso et al., 2004; Reed et al., 1995; Reed et al., 1989). Los niveles de secreción de estas cisteína proteasas están relacionados directamente con la virulencia del parásito (Reed et al., 1989). La EhCP112, parte del complejo EhCPADH112 descrito previamente, posee un dominio RGD de posible interacción con integrinas celulares, cuenta con una secuencia transmembranal para anclarse a la membrana, puede unirse a eritrocitos y degradar hemoglobina y componentes de la matriz extracelular (García-Rivera et al., 1999; Ocadiz et al., 2005).

Los trofozoitos de *E. histolytica* inducen cambios en el flujo de calcio en la célula blanca, de modo dependiente de Gal/GalNac (Ravdin et al., 1988; Ravdin et al., 1985), lo cual modifica la vía de señalización de MAPK induciendo la apoptosis (Ragland et al., 1994; Rawal et al., 2005) dependiente de caspasa 3 (Huston et al., 2000; Seydel and Stanley, 1998; Yan and Stanley, 2001) y degradando moléculas del citoesqueleto como paxilina y cinasas de adhesión focal por modulación de calpaína, así como

reguladores de la muerte celular, tales como NOX1 (Jang et al., 2011; Kim et al., 2011; Kim et al., 2007, 2010; Sim et al., 2005).

1.2.3 Fagocitosis

La fagocitosis se define como la propiedad de los trofozoítos de ingerir microorganismos en el intestino grueso, y células del hospedero entre las que se incluyen células inmunes (linfocitos y eritrocitos) y no inmunes (bacterias), lo cual ocurre durante la invasión al tejido (Mrion y col., 2005). Por medio de la fagocitosis la amiba adquiere nutrientes, evade al sistema inmune y causa patogenicidad (Christy and Petri, 2011). Se ha demostrado que amibas deficientes en fagocitosis reducen la adhesión a eritrocitos, el efecto citopático y el efecto citotóxico (Rodríguez & Orozco, 1986) y la generación de absceso hepático amibiano en el modelo de hámster (Orozco et al., 1983), además, este proceso está ligado a la exocitosis de cisteína proteasas (Hirata et al., 2007). Huston y col. 2003), demostraron que los trofozoítos ingieren preferencialmente células apoptóticas, reconociendo ligandos únicos sobre la superficie de éstas (Huston et al., 2003).

Análisis del genoma de *E. histolytica* ha revelado la presencia de genes *rab* (Saito-Nakano et al., 2001; Temesvari et al., 1999), los cuales son regulados positivamente durante la fagocitosis (Debnath et al., 2007). Moléculas como EhRab5, una GTPasa homologa a Rab5 de mamíferos, es necesaria durante la ingestión de eritrocitos y junto con EhRab7A se encuentran en vacuolas pre-fagosomales durante la maduración fagosomal (Fuchs et al., 2007; Saito-Nakano et al., 2004). Otra proteína involucrada es EhRabB, la cual se transloca hacia la membrana plasmática y a bocas fagocíticas, además de disminuir sus niveles a los 10 min de la fagocitosis, lo que sugiere su participación en la regulación de este evento (Rodríguez y Orozco, 2000; Saito-Nakano et al., 2004; Welter et al., 2002).

La miosina IB, un componente del citoesqueleto, participa en la fagocitosis de eritrocitos siendo reclutada a los sitios de formación de copas fagocíticas y en la periferia del fagosoma (Voigt y col., 1999). Además, en este evento, participan proteínas como las GTPasas Rho y RacG y cinasas como EhPAK, que regulan la

remodelación del citoesqueleto y controlan la motilidad y fagocitosis de la amiba (Godbold y Mann, 1998; Guillen et al., 1998; Labruyere et al., 2003)

1.3 Tráfico vesicular en *E. histolytica*

A pesar de que en los trofozoitos de *E. histolytica* no se han observado organelos clásicos de peroxisomas, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi, ensayos ultraestructurales han revelado la presencia de estructuras similares al retículo endoplásmico liso y el aparato de Golgi (Chavez-Mungía *et al.*, 2000). Además, mediante el uso de anticuerpos dirigidos a marcadores de retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi, se identificaron estructuras con similitud a estos organelos en *E. histolytica* (Ghosh *et al.*, 1999).

El tráfico vesicular se encuentra implicado en muchos aspectos de la virulencia de *E. histolytica*. El movimiento característico de los trofozoítos depende del movimiento interno de vesículas hacia la membrana plasmática, un proceso que participa en la formación de los pseudópodos, proporcionando una fuente de membrana de superficie celular, o bien, una fuente de moléculas que participan en la adhesión celular, necesarias para la unión a las células blanco (Bretscher y Aguado-Velasco, 1998; Welter y Temesvari, 2004). Por otro lado, la secreción de cisteína proteasas en lisosomas se relaciona con el evento de tráfico vesicular (Okada y col., 2006). Este proceso tiene un papel importante en la fagocitosis (Orozo y col., 1985) y también en la secreción de moléculas hacia los lisosomas y fagosomas para desintegrar sustancias endocitadas por el parásito, lo que finalmente repercute en la virulencia de la amiba (Okada y col., 2006).

1.4 Cuerpos multivesiculares y la maquinaria ESCRT

La primera función de los endosomas es separar a las proteínas que serán recicladas a otros lugares en la célula de aquellas que serán degradadas en lisosomas. También regulan la composición de la superficie celular y juegan un papel importante en una gran variedad de funciones biológicas. La maduración de los endosomas tempranos a endosomas tardíos implica el recambio tanto de lípidos como de proteínas a través de

elementos túbulo-vesiculares que clasifican a estos componentes de vuelta a la red trans-Golgi y a la membrana plasmática. Las proteínas de membrana y las proteínas cargo que no han sido recicladas, así como materiales lumbinales solubles son transportados a los endosomas tardíos y a los lisosomas (Gruenberg y Maxfield, 1995) para su degradación, por lo que son incorporadas dentro de vesículas intraluminales (ILVs) contenidas en cuerpos multivesiculares (MVBs) mediante la modificación post-traduccional por ubiquitina. Posteriormente, la fusión de los MVBs con lisosomas inicia la degradación de las ILVs y de su contenido, por medio de las hidrolasas lisosomales que poseen (Bishop et al., 2002; Lemmon and Traub, 2000).

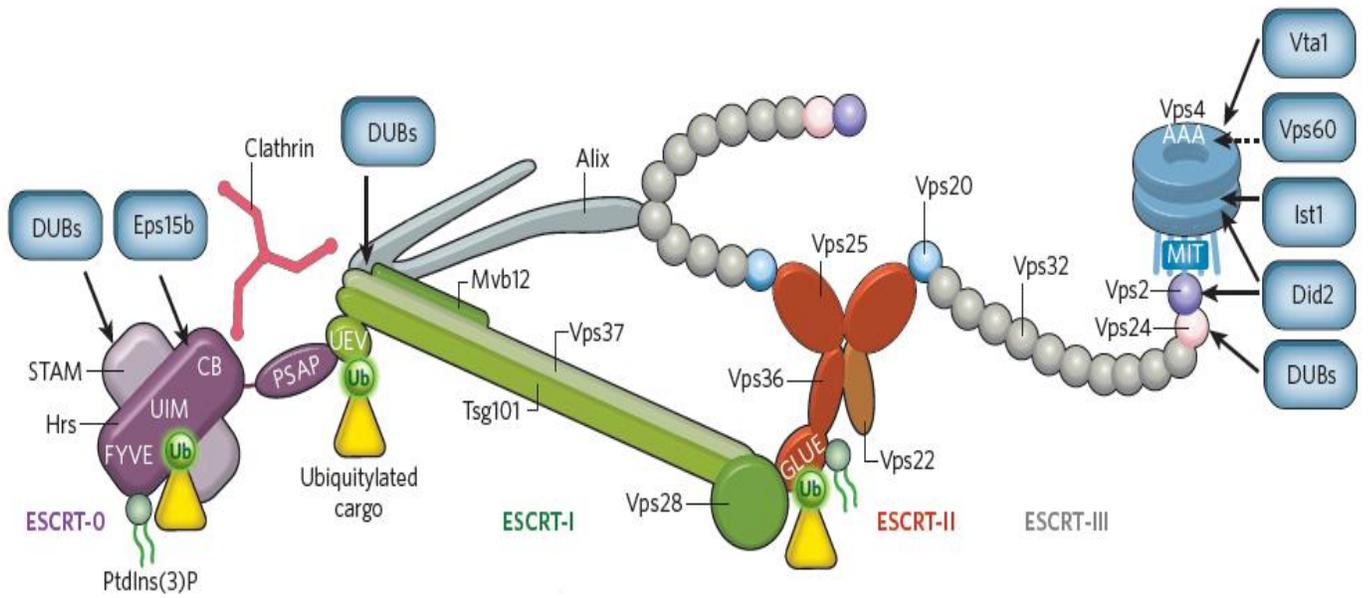
Los MVBs fueron observados por primera vez a través de microscopia electrónica como estructuras delimitadas por membrana y con ILVs en su interior, las cuales son generadas por invaginación de brotes de membrana hacia el interior de la vesícula (Palade y col., 1955; Sotelo y Porter, 1959; Williams y Urbe, 2007). El seguimiento de las proteínas internalizadas definió a los MVBs como parte de la vía endocítica y a las ILVs como una ruta de degradación de proteínas tales como el factor de crecimiento epidermal (EGFR) (Felder y col., 1990; Gorden y col., 1978; Haigler y col., 1979; Van Deurs y col., 1993). En la actualidad se sabe que los MVBs tienen diferentes funciones dentro de la vía endocítica y, como tales, pueden tener composiciones y morfologías diferentes. Estas estructuras contienen marcadores como Rab5 y LAMPs que los distinguen de otros organelos con membranas internas tales como cuerpos autofágicos o lisosomas multilamelares.

El proceso por el cual son generados estas estructuras es regulado por un complejo de proteínas llamado Complejo de Clasificación Endosomal Requerido para el Transporte o Maquinaria ESCRT (del inglés *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). La maquinaria ESCRT participa en la degradación de proteínas plasmáticas innecesarias o peligrosas, en la biogénesis de lisosomas o vacuolas en levadura, en la liberación de la mayoría de los virus envueltos como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) (Raiborg y Stenmark, 2010), en la abscisión de la membrana durante la citocinesis, la macroautofagia, entre otros (Hurley, 2010).

1.5 Composición de la maquinaria ESCRT

Esta maquinaria está formada por los subcomplejos ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III y proteínas accesorias, llamados así por el orden de ensamblaje durante la formación de los MVBs (Figura 3) (Williams y Urbé, 2007; Camilla Raiborg & Harald Stenmark, 2009). Fue identificada inicialmente en levadura, por medio de experimentos en los que la mutación de los genes *vps* inhibía el transporte de hidrolasas vacuolares, produciendo una morfología endosomal aberrante (Coonrod et al., 2010). Estudios a nivel de biología celular demostraron que estos complejos de proteínas se unen a moléculas cargo en endosomas, uno de los últimos pasos para generar las vesículas intraluminales (IVLs), y los convierten en MVBs (Babst, 2011; Henne et al., 2011; Henne et al., 2013; Hurley, 2010).

Figura 3.- Interacciones moleculares y composición general de la maquinaria ESCRT. La imagen representa el ensamble de moléculas de cada complejo ESCRT (en diferentes colores) y los nombres de las proteínas. La información que se aprecia en la figura intenta englobar los resultados y estudios obtenidos de mamíferos y de levadura con respecto a esta maquinaria (tomado de (Raiborg and Stenmark, 2009)).



1.5.1 Complejo ESCRT-0

Heterodímero formado por las subunidades Vps27 y Hse1 en una proporción 1:1. Los nombres adjudicados a las proteínas fueron denominadas primero en levadura (Figura 4). Ambos componentes del complejo ESCRT-0 tienen dominios de unión a ubiquitina conocidos como UIM (del inglés *Ubiquitin Interaction Motifs*) (Bilodeau *et al.*, 2002). El complejo ESCRT-0 puede unirse a cadenas de poliubiquitina con alta avidéz (Ren and Hurley, 2010) y es quien agrupa a las proteínas cargo ubiquitinadas hacia los sitios de formación de los MVBs, además, recluta clatrina, ligasas de ubiquitina y enzimas desubiquitinantes (Wollert and Hurley, 2010). A través de la proteína Vps27 este complejo puede interactuar con Vps23 del complejo ESCRT-I (Raiborg *et al.*, 2001).

1.5.2 Complejo ESCRT-I

Este complejo ESCRT-I es un heterotetrámero formado por las proteínas Vps23, Vps28, Vps37 (Katzmann *et al.*, 2001) y Mvb12 (Audhya *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2006; Curtiss *et al.*, 2006; Kostelansky *et al.*, 2007; Morita *et al.*, 2007; Oestreich *et al.*, 2006) (Figura 4). Se co-ensambla con el ESCRT-II sobre las membranas (Kostelansky *et al.*, 2007) iniciando la formación de la membrana limitante del MVB dentro de su lumen (Wollert and Hurley, 2010). Vps23 contiene un dominio llamado UEV (del inglés *Ubiquitin E2 Variant*) que le permite interactuar con proteínas cargo ubiquitinadas (Katzmann *et al.*, 2001; Sundquist *et al.*, 2004; Teo *et al.*, 2004) y con el complejo ESCRT-0 (Bilodeau *et al.*, 2003; Katzmann *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003; Pornillos *et al.*, 2003). Además, la proteína Vps28 contiene un dominio CDT (del inglés *C-terminal four hélix bundle domain*) con el que interactúa con la proteína Vps36 del complejo ESCRT-II (Gill *et al.*, 2007; Kostelansky *et al.*, 2006).

1.5.3 Complejo ESCRT-II

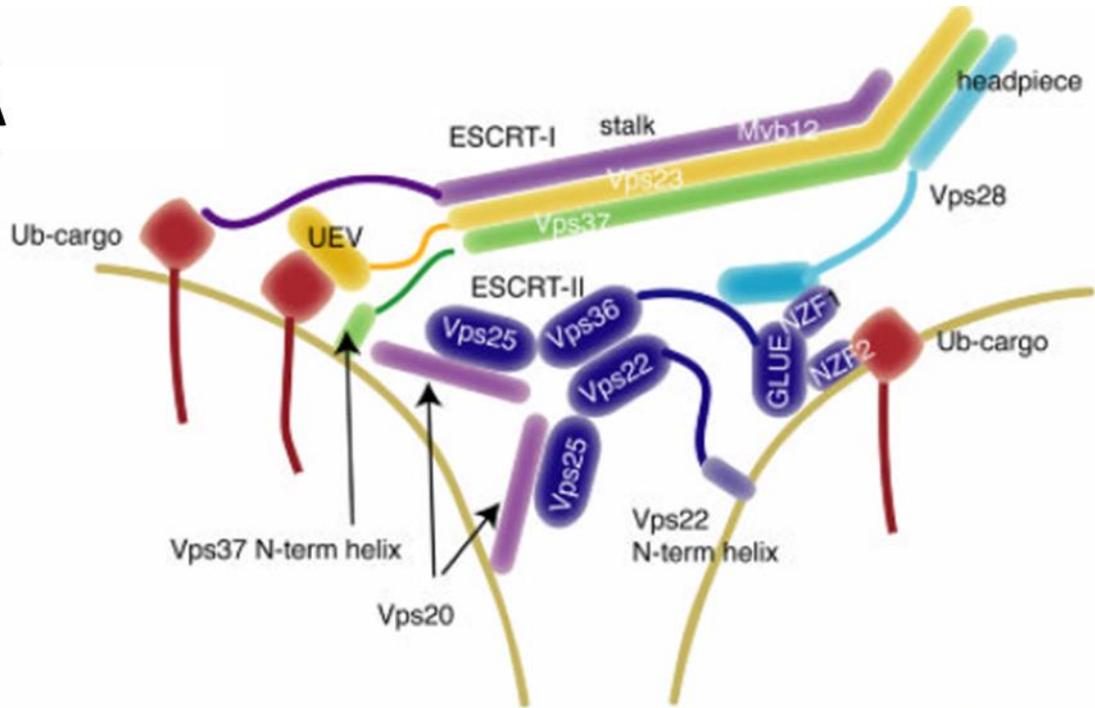
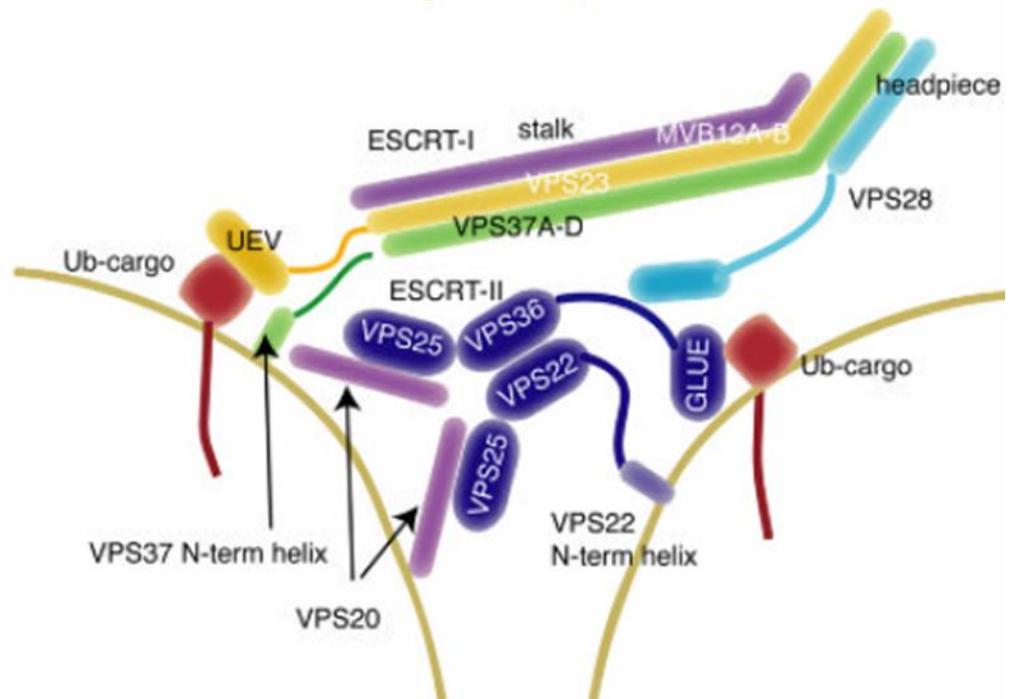
Está formado por las proteínas Vps22, Vps25 y Vps36, en una proporción 1:2:1, respectivamente (Hierro *et al.*, 2004; Im and Hurley, 2008; Teo *et al.*, 2004) (Figura 4). A pesar de que carecen de homología en secuencia entre ellas, cada una contiene dos dominios WH (del inglés *Winged Helix*). Estos dominios han sido involucrados en la unión a ADN, sin embargo, no hay evidencia directa de que el ESCRT-II pueda interactuar con este ácido nucléico (Teo *et al.*, 2006). Vps22 contiene en la región N-terminal un motivo CC (del inglés *Coiled coil*) que interactúa con Vps36, y sus dominios WH le permiten la interacción con Vps25 (Winter and Hauser 2006; Hierro y col. 2014). Vps25 contiene dos motivos PPXY, ricos en prolina que contactan a Vps22 y Vps36, y los dominios WH le permiten asociarse con Vps20 del complejo ESCRT-III. Vps36 puede interactuar con Vps25 a través de sus dominios WH, en el N-terminal contiene un dominio llamado GLUE (del inglés *GRAM-Like Ubiquitin-binding in EAP45*) con el cual puede interactuar con Vps22, con proteínas cargo ubiquitinadas, con fosfatidilinositol-3-fosfato (Slagsvold *et al.*, 2005), y con Vps28 del complejo ESCRT-I (Hurley y Scott, 2006; Im y Hurley, 2008). En el caso de *S. cerevisiae*, el dominio GLUE está formado por dos motivos de dedos de zinc: NZF1 y NZF2 (del inglés *Npl4-type zinc finger*), el primero se une a ESCRT-I y el segundo interactúa con la ubiquitina (Teo *et al.*, 2006).

El complejo ESCRT-II trabaja en conjunto con el complejo ESCRT-I en la biogénesis de los MVBs (Babst *et al.*, 2002). Hay evidencia de que la sobreexpresión del ESCRT-II puede rescatar las deleciones en los genes del ESCRT-I en levadura, pero no viceversa (Babst *et al.*, 2002). Al igual que los complejos ESCRT-0 y ESCRT-I, el complejo ESCRT-II puede unirse a proteínas cargo ubiquitinadas, a través una de sus subunidades, en este caso a través la proteína Vps36 (Alam *et al.*, 2004). Este complejo funciona como un puente entre los complejos río arriba ESCRT-0 y ESCRT-I y el complejo ESCRT-III, involucrado en la escisión de la membrana. Además, hay evidencia de que puede conectar a los MVBs hacia microtúbulos mediante las proteínas RILP, Rab7 y dineína (Progida *et al.*, 2007; Wang and Hong, 2006).

1.5.4 Complejo ESCRT-III

El ESCRT-III consiste en cuatro subunidades: Vps2, Vps20, Vps24 y Vps32 (Babst *et al.*, 2002) (Figura 4). Los monómeros de ESCRT-III no se localizan en el endosoma, sino que existen en un estado autoinhibido en el citoplasma. El complejo ESCRT-III inicia su ensamble cuando la proteína Vps25 de ESCRT-II se une a Vps20. Vps20 recluta a Vps32, que al polimerizarse atrae a Vps24. Vps32 también acerca a la proteína Bro1/Alix (del inglés *BCK1-like resistance to osmotic shock protein-1/apoptosis-linked gene-2 interacting protein X*) que estabiliza los filamentos de Vps32 y recluta a la enzima deubiquitinasa Doa4 (Luhtala & Odorizzi, 2004), luego, Vps2 es atraída al endosoma gracias a Vps24 (Teis *et al.*, 2008). Finalmente, la proteína accesoria Vps4, una ATPasa, lleva a cabo el desensamble de la maquinaria. Ésta se une a subunidades de ESCRT-III a través de su dominio MIT (del inglés *microtubule-interacting and traficking*) localizado en el N-terminal (Babst *et al.*, 1997; Babst *et al.*, 1998).

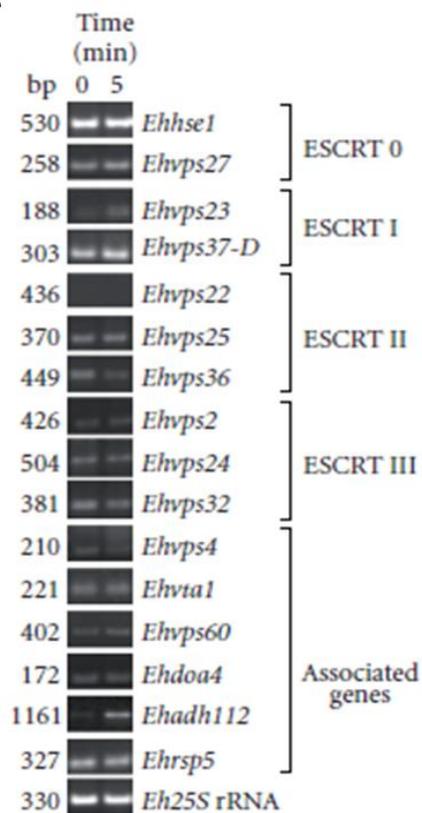
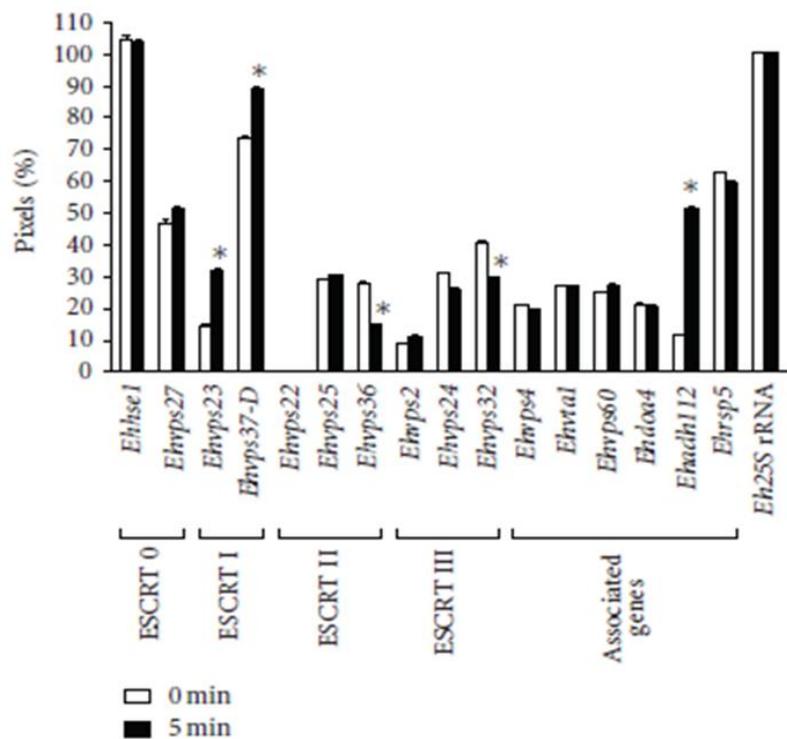
Figura 4.- Sistema ESCRT en diferentes organismos. A) se muestra la maquinaria ESCRT en *Saccharomyces cerevisiae*, las proteínas del ESCRT-II tienen dominios diferentes a las de humano, principalmente en la proteína Vps36 (azul marino). B) Representación de la maquinaria ESCRT en *Homo sapiens* (Hurley, 2010).

A**B**

1.5.5 La maquinaria ESCRT en *E. histolytica*

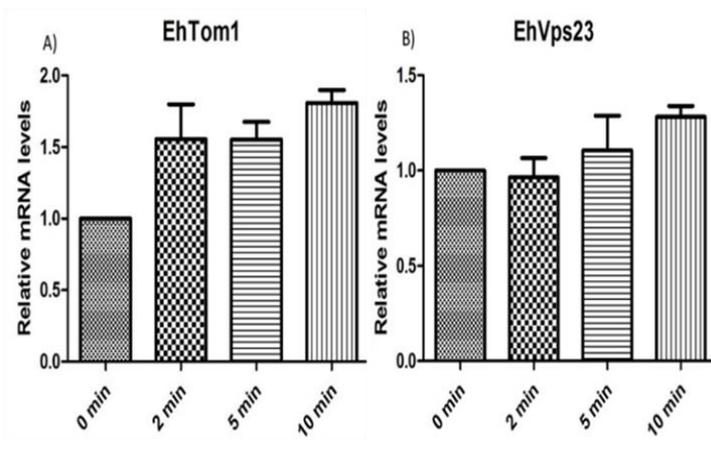
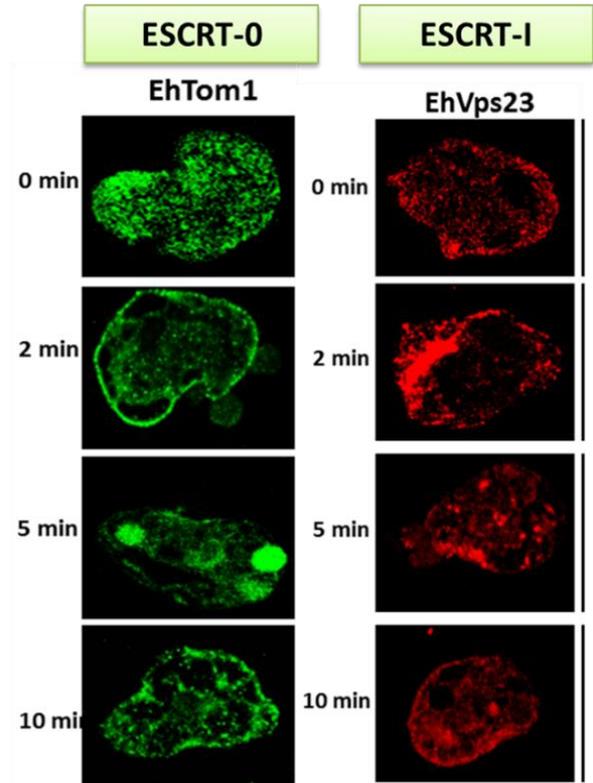
En *E. histolytica*, la fagocitosis y tráfico vesicular juegan un papel muy importante en la ingestión y degradación de las células del hospedero. Algunas de las Vps's así como las proteínas accesorias que se encuentran involucradas en procesos de transporte de vesículas en eucariontes, han sido identificadas en este parásito. De acuerdo al análisis *in silico* en las bases de datos del genoma de la amiba se identificaron 20 genes correspondientes a proteínas ESCRT con similitud a las de levadura y humano y se probó que la mayoría de ellos se transcriben en trofozoítos en condiciones basales y a los 5 min de la eritrofagocitosis (Figura 5) (Lopez-Reyes et al., 2010).

Figura 5.- Perfil de expresión de genes correspondientes a proteínas que conforman la maquinaria ESCRT en *E. histolytica*. A) En la imagen se muestran los productos de RT-PCR semicuantitativa obtenidos de trofozoítos en condiciones basales y a los 5 minutos después de eritrofagocitosis. B) Análisis densitométrico de los productos amplificados por RT-PCR. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa entre las condiciones basales y de eritrofagocitosis para algunos de los genes del complejo ESCRT (Lopez-Reyes et al., 2010).

A**B**

E. histolytica expresa la proteína EhTom1, la cual podría estar asociada al ESCRT-0 como sucede en *Dictyostelium discoideum* (Blanc et al., 2009) y también expresa la proteína EhVps23 del ESCRT-I. La expresión de los genes *ehTom1* y *ehvps23* del parásito, indicó que existe un aumento diferencial en los niveles de ARN mensajero para los dos genes a tiempos tempranos de eritrofagocitosis. Además, en condiciones normales estas proteínas se encuentran dispersas en el citoplasma y pocos minutos después de haber iniciado la eritrofagocitosis se relocalizan hacia la membrana plasmática, en los fagosomas que contienen eritrocitos y alrededor de vesículas (Figura 6) (Galindo Olea, 2016).

Figura 6.- EhTom1 y EhVps23 de *E. histolytica* durante la eritrofagocitosis. A) Niveles de expresión de los genes *ehtom1* y *ehvps23* en condiciones basales y durante eritrofagocitosis, obtenidos mediante RT-qPCR. B) Localización subcelular de EhTom1 y EhVps23 en trofozoítos de *E. histolytica* incubados con eritrocitos durante 0, 2, 5 y 10 minutos; se utilizaron anticuerpos específicos primarios anti-EhTom1 y anti-EhVps23 (dil. 1:50) y anticuerpos secundarios (dil. 1:100) marcados fluorescentemente. Los núcleos se tiñeron con DAPI (dil. 1:200) (modificada de (Galindo Olea, 2016)).

A**Niveles de ARN mensajero****B**

En 2016 Ávalos Padilla caracterizó a los miembros del ESCRT-III en amiba: EhVps32, EhVps24, EhVps20 y EhVps2. EhVps32 se encuentra en vesículas citoplasmáticas adyacentes a la membrana plasmática, en algunos fagosomas con eritrocitos (Figura 7) y, además, forma oligómeros sobre estos. EhVps32 también se co-localizó con proteínas que participan en la endocitosis como la actina, la EhADH y la lectina Gal/GalNAc en las bocas fagocíticas y en algunos fagosomas que contienen eritrocitos, lo que sugiere su participación directa durante la fagocitosis (Figura 7) (Avalos-Padilla et al., 2015).

Mediante ensayos con vesículas gigantes unilamelares (GUVs) se estudió la función de las proteínas del complejo ESCRT-III. Por medio de estos experimentos se determinó que EhVps20 es la primera proteína que se une a las membranas cargadas negativamente e inicia el reclutamiento del resto de la maquinaria. Posteriormente EhVps32 forma invaginaciones en la membrana y después de esto EhVps24 escinde la vesícula naciente durante la formación de MVBs, originando las ILVs. Y a pesar de que EhVps2 parece no parece ser necesaria para la formación de estas vesículas se observaron cambios en su localización celular durante la eritrofagocitosis al igual que las demás Vps del complejo ESCRT-III (Figura 8) (Ávalos-Padilla, 2016). Por otra parte, resultados recientes han mostrado que EhVps2 podría tener un papel regulador del tamaño de las ILVs en los MVBs (Henne, 2012; Ávalos-Padilla, 2016).

Figura 7.- Detección y localización de la proteína Vps32 en trofozoítos. A) Microscopia confocal usando anticuerpos específicos anti-EhVps32r y anti-lectina Gal/GalNAc de ratón seguido del uso de anticuerpos secundarios marcados con FITC y azul pacífico respectivamente. Flechas: membrana plasmática. Puntas de flecha: vesículas cercanas a la membrana plasmática. B) Localización EhVps32 durante la fagocitosis. Eritrocitos,e (modificado de (Avalos-Padilla et al., 2015).

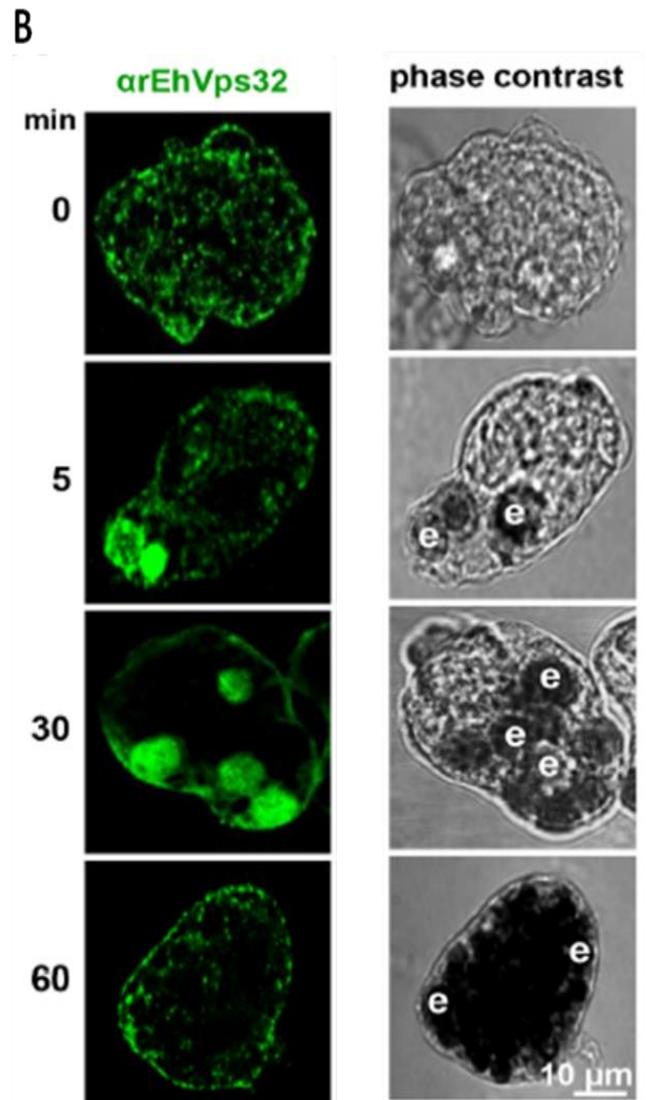
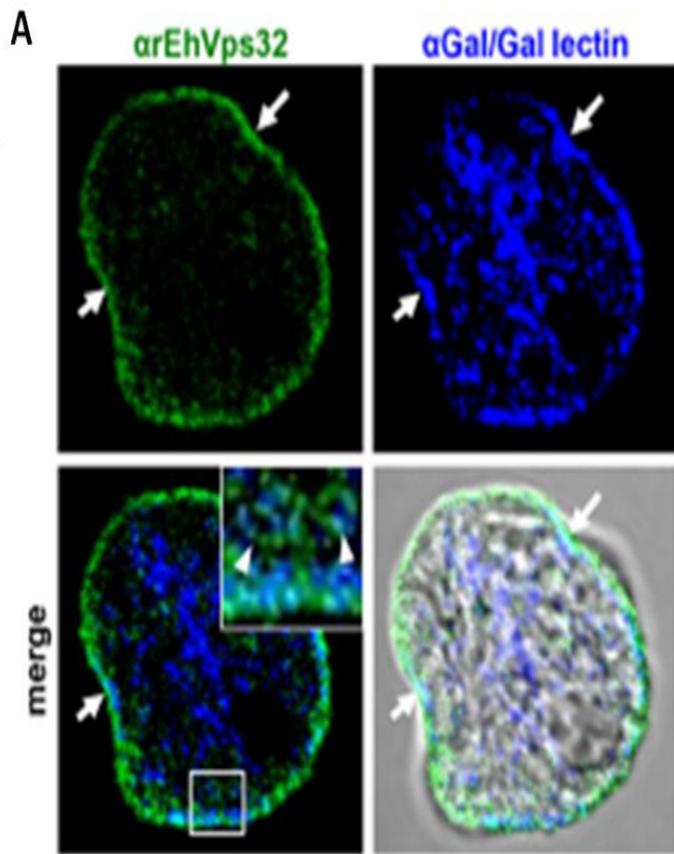
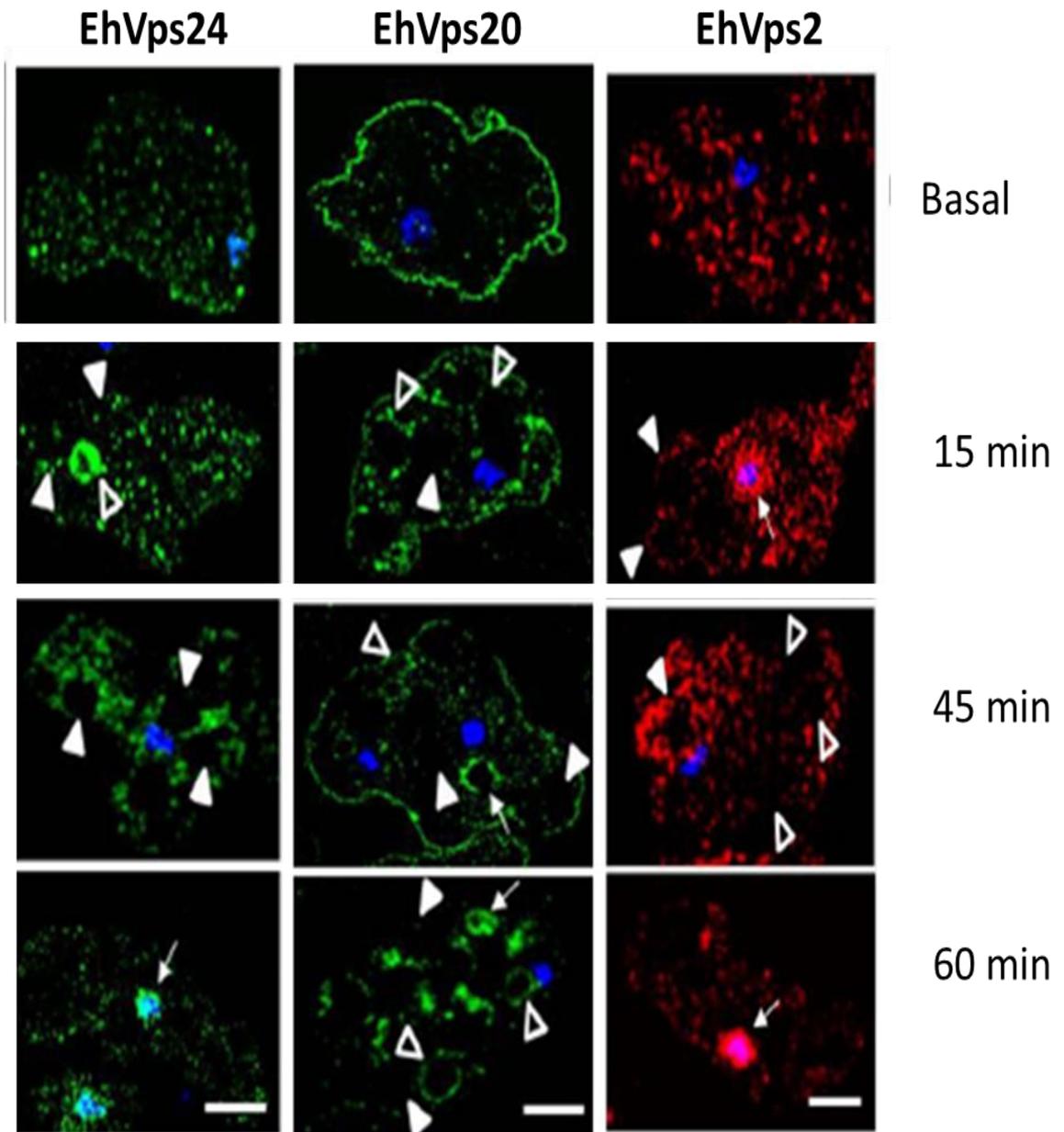


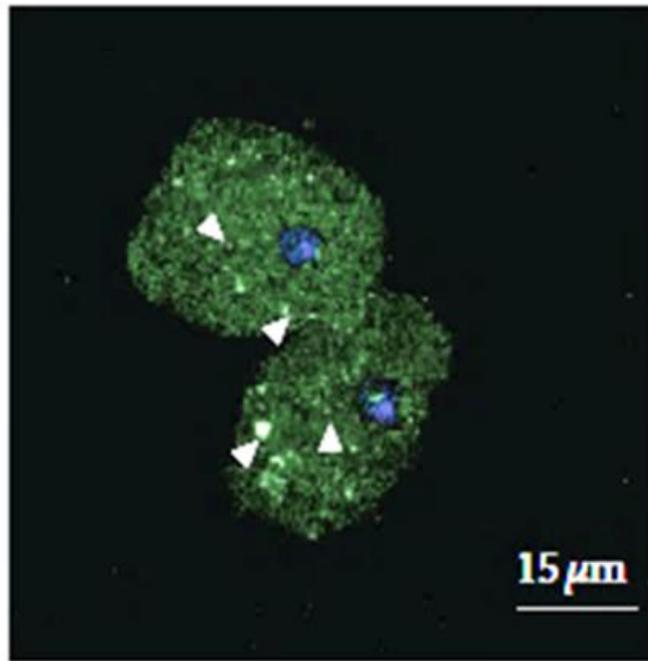
Figura 8.-Identificación y localización de EhVps24, EhVps20 y EhVps2 en condiciones basales y a tiempos largos de eritrofagocitosis en trofozoitos de *E. histolytica*. Trofozoítos incubados con eritrocitos humanos a 37°C en relación 1:25 a diferentes tiempos. Las preparaciones se incubaron con los anticuerpos específicos α -EhVps24, α -EhVps20 y α -EhVps2 seguidos de anticuerpos secundarios acoplados a FITC (verde) en el caso de EhVps24 y EhVps20 y TRITC (rojo) para EhVps2. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul), para su posterior análisis en microscopía confocal. Cabeza de flecha rellenas: fagosomas marcados el respectivo anticuerpo. Cabeza de flecha vacías: fagosomas sin marca. (modificado de (Ávalos-Padilla, 2016)).



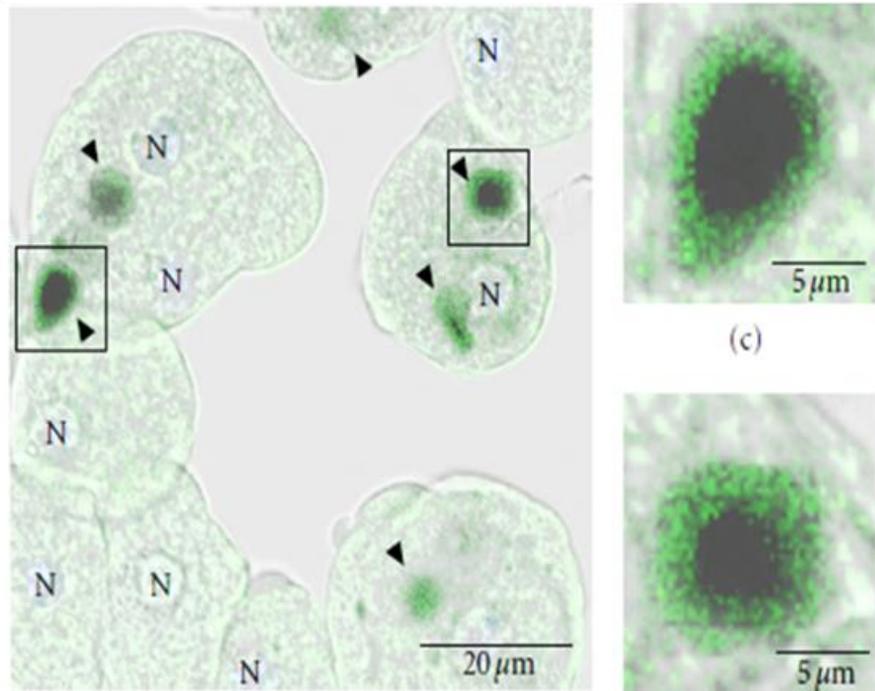
También se demostró la presencia de EhVps4 en *E. histolytica*, quien conserva la arquitectura típica de sus homólogos y posee actividad de ATPasa, importante para desensamblar la maquinaria ESCRT. En ensayos de eritrofagocitosis usando una mutante dominante negativa, se demostró que la EhVps4 participa en los procesos de virulencia *in vitro* e *in vivo* y cambia su localización desde el citoplasma en condiciones basales hacia alrededor de fagosomas que contienen eritrocitos durante la fagocitosis (Figura 9) (Lopez-Reyes et al., 2010).

Figura 9.- Localización de EhVps4 en trofozoítos de *E. histolytica*. A) Trofozoítos de la clona A se incubaron con anticuerpos primarios anti-EhVps4 y anticuerpos secundarios marcados con FITC. Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal. Las puntas de flecha indican la señal de EhVps4 en pequeños puntos dentro del citoplasma. B) Localización celular de EhVps4 durante la eritrofagocitosis. Las puntas de flecha negras muestran que EhVps4 rodea a los eritrocitos fagocitados (modificada de (Lopez-Reyes et al., 2010)).

A

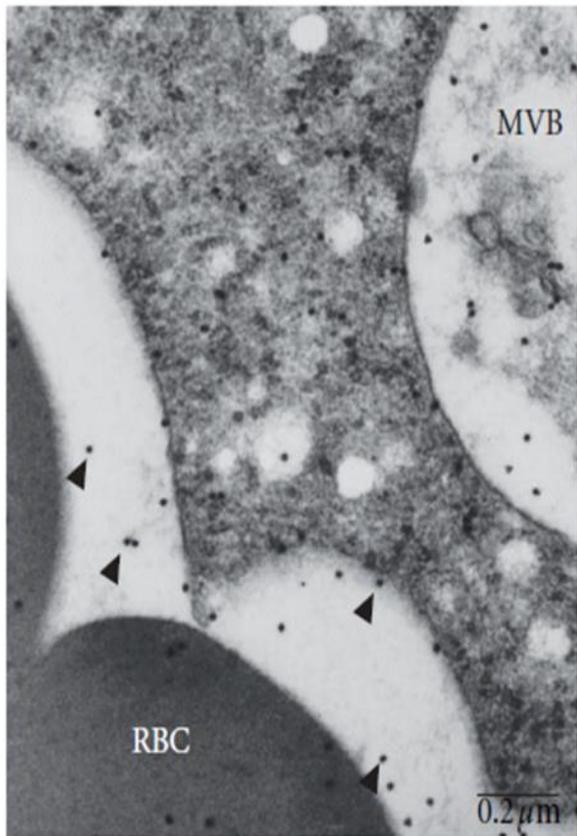
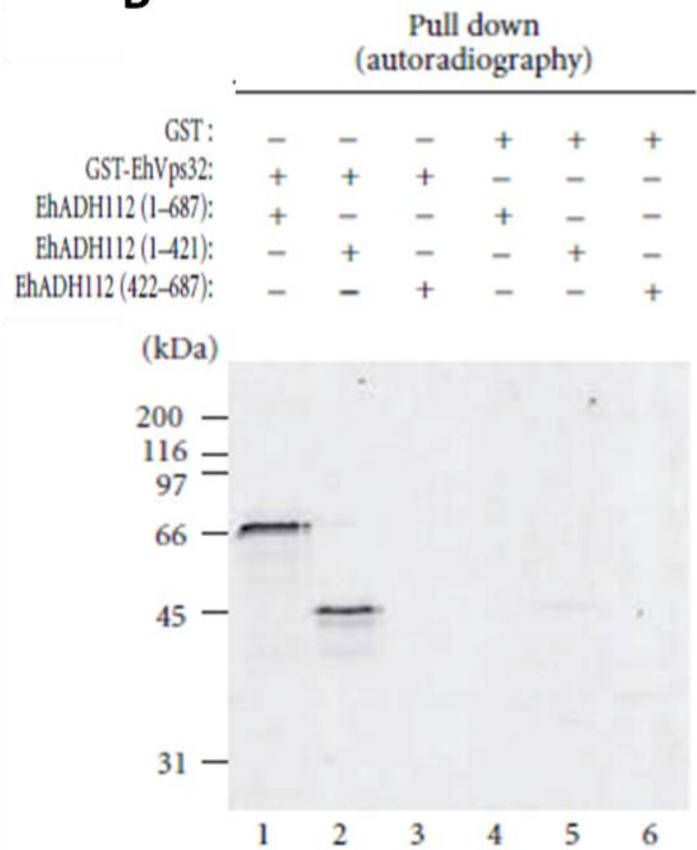


B



Análisis *in silico* demostraron que la proteína EhADH112 contiene en la región N-terminal un dominio Bro1 de alta homología con el dominio Bro1 de las proteínas de la familia ALIX de mamífero. Alix participa en el direccionamiento de proteínas endosomales. La sobreexpresión en trofozoítos, del dominio Bro1 de EhADH112 disminuyó la tasa de fagocitosis del parásito y llevó a la acumulación de esta proteína en compartimentos aberrantes, sugiriendo que el dominio Bro1 recluta proteínas que participan en la fagocitosis. EhADH112 se localizó en membrana plasmática, en MVBs y fagosomas durante la eritrofagocitosis y se asoció con EhVps32 a través del dominio Bro1, lo cual sugiere su participación en la vía de la formación de MBVs (Banuelos et al., 2012; Banuelos et al., 2005).

Figura 10.-Localización de EhADH112 durante la eritrofagocitosis y asociación con EhVps32. A) EhADH112 en fagosomas y MVBs después de 15 min de interacción con eritrocitos, utilizando microscopia electrónica de transmisión y anticuerpos acoplados a partículas de oro. B) Interacción *in vitro* de EhADH112 a EhVps32 a través del dominio Bro1, utilizando proteínas GST-EhVps32 y EhADH112 marcada radiactivamente con [S^{35}].

A**B**

1.5.6 ESCRT-II en *E. histolytica*

De acuerdo con lo anterior, algunas subunidades de los complejos ESCRT-0 y ESCRT-I, así como todo el complejo ESCRT-III y las proteínas accesorias EhVps4 y EhADH112 han sido estudiadas y caracterizadas parcialmente en *E. histolytica*. Con respecto al complejo ESCRT-II se identificaron *in silico* los genes que lo conforman: *ehvps22*, *ehvps25* y *ehvps36*. Y al menos para los genes *ehvps25* y *ehvps36* se determinó su expresión a los 5 min de eritrofagocitosis (López-Reyes, 2010). Sin embargo, no existen estudios más allá de la presencia de los genes de esta maquinaria en *E. histolytica*.

2 JUSTIFICACIÓN

En *E. histolytica* hay evidencia que durante la fagocitosis participan diferentes moléculas que conforman los complejos ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-III y algunas proteínas accesorias, pero el complejo ESCRT-II aún no se ha estudiado ni se ha comprobado la expresión de las proteínas que lo conforman: Vps22, Vps25 y Vps36. En otros organismos, las proteínas del ESCRT-II son importantes para conectar el complejo ESCRT-I con el complejo ESCRT-III. Sabemos que estos complejos son importantes en el proceso endocítico y muy probablemente durante la fagocitosis de los trofozoítos de *E. histolytica*. Por ello es importante investigar la expresión y la localización de estas proteínas en *E. histolytica* durante la eritrofagocitosis.

3 HIPÓTESIS

El parásito *Entamoeba histolytica* expresa el complejo ESCRT-II, el cual participa en el evento de eritrofagocitosis.

4 OBJETIVOS

4.1.1 Objetivo general

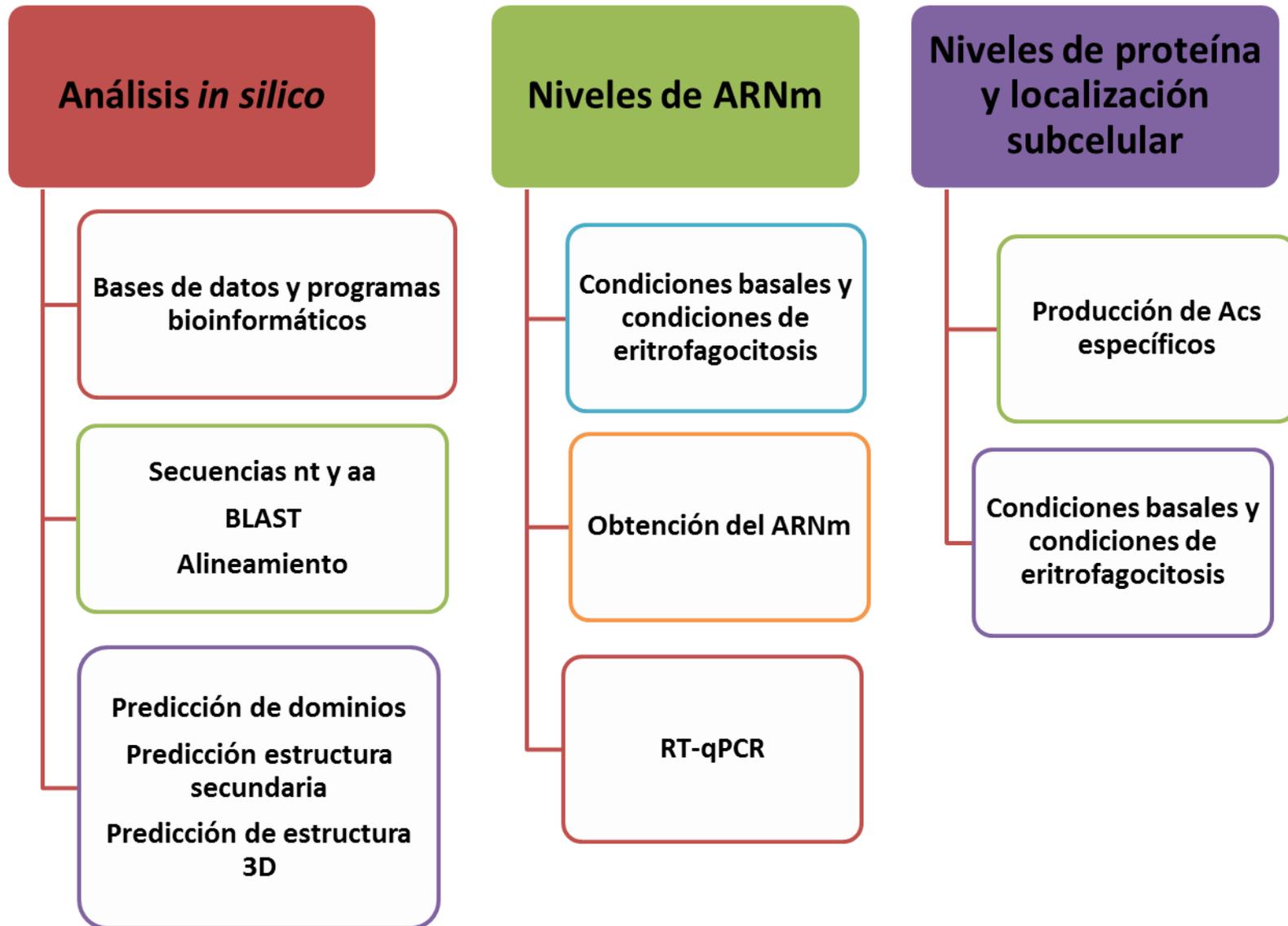
Estudiar las proteínas EhVps25 y EhVps36 de la maquinaria ESCRT-II de *Entamoeba histolytica* durante la eritrofagocitosis.

4.1.2 Objetivos particulares

- ✓ Identificar y analizar *in silico* el complejo ESCRT-II de *Entamoeba histolytica*.

- ✓ Evaluar los niveles de expresión de ARN mensajero de los genes del ESCRT-II en condiciones basales y durante la eritrofagocitosis.
- ✓ Determinar la expresión y localización celular de las proteínas EhVps25 y EhVps36 en condiciones basales y en la eritrofagocitosis.

5 DISEÑO EXPERIMENTAL



6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Análisis *in silico*

De acuerdo al trabajo realizado por López-Reyes (2010), se obtuvieron los números de acceso de cada una de las proteínas que forman el ESCRT-II de *E. histolytica*: EHI_131120 para EhVps22, EHI_137860 para EhVps25 y EHI_045320 para EhVps36. Con esta información fue posible obtener las secuencias de aminoácidos y de oligonucleótidos de cada uno de los componentes en la base de datos AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba/>). También, se obtuvieron las secuencias de las proteínas de la maquinaria ESCRT-II en *H. sapiens* y *S. cerevisiae* en las bases de datos Protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) y Kegg (<http://www.genome.jp/kegg>). Mediante el programa Jalview (<http://www.jalview.org/download>) se alinearon las secuencias de aminoácidos de la maquinaria ESCRT-II de amiba con las secuencias de ESCRT-II de *S. cerevisiae* y *H. sapiens*. En las bases de datos SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) y Kegg (<http://www.genome.jp/kegg/>) se identificaron los dominios funcionales de las especies analizadas. La estructura terciaria se obtuvo mediante el programa RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/>), se visualizaron en el programa Chimera 1.10.1. (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>) y se realizó el alineamiento estructural entre las proteínas de *E. histolytica* y los organismos de referencia. Con el programa STRING (<http://string-db.org/>) se obtuvo el interactoma *in silico* donde se analizaron probables interacciones de la maquinaria ESCRT-II de *E. histolytica* con proteínas de los otros complejos ESCRT, así como con proteínas no relacionadas a esta maquinaria.

6.2 Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*

Trofozoítos de la clona A cepa HM1: IMSS (Orozco *et al.*, 1982) fueron cultivados axénicamente a 37 °C en medio TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1987), suplementado con 10% con suero bovino, vitaminas de Diamond (JRH, Biosciences), penicilina (Lakside) y estreptomycin (Lakside).

Cuando los trofozoitos alcanzaron la fase logarítmica se despegaron mediante una incubación en hielo durante 10 minutos, posteriormente se cosecharon a 1,700 rpm durante 7 minutos a 4°C y se realizaron 2 lavados con PBS. Para cuantificar el número de amibas, se realizó un conteo en la cámara de Neubauer empleando la siguiente formula:

$$\frac{\text{Amibas}}{\text{ml}} = \frac{\text{Amibas (sumatoria de los cuatro cuadrantes)}}{4} \times \text{Factor de dilución}$$

6.3 Obtención de péptidos inmunogénicos

El diseño de péptidos para obtener anticuerpos específicos que detecten a las proteínas EhVps25 y EhVps36, se realizó utilizando las bases de datos ABCpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>) y BCPred (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/predict.html>). Estas bases de datos buscan los mejores péptidos basándose en distintas características como buena inmunogenicidad, exposición e hidrofobicidad. Estos péptidos se diseñaron conjugados a KLH (Hemocianina de lapa californiana), una proteína que les brinda una mayor inmunogenicidad.

6.4 Producción de anticuerpos

Para la generación de anticuerpos contra la proteína EhVps36 se utilizó un conejo New Zealand White macho de aproximadamente 500 g y para los anticuerpos contra EhVps25 se utilizaron tres ratas machos Wistar de aproximadamente 240 g cada una. Se inmunizó con 200 µg del péptido específico EhVps36 y con 150 µg

del péptido EhVps25 a los respectivos animales de experimentación, emulsificado en un volumen igual de adyuvante Titer-Max Gold (Sigma Aldrich). Previo al primer reto se obtuvo una muestra de sangre para obtener el suero preinmune, el cual se utilizó como control negativo. El conejo se inmunizó cuatro veces utilizando la misma cantidad del péptido, con un intervalo de 15 días entre cada reto. Los sueros inmunes se obtuvieron 15 días después de cada aplicación, para ello las muestras se incubaron a 37°C durante media hora para facilitar la separación del suero, posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm durante 20 min para recuperar el suero, el cual se separó en alícuotas que se almacenaron a -20°C hasta su uso. El análisis de la especificidad y la titulación de los anticuerpos policlonales anti-EhVps36 y anti-EhVps25 se realizó mediante ensayos tipo *Western blot* usando extractos totales de amiba.

6.5 Ensayo de eritrofagocitosis

Se cosecharon trofozoítos de *E. histolytica* por centrifugación a 633 g durante 7 min, después de esto se realizó el conteo de las amibas y se llevó a un volumen para obtener 1×10^6 de trofozoítos/ ml de medio TYI sin suero. Por otro lado, se preparó una suspensión de eritrocitos a una concentración de 25×10^6 de células/ ml de medio TYI sin suero. Posteriormente, se colocaron los tubos con amibas por 2 minutos en baño María a 37°C, después se adicionó un mililitro de eritrocitos y se incubaron a 37°C a los siguientes tiempos: 0, 2, 5, 10, 15 y 30 min. Una vez cumplidos los tiempos, se agregaron 10 ml de agua filtrada fría y se incubaron por 10 min en hielo para lisar los eritrocitos no fagocitados. Los tubos se centrifugaron a 633 g por 7 min. Finalmente, se eliminó todo el sobrenadante.

6.6 Extracción de ARN total

Las muestras provenientes de la eritrofagocitosis se resuspendieron en 200 μ l TRIzol® (Invitrogen)/ 1×10^6 trofozoítos y se almacenaron a -80°C hasta su uso (Chomczynski y Sacchi, 1987). Las muestras se incubaron 5 min a temperatura ambiente, se les agregaron 30 μ l de cloroformo, se agitaron vigorosamente y se

incubaron durante 3 min a temperatura ambiente. Después se centrifugaron a 13,000 g por 15 min a 4°C, se tomó la fase superior y se pasó a un tubo Eppendorf nuevo. Se les agregó 75 µl de isopropanol a temperatura ambiente, se mezclaron suavemente por inversión, se incubaron 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 13,000 g durante 10 min a 4°C. Se les retiró el sobrenadante y se lavó dos veces la pastilla con 500 µl de etanol al 75% (en agua DEPC). Se retiró el etanol completamente en la campana de flujo laminar y la pastilla resultante se resuspendió en 30 µl de agua DEPC. El ARN se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop de Thermo Fisher®) a 260/280 nm, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. La integridad del ARN fue determinada por la adición de bromuro de etidio a las muestras (1 µg/µL) y la electroforesis de ellas en geles de agarosa al 1% (Johansson, 1972).

6.7 Cuantificación de los niveles de ARNm de los genes del complejo ESCRT-II mediante RT-qPCR

Los oligonucleótidos para cada gen fueron diseñados en el programa Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) y se corroboró su especificidad haciendo un alineamiento contra las bases de datos para diferentes especies (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El ARN de *E. histolytica* se extrajo mediante el método de Trizol®, como se indicó anteriormente, en condiciones basales y a diferentes tiempos de eritrofagocitosis. Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en un solo paso empleando el sistema KAPA SYBR Fast Universal (KAPA Biosystems). Las condiciones de la transcripción reversa fueron 42°C durante 5 min, posteriormente para inactivar a la enzima se dió un ciclo de 95°C durante 3 min. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95°C por 3 s, 60°C por 30 s, durante 40 ciclos, más la curva de disociación. La expresión relativa de los genes *ehps25* y *ehvps36* fué calculada por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen TD, 2001). Se utilizó el gen S2 de la subunidad ribosomal 40s (40S) como control endógeno.

Tabla 1.- Iniciadores para RT-qPCR de los genes de la maquinaria ESCRT-II en *E. histolytica*.

Los iniciadores se diseñaron con el programa primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) para los tres genes: *ehvps22* (naranja), *ehvps25* (verde) y *ehvps36* (morado). Cada uno cuenta con Tm de 60°C y de un tamaño de 20-23 pb.

Iniciador	Tamaño (pb)	Secuencia 5' - 3'	Región amplificada (pb)	Tm (°C)
EhVPS22-RT-qPCR-F	21	gcgatgtcaactaaagggaaa	51-210	60
EhVPS22-RT-qPCR-R	20	ggttcaacccccattttct		60
EhVPS25-RT-qPCR-F	21	ccacttagagaatggggaaaa	430-623	60
EhVPS25-RT-qPCR-R	20	tctcctcatgctgaaccaa		60
EhVPS36-RT-qPCR-F	23	tgaagaagcattaatggatgaaa	266-385	60
EhVPS36-RT-qPCR-R	21	aaaatgccacgagctctattg		60

6.8 Extracción de proteínas totales

Los cultivos de amibas se colocaron en hielo durante 10 min y se cosecharon por centrifugación a 1700 rpm durante 7 minutos a 4°C. Se realizaron dos lavados con PBS frío. Las amibas se contaron en cámara de Neubauer y después del segundo lavado se eliminó por completo el sobrenadante para dejar solamente la pastilla. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 33 μ l de PHBM, 4 μ l de E-64 y 5 μ l de cocktail de inhibidores de proteasas y se congeló en nitrógeno líquido por algunos minutos. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Las muestras provenientes de eritrofagocitosis también se resuspendieron como se indicó anteriormente.

6.9 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) y *Western blot*

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% y se montaron en cámara de electroforesis. Se adicionó buffer de carga 2x (el mismo volumen que el de la muestra) a cada una de las muestras de extractos totales de proteínas y se incubaron a 100°C por 3 minutos. Posteriormente, se cargaron cada uno de los carriles del gel con 50-100 μ g de cada una de estas muestras. La electroforesis (Mini-Protean-Tetra de Bio-Rad®) se corrió a 80 volts el tiempo necesario para que las proteínas salieran del gel concentrador, luego, se cambió el voltaje a 120 volts durante 1 h aproximadamente. Para determinar el peso molecular de las proteínas de interés, se utilizaron marcadores de peso molecular conocidos y preteñidos (Bio-Rad Dual Color). Los geles de poliacrilamida con las proteínas separadas se equilibraron en amortiguador de transferencia 1X. Se armó la unidad de transferencia, poniendo en contacto el gel de acrilamida con la membrana de nitrocelulosa. El dispositivo tipo sándwich se colocó en una cámara de electrotransferencia (Mini Trans-blot, Bio-Rad®) que contenía amortiguador de transferencia fría y se colocó en un baño de hielo. La transferencia se realizó a 100 mA durante 20 min y luego, a 400 volts por 1 hora. Se desmontaron los componentes de la cámara de electrotransferencia y la membrana se tiñó con solución de rojo de Ponceau para verificar la correcta transferencia. La membrana

se incubó en solución bloqueadora (PBS 1X con leche baja en grasa al 5%) durante 1 h en agitación constante a temperatura ambiente. La membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-EhVps36, dilución 1:3000 o anti- EhVps25, dilución 1:3000, disuelto en solución bloqueadora, durante toda la noche a 4°C. Después, se realizaron 7 lavados con TBS-Tween 1%; por 7 min, luego, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa, utilizando una dilución 1:10,000 en solución bloqueadora, durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente se realizaron 7 lavados con TBS-Tween 1% de 7 minutos cada uno. Se utilizó el kit ECLTM Prime Western blotting detection reagent (GE-Healthcare) para revelar las proteínas inmunodetectadas en el equipo MicroChemi 4.2 (DNR bio-imaging Systems).

6.10 Tinción de proteínas con azul de Coomassie

Después de la electroforesis de proteínas, los geles de poliacrilamida se tiñieron con solución 0.05% de azul de Coomassie por 15 min a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente, los geles se destiñeron en una solución decolorante (5% metanol y 7% ácido acético) hasta que las proteínas fueron visualizadas.

6.11 Inmunofluorescencia

Se cosecharon trofozoítos de *E. histolytica* en frío y se resuspendieron en medio TYI sin suero en una concentración de 1×10^6 trofozoítos en 100 μ l, 100 μ l de la suspensión celular se colocó en cubreobjetos estériles contenidos en placas de cultivo, y se incubaron a 37°C durante 10 min para permitir la adhesión de los trofozoítos al vidrio. Posteriormente, se añadieron 2 ml de TYI incompleto y se incubaron por 30 min a 37°C. Pasado este tiempo se descartó el medio y se agregó sobre el cubreobjetos eritrocitos en una relación 1:50 diluidos en medio TYI incompleto. Se incubaron durante 2, 5, 10, 15 y 30 min a 37°C. Después de estos tiempos se eliminaron los eritrocitos no adheridos ni fagocitados. Los trofozoítos se fijaron con paraformaldehído al 4% a 37°C durante 30 min, se lavaron 3 veces

con PBS y se permeabilizaron con una solución Tritón X-100 0.2% durante 10 min. Se efectuaron 3 lavados con PBS y se bloqueó durante 30 min con una solución 10% de suero bovino. Después de esto, se agregaron los anticuerpos primarios anti-EhVps36 dilución 1:100 o anti-EhVps25 dilución 1:100 o el suero preinmune dilución 1:500 y las preparaciones se incubaron toda la noche a 4°C. Se efectuaron dos lavados con PBS y las preparaciones se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a TRITC (tetrametilrodamina) o anti-IgG de rata acoplados a FITC (isotiocianato de fluoresceína) a una dilución 1:100 durante 30 min a 37 °C. Se realizaron tres lavados con PBS 1X. Para teñir los núcleos, las muestras se incubaron con una solución de DAPI (decolorhidrato de 4',6-diamido-2-fenilindo) a una concentración de 0.25 mg/ml durante 4 min a temperatura ambiente, seguido de tres lavados con PBS 1X para eliminar el exceso. Las muestras se colocaron sobre portaobjetos limpios y estériles, adicionados con 10 µl de medio de montaje Vectashield®. Las preparaciones se almacenaron a -20°C hasta su observación. Para el análisis de las muestras se utilizó un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700 Imager y el programa ZEN 2009 Light Edition, proporcionado por el fabricante.

7 RESULTADOS

7.1 Análisis *in silico*

7.1.1 Alineamientos de la secuencia

De acuerdo a un reporte anterior en donde se identificaron los genes de la maquinaria ESCRT en *E. histolytica* (López-Reyes y col. 2010), se obtuvieron los números de acceso para las proteínas de la maquinaria ESCRT-II: EHI_131120 para EhVps22, EHI_137860 para EhVps25 y EHI_045320 para EhVps36. Con la finalidad de comparar que aminoácidos se conservaban entre las secuencias y conocer el porcentaje de identidad, se realizaron los alineamientos entre cada una de las secuencias de las proteínas Vps's del ESCRT-II de *E. histolytica* con las de *Homo sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae*, los cuales son organismos en los cuales ha sido bien caracterizada y documentada esta maquinaria. Los porcentajes de identidad fueron 33% para Vps22, 29% para Vps25 y 26% para Vps36 de amiba con respecto a *H. sapiens*, y 28% para Vps22, 20% para Vps25 y 28% para Vps36 de amiba con respecto a *S. cerevisiae* (Figuras 11, 12 y 13). De acuerdo a estos resultados, consideramos que la nomenclatura de estos genes y proteínas es EhVps36, EhVps25 y EhVps22.

Figura 11.- Alineamiento *in silico* de las secuencias de EhVps22. A) Comparación de la secuencia de EhVps22 con *Homo sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae*. B) Porcentajes de identidad de la secuencia de EhVps22 con respecto a *H. sapiens* y *S. cerevisiae*. Estos datos fueron obtenidos del alineamiento en la base de datos AmoebaDB y verificado en Jalview para las Figuras 11,12 y 13. Número de acceso: EHI_131120.

A

```

EhVps22/1-237 1 MSKRTIDLLCRQ...-KEAMSTGKEFCLVNQKERERDINLFLKLEEFQNNRYEITNDVNIQNMLYLDRKMGVEPLTTEKSYFNIFGSAFYNELTVQIIEEYKSRNSGGIIEINKLCELINK 125
HbVps22/1-268 1 MHRRGVGGAGIAKKKLAEEKYKERGTVLAEDQLAQMSKQLDMPKTNLEEFASKHKQEIIRKNPEFRVQFDNCAITGVDPASGKGFWSEMLGVDFFYELGVQIIEVDLALKHRNGGLITLEELHQQVLY 130
ScVps22/1-233 1 MKQ...-FGLAAFDELKDGKYNDVNTILEKQSVLELDDLMVFRQLVEFAKKHNSLQASPEFRSKFMHMCSSIGIDPLSLFDR-DKHLFTVNDFYEEVCLKVIIEICRQTKDMNNGGVISFOELEKVHFR 125

EhVps22/1-237 126 KRKS...IIRQNDIFKANQAKCLGEGLVVTIYQSYVIVSPPFELADQQVVLTLNKKPFLEDEL-LIIGMSKERVGTWVLLNIGMLVDDDFLDGKTTRAYWTSLYNLF..... 237
HbVps22/1-268 131 GRGKFAQDVSDDLIRAKKLAALGTGFGIIPVGGTYLIQSVPAELNMDHTVVLDIAEKNGYVTVSEIKASLKWETERARQVLEHLLKEGLAWLDLQARGE....AHYWLPAFTDLYSQEITAEAREA 258
ScVps22/1-233 126 KL...-NVGLDDLEKSDMLKSL-ECFEIIFDRGKFLRSVFNELTSDTKILEICSLGYSISLLKANLGEAVRSKALDEMVAAGLLWIDYDGGAE....ALYWDPSWITRQL..... 233

EhVps22/1-237 ..
HbVps22/1-268 257 LP
ScVps22/1-233 ..
  
```

B

% Identidad	HsVps22	ScVps22
EhVps22	33%	28%

Figura 12.- Alineamiento *in silico* de las secuencias de EhVps25. A) Comparación de la secuencia de EhVps25 con *Homo sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae*. B) Porcentajes de identidad de la secuencia de EhVps25 con respecto a *H. sapiens* y *S. cerevisiae*. Número de acceso: EHI_137860.

A

```

EhVps25/1-171 1..MTFGIREFAKFPFFYTIDLVDKTKNQDLQLNSQLILKYCEIKKPIKQSEF.....NKLPIFHNEELHRTLSENGELVKEFMVNNKIIDLN.....KSSKILLYKPL101
HsVps25/1-176 1MAMSEWPMQYRFPFFFLQPNVDRQKDLAANCSLVLSFCRLHQSSMTVMEA.....QESPLFNVKLQKLPVESQIVLEELRKKQNLW.....LDKSKSFLIMWRRP104
ScVps25/1-202 1..MSALFPVYSFPPLYTRQPNLSLRQQISTWIDIIISQYCKTKIWMYMSVDGTVINDNELDSGSDNDSDSKKISKNLNEDIDRSVQVFIDEIWSQMTKEGKCLPIDQSGRRSNTTTRYFLLWKS128

EhVps25/1-171 102REWGKELYEYGNKQLIGQSDTFFSIENDKESV...FYQMDDELLIEGINSIKEQGKMKLVQHEGEYGFWLK..171
HsVps25/1-176 105EENGKLIYQWVSRSGQNNVFTLYELTNGEDTEDEEFHGLDEATLRLALQALQDEHKAEEIITVSDGRGVKFF..176
ScVps25/1-202 129DSWASLILQWFEDSGKLNQVITLYELSEGDETVNWFHRMPESLLYYCKPLCDNRATMLKDENDKVIKVV202

```

B

% Identidad	HsVps25	ScVps25
EhVps25	29%	20%

Figura 13.- Alineamiento *in silico* de las secuencias de EhVps36 de *E. histolytica*. A) Comparación de la secuencia de EhVps36 con la de *Homo sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae*. B) Porcentajes de identidad de la secuencia de EhVps36 con respecto a *H. sapiens* y *S. cerevisiae*. Número de acceso: EHI_045320.

A

```

HsVps36/1-386 1 .....MDFRVWTSGLLEINETLVIQQR..... 22
ScVps36/1-566 1MEYWHYVETTSSGQPLLREGKDI FIDQSVGLYHGKSKILQQRGRIFLTSQR I IYIDDAKPTQNSLGLLEDDLAYVNYSSGFLTRSPRLILFFKDPSSKDELGKSAETASADVSTWVCPICMVSNETQ 130
EhVps36/1-235 .....

HsVps36/1-386 23 .....GVRIY.....D...GEEKIKF...DAGTLLSTHRLIWRD...QKNHECCMAIL.....LSQIVF.....IEEQAAIGKSAKIVVHLHPAPPNKEPQPFQSSK 102
ScVps36/1-566 131GEFTKDTLPTPICINCGVPADVELTKSSINCSNAIDPNANPQNF...GVNSENICPA-CTFANHPQIGNCEICGHR...PNASKVRSKLNRLNFHDSRVHIELEKNSLARNK.....SSHSA LSSSSSTGSS 252
EhVps36/1-235 .....

HsVps36/1-386 103NSYIKLSFKEHGQIEFYRRLSEEM...TQ...RRWE...NMPVSQLQTNRGP.....DPGRIRAVGIVGIERKLEEKRKETDKNISEAFEDLSKLMIKAKEMVELSKSIANKIKDK...QGD I 209
ScVps36/1-566 253TEFVQLSFRKSDGVLFSQATERALENILETEKNKHIFNQNVVSVNGVDMRKGASSHEYNNNEVPFIEETKLSRIGISSLEKSRNQLLNNDILFNNALTDLNKMLSLATSIERLYKNSNITMKTTLNLQDES 382
EhVps36/1-235 1.....MSNR.....D.....YGIKSYIEAKEKQDNDIDNLFSAFESLDTVIQYWQDLQKV...ATKFL.....KESN 56

HsVps36/1-386 210TEDETIRFKSYLLSMGIANPVTRETYGSGTQYHMLAKQLAGILQVPL...E-ERGGIMSTEYVCLVNRAR...GMELLSPELVNACKMLEALKPLR...RVFDSGVMVIELQSHK...EEMVASALE 329
ScVps36/1-566 383TVNEPKT-RRPLLILDREKFLNKELF.....LDEIAREIYEFLLSEFKDLNSDTNYMIITLVLDLYAMYKSMRIGTGLISPMEMREACERFEHLGLNELKLVKVNKRILCVTSEKFDVVKEKLVDLIGD 505
EhVps36/1-235 57MEKENHEYQSLITYLDITEPVTKKLFQNNYEE--ALMDEIDFCYLYF...QKKKEMAIMLSDLYAIYNRAR...GI-LISPKELRNVCLELNDKQKVV-GLMNVNKSIIHE-RDET-LEKFQNTILD 173

HsVps36/1-386 330.....TVSEKGSLTSEEFKLVGMSVLLAKERLLLAEKMGHLCRDSDVEGLRFYPLFMQSD..... 386
ScVps36/1-566 506NPGSDLRLRLDILSNNSKSNW--TLGLMEVLQNCVDEGLLIDKQLSDIYYKNSYWPISHI..... 566
EhVps36/1-235 174.....ALKSRQKISSFTIAQHYGIQYAI VQTLMDQLEQNELICRDEEEGIMYYENLFTQYLQYIK 235

```

B

% Identidad	HsVps36	ScVps36
EhVps36	26%	28%

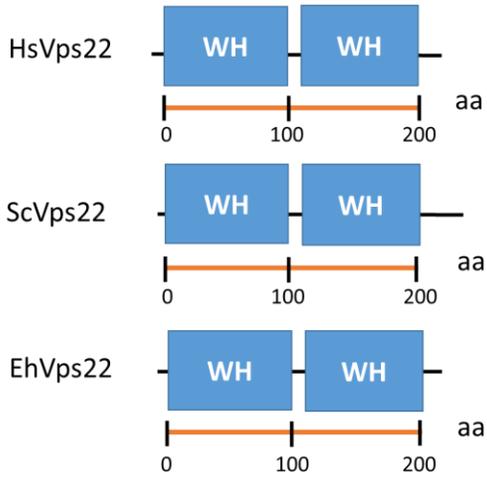
7.1.2 Búsqueda de dominios funcionales

El análisis de dominios indicó que EhVps22 contiene dos dominios WH (del inglés *Winged Helix*), característicos de las Vps's del ESCRT-II en los dos organismos de referencia utilizados, y que le podrían permitir interactuar con EhVps25. EhVps25 contiene también dos dominios WH en la región carboxilo terminal, que le podrían permitir interactuar con EhVps20 del ESCRT- III y un motivo PPXY, rico en prolinas, para interactuar con EhVps22 y EhVps36 formando el complejo en forma de "Y" invertida, característico del ESCRT-II. EhVps36 contiene dos dominios WH en el carboxilo terminal, mediante los cuales podría interactuar con EhVps25; sin embargo, no contiene el dominio GLUE, el cual en otros eucariontes le permite unirse a proteínas ubiquitinadas, anclarse a membrana endosomal y asociarse con el ESCRT-I (Figura 14).

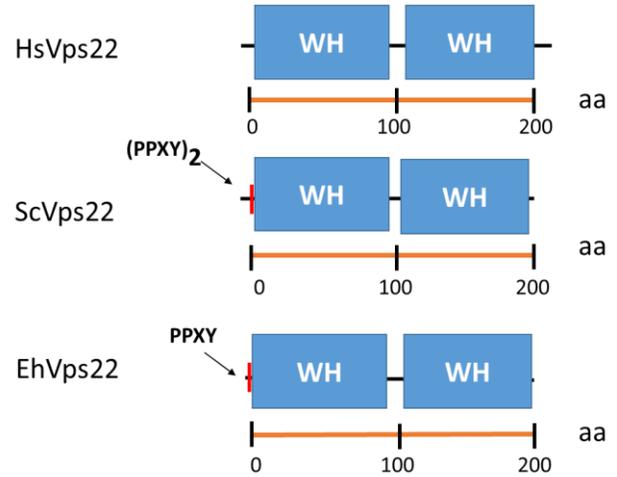
Figura 14.-Dominios de EhVps22, EhVps25 y EhVps36 en *E. histolytica*.

Comparación de los dominios de EhVps22, EhVps25 y EhVps36 con sus homólogos en *Homo sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae*. A) HsVps22, ScVps22 y EhVps22. B) HsVps25, ScVps25 y EhVps25. C) HsVps36, ScVps36 y EhVps36. Rectángulo azul: dominio WH (*Winged Helix*); barra roja: motivo rico en prolinas, PPXY; cuadrado amarillo: dominio GLUE (*GRAM-Like Ubiquitin-binding in EAP45*); barra azul: motivo de dedos de zinc.

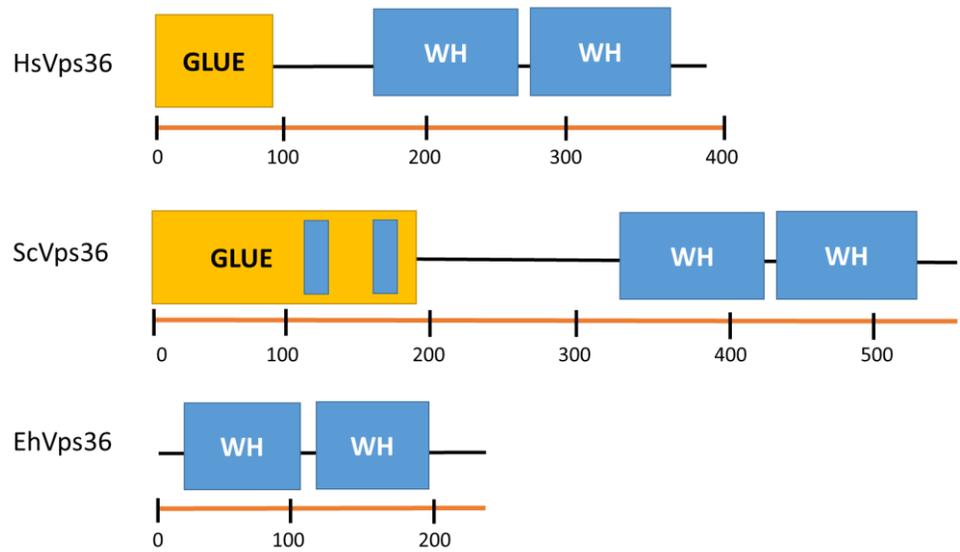
A
EhVps22



B
EhVps25



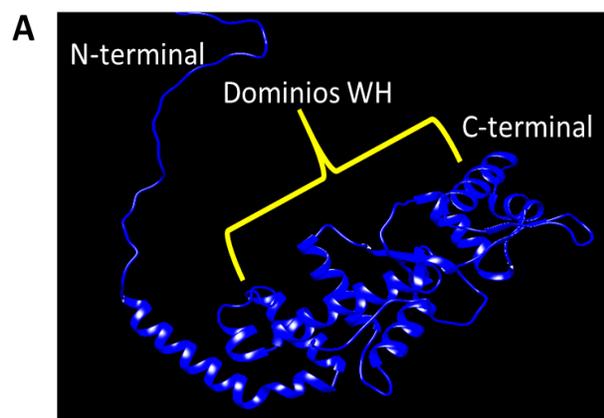
C
EhVps36



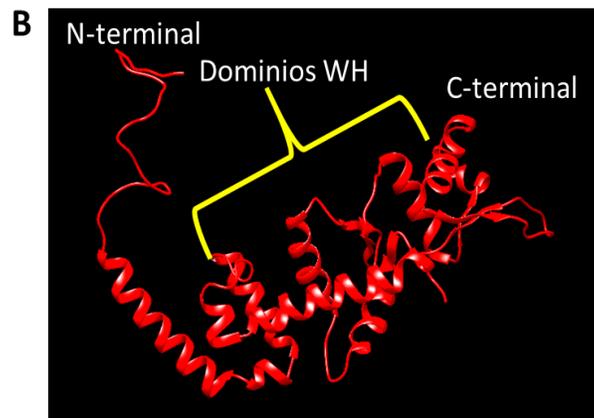
7.1.3 Análisis de la estructura terciaria del complejo ESCRT-II

Los análisis de las estructuras terciarias de las Vps's del ESCRT-II de *E. histolytica* mostraron una alta homología con los miembros del ESCRT-II de *Homo sapiens*. Los porcentajes de identidad estructural del ESCRT-II de *E. histolytica* son los siguientes: 87.5% para EhVps22, 98.3% para EhVps25 y 84.7% para EhVps36 (Figuras 15, 16 y 17). De acuerdo con los resultados anteriores, al realizar el empalme de las estructuras se observó que los dominios WH de EhVps22 y EhVps25 tienen la forma característica de "alas" coincidiendo con las de los organismos de referencia, como se muestra en las figuras 5 y 6. EhVps22 conserva las 9 α -hélices y 6 β -plegadas que conforman la Vps22 en *H. sapiens*. EhVps25 sólo cuenta con 8 α -hélices y 5 β -plegadas, sin embargo, conserva una estructura similar a la de HsVps25. Se realizó el empalme de los dominios WH de EhVps36 con la región homóloga a humano y se muestra que la estructura característica de estos dominios se conserva (Figura 17). Estos análisis no se llevaron a cabo para *S. cerevisiae* debido a que el porcentaje de identidad en secuencia (Figura 11, 12 y 13) fue mucho menor que en humano. Para obtener los porcentajes de identidad entre cada una de las estructuras se utilizaron los valores de TMscore obtenidos del análisis en el programa RaptorX, el cual representa un promedio de los alineamientos en MSA (Multiple Structure Alignment) de cada uno de los empalmes. Los valores de TMscore son los siguientes: 0.875 para Vps22, 0.983 para Vps25 y 0.847 para Vps36. El valor TMscore puede entrar en el rango 0-1, así que si el TMscore es mayor a 0.6, este indica que existe una probabilidad del 90% de que las dos proteínas compartan similitud en su estructura. Cuando el TMscore es menos de 0.4, este indica que existe mayor probabilidad (del 90%) de que dos proteínas tengan una conformación diferente.

Figura 15.- Análisis de la estructura terciaria de EhVps22. A) Estructura terciaria de Vps22 de *Homo sapiens*(HsVps22: azul). B) Estructura terciaria de Vps22 de *E. histolytica* (EhVps22: rojo). C) Empalme estructural entre HsVps22 y EhVps22. Al realizar el empalme de las estructuras se observa que los dominios WH de EhVps22 tienen la forma característica de “alas” coincidiendo con las de los organismos de referencia. EhVps22 conserva las 9 α -hélices y 6 β -plegadas que conforman la Vps22 en *H. sapiens*. Valor de TMscore: 0.875.



HsVps22



EhVps22

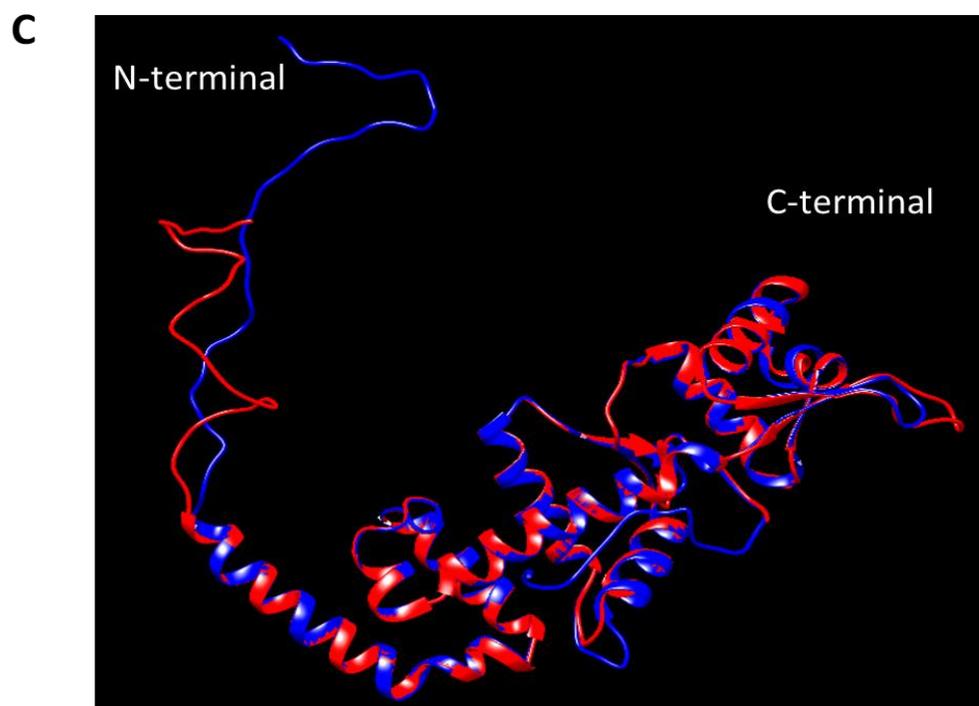
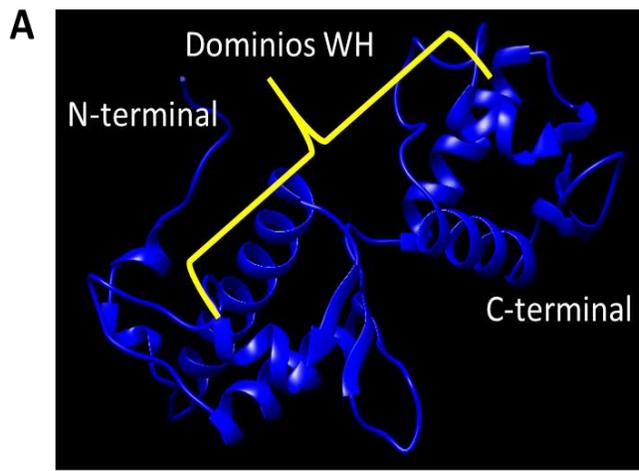
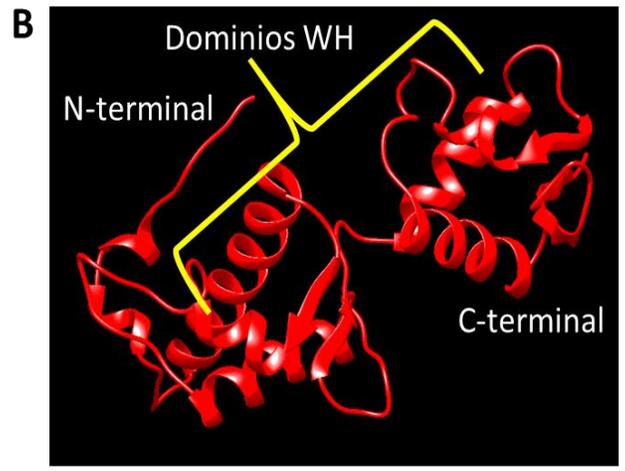


Figura 16.- Análisis de la estructura terciaria de Vps25 de *E. histolytica*. Estructura terciaria de Vps25 de *Homo sapiens* (HsVps25: azul). B) Estructura terciaria de Vps25 de *E. histolytica* (EhVps25: rojo). C) Empalme estructural entre HsVps25 y EhVps25. Al realizar el empalme se observa que los dominios WH de EhVps25 tiene la forma característica de “alas” coincidiendo con las de los organismos de referencia y como se muestra en las figuras. EhVps25 sólo cuenta con 8 α -hélices y 5 β -plegadas a diferencia de HsVps25 la cual contiene el mismo número de α -hélices, pero 6 β -plegadas, sin embargo, conserva una estructura similar a la de HsVps25. Valor de TMscore: 0.983.



HsVps25



EhVps25

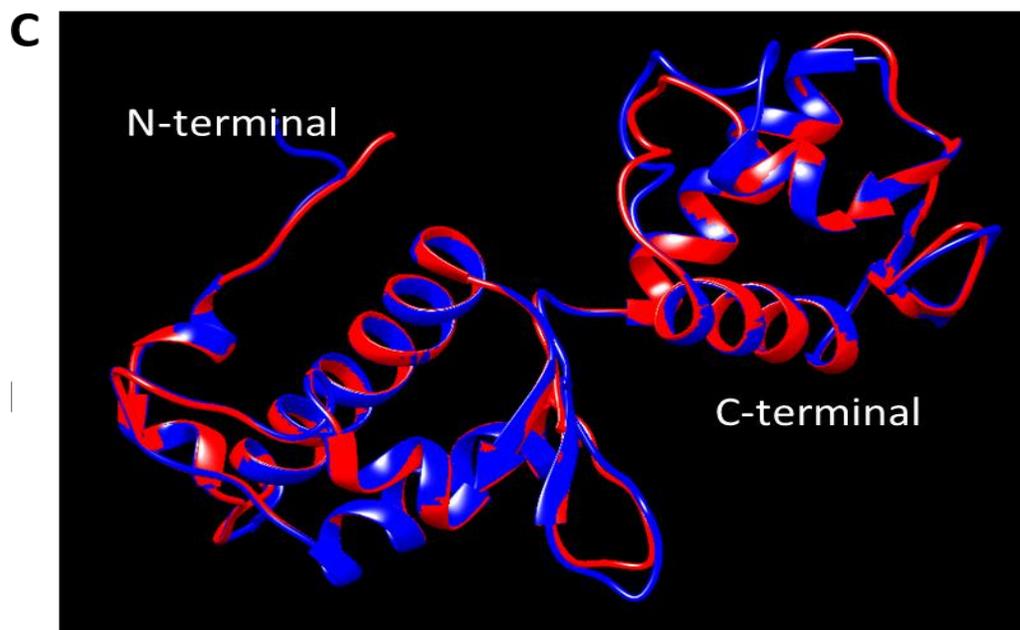
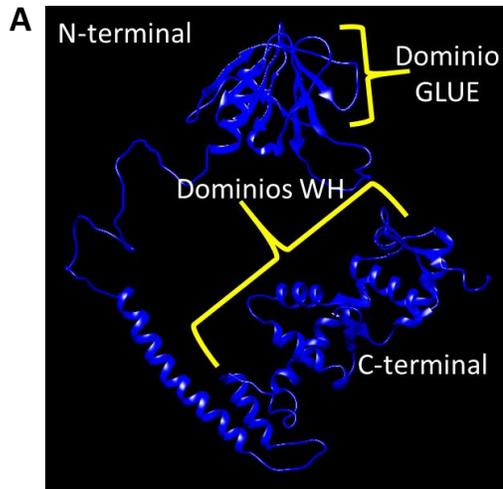
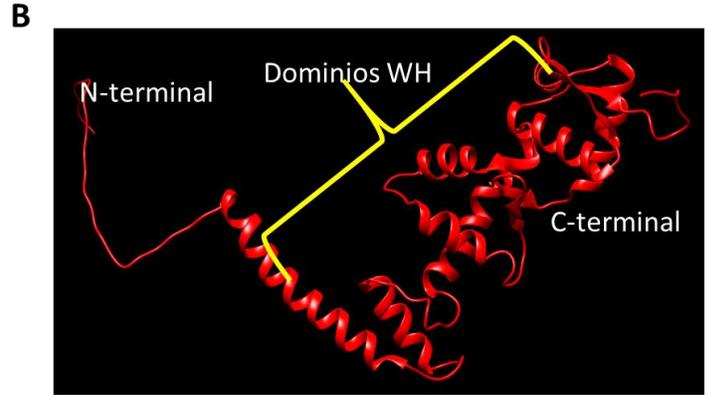


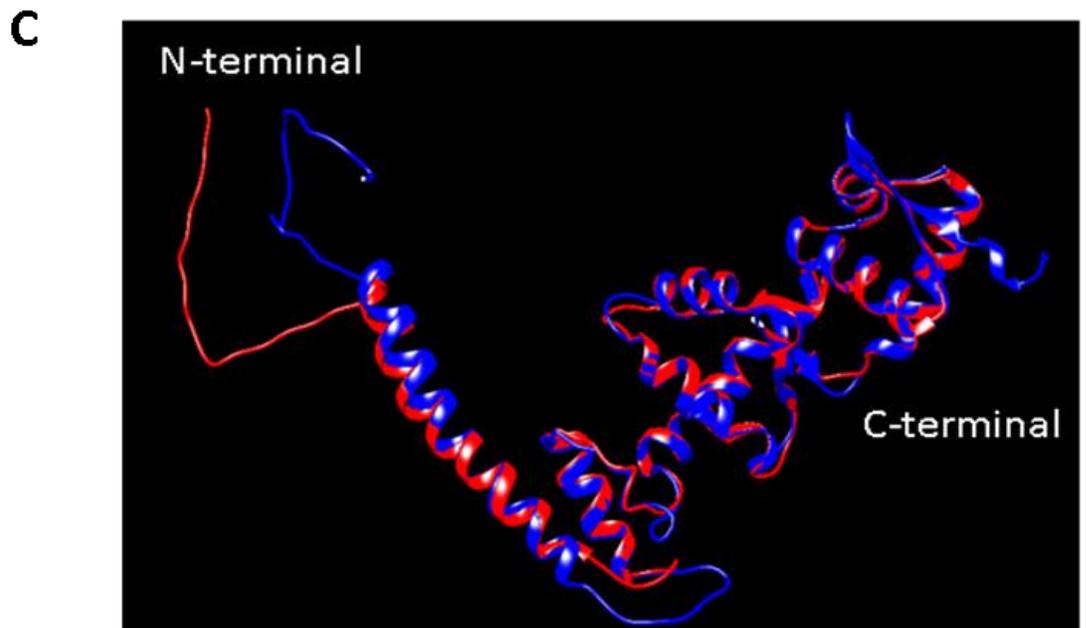
Figura 17.- Análisis de la estructura terciaria de Vps36 de *E. histolytica*. Estructura terciaria de Vps36 de *Homo sapiens* (HsVps36: azul). B) Estructura terciaria de Vps36 de *E. histolytica* (EhVps36: rojo). C) Empalme estructural entre los dos dominios WH de HsVps36 y EhVps36. Valor de TMscore de los dominios WH: 0.847.



HsVps36



EhVps36



7.1.4 Interacciones proteína-proteína *in silico* del complejo ESCRT-II

De acuerdo al análisis *in silico* de las posibles interacciones de EhVps22 con otras proteínas, EhVps22 puede interactuar con el componente Vps23 del ESCRT-I, con EhVps25 y EhVps36 del mismo complejo ESCRT-II, con EhVps2 y EhVps32 del ESCRT-III y, además, con las proteínas accesorias EhVps4 y EhADH112. Otras proteínas con las que hay probable interacción y que no se encuentran relacionadas a la maquinaria ESCRT, son las proteínas snRNP-F, la cual participa en el complejo del espliceosoma para la edición de pre-RNA; EhCaBP, una proteína de unión a calcio, que participa en la fagocitosis, y con Vps29 un probable componente del complejo retrómero (Figura 18).

Por otra parte, EhVps25 podría interactuar con Vps23 del ESCRT-I, con EhVps2 y EhVPS32 del complejo ESCRT-III, con las proteínas accesorias EhADH112 y EhVps4, y con las proteínas que conforman el complejo retrómero: Vps26, Vps29 y Vps35, el cual participa en el reciclaje de receptores transmembranales desde endosomas hacia la red *trans*-golgi (Figura 19). La proteína Vps36 en otros organismos puede interactuar mediante los dominios WH con Vps22 y Vps25. Para determinar si esta proteína podría ser funcional sólo teniendo estos dominios, también se realizó el análisis de interacción *in silico*. Los resultados indican una probable interacción de EhVps36 con EhVps22 y EhVps25 (ESCRT-II), EhVps20 y EhVps32 (ESCRT-III), así como con proteínas no relacionadas a la maquinaria ESCRT (EhVps35 y proteínas hipotéticas). De manera interesante, EhVps36 también podría interactuar con EhVps23 del complejo ESCRT-I (Figura 20).

Figura 18.- Análisis de interacción *in silico* para EhVps22. EhVps22 (círculo rojo) interactúa con las proteínas del ESCRT-II, ESCRT-III, proteínas accesorias, y proteínas no relacionadas a la maquinaria ESCRT. De acuerdo al programa STRING, las líneas púrpuras representan interacciones que se han determinado experimentalmente; en color azul, se representan las interacciones que han sido obtenidas desde bases de datos donde han sido confirmados biológicamente. Las líneas color verde representan interacciones respaldadas de una búsqueda de alta calidad, derivada de la elaboración de patrones y tendencias a través de medios estadísticos. Las líneas de color negro sugieren la co-expresión de dos proteínas. La longitud de las líneas representa las asociaciones específicas y significativas entre una proteína y otra, es decir las proteínas contribuyen conjuntamente a una función compartida, sin embargo, no necesariamente habrá un contacto físico entre ellas.

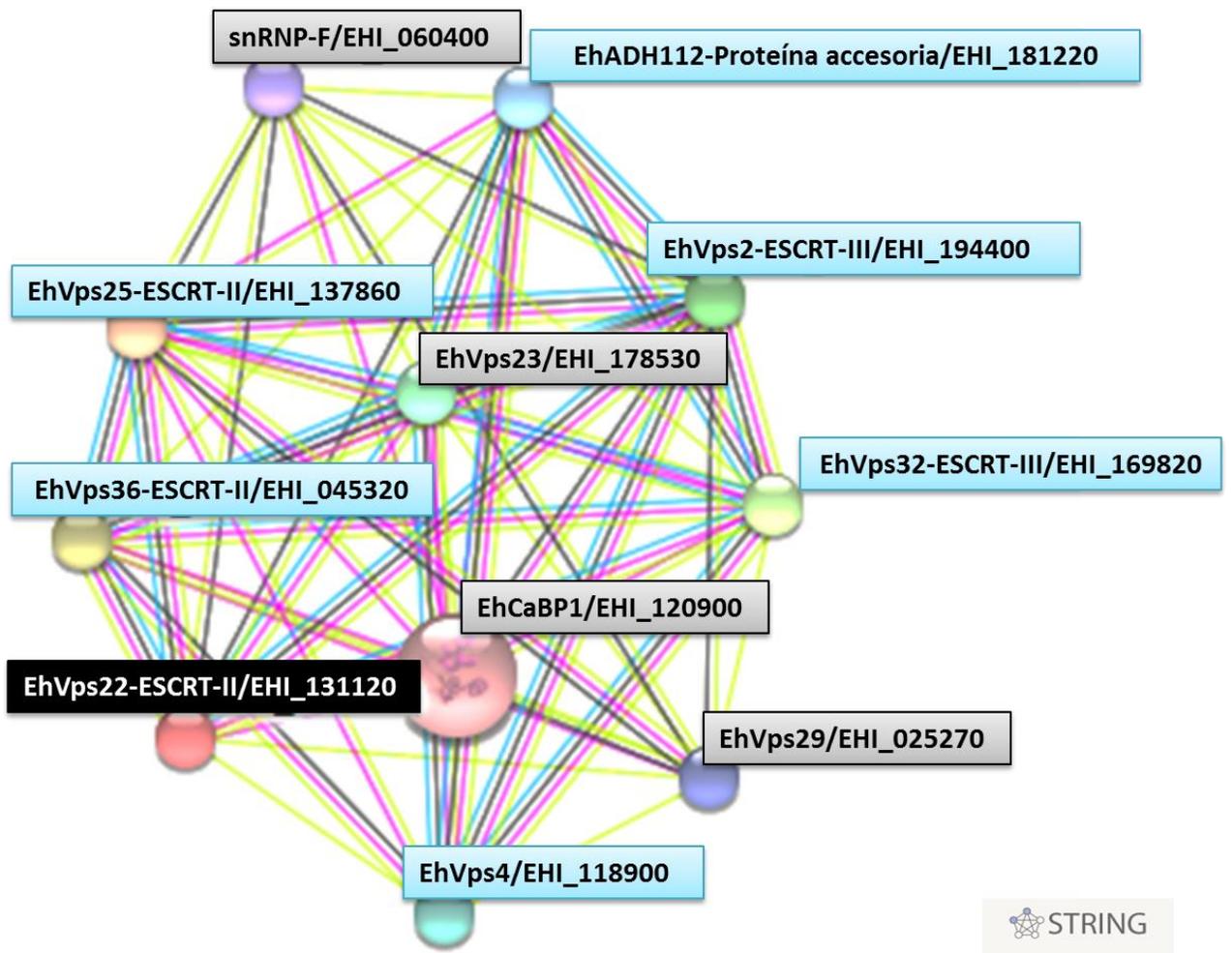


Figura 19.- Análisis de interacción *in silico* para EhVps25. EhVps25 (círculo rojo) interactúa con las proteínas del ESCRT-II, ESCRT-III, proteínas accesorias, y proteínas no relacionadas a la maquinaria ESCRT. De acuerdo al programa STRING, las líneas púrpuras representan interacciones que se han determinado experimentalmente; en color azul, se representan las interacciones que han sido obtenidas desde bases de datos donde han sido confirmados biológicamente. Las líneas color verde representan interacciones respaldadas de una búsqueda de alta calidad, derivada de la elaboración de patrones y tendencias a través de medios estadísticos. Las líneas de color negro sugieren la co-expresión de dos proteínas. La longitud de las líneas representa las asociaciones específicas y significativas entre una proteína y otra, es decir, las proteínas contribuyen conjuntamente a una función compartida, sin embargo, no necesariamente habrá un contacto físico entre ellas.

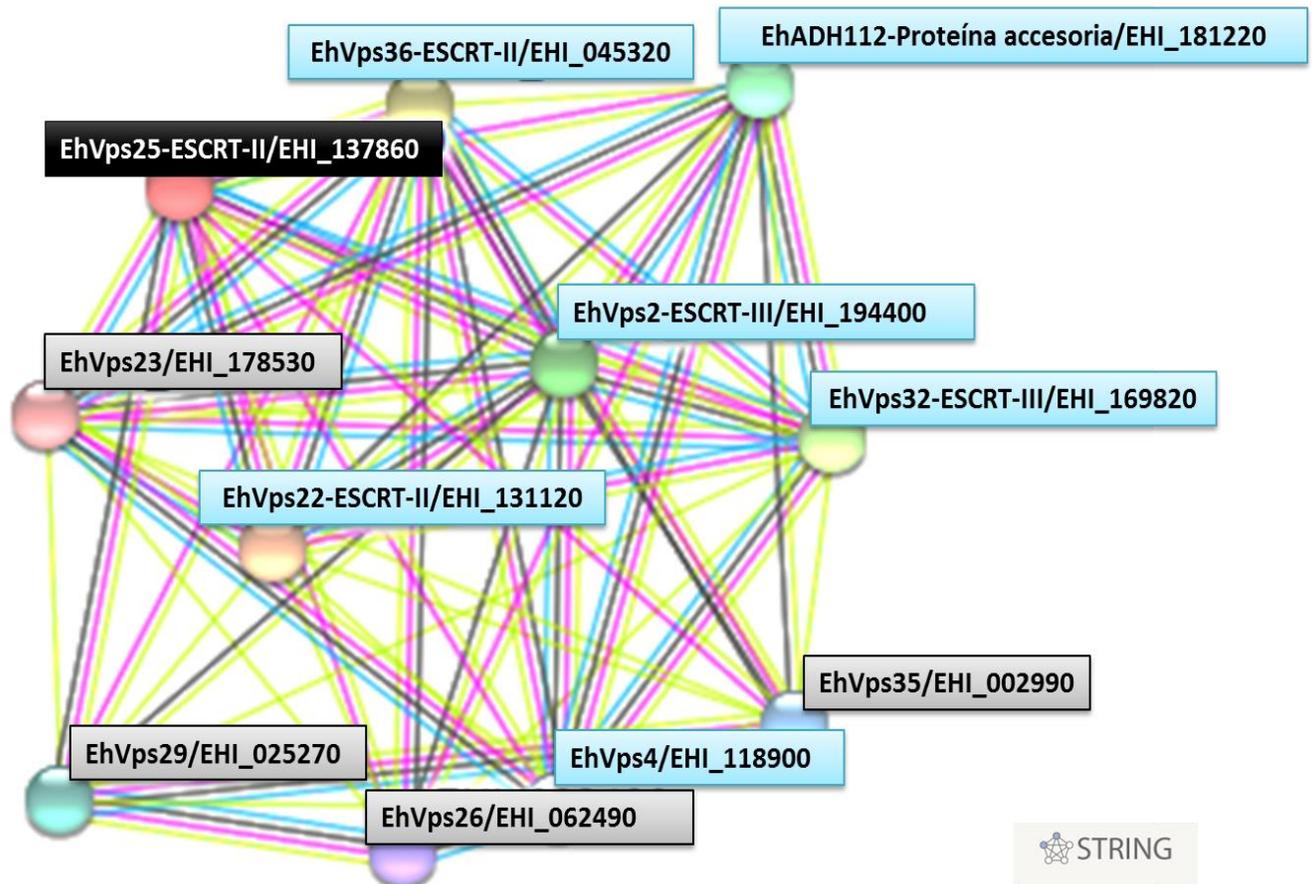
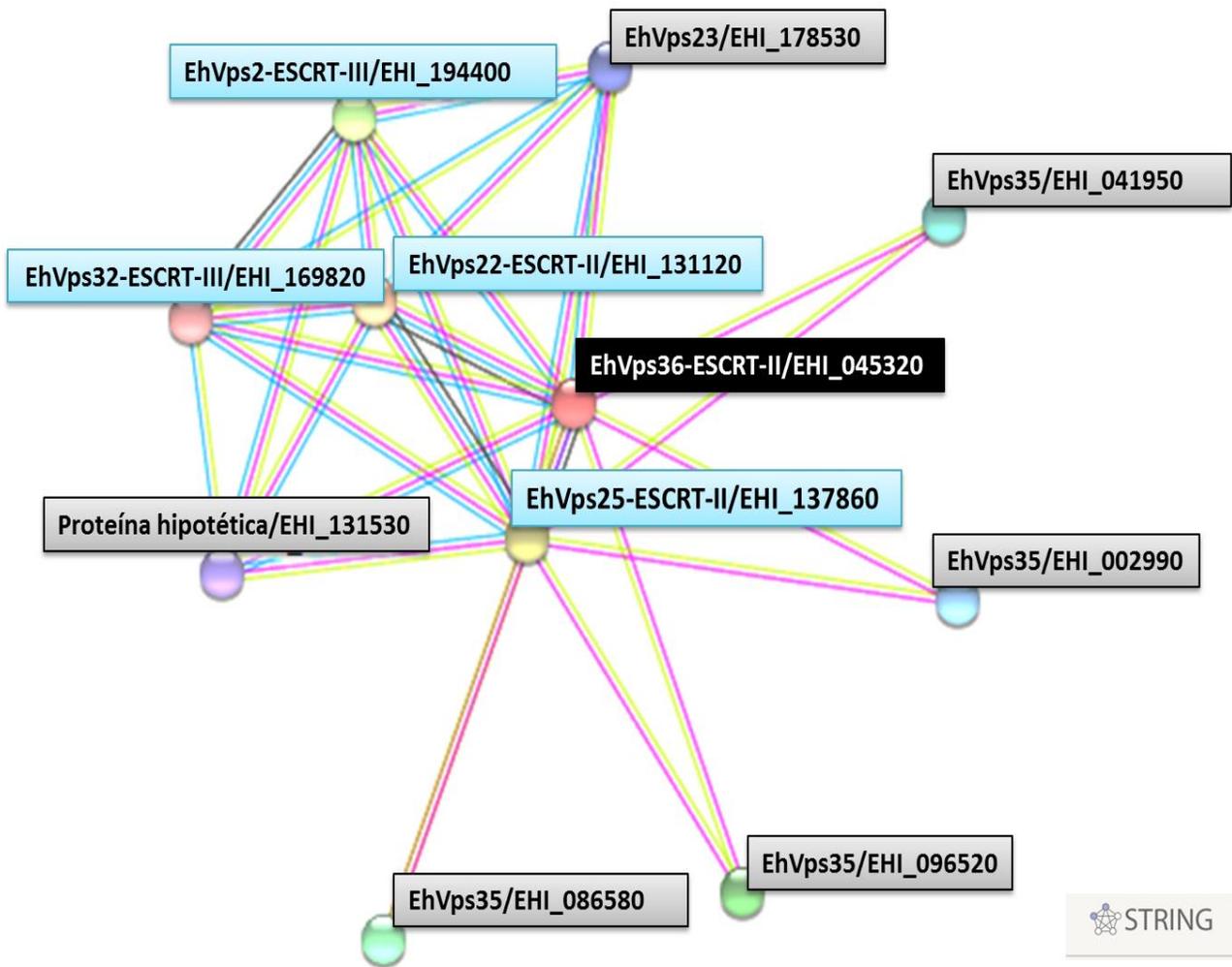


Figura 20.- Análisis de interacción *in silico* para EhVps36. EhVps36 (círculo rojo) interactúa con las proteínas del ESCRT-II: EhVps22 y EhVps25, además de proteínas del ESCRT-III: EhVps2 y EhVps32. Por otro lado, EhVps36 puede unirse a proteínas no relacionadas a la maquinaria ESCRT como EhVps35 y una proteína hipotética. De acuerdo al programa STRING, las líneas púrpuras representan interacciones que se han determinado experimentalmente; en color azul se representan las interacciones que han sido obtenidas desde bases de datos donde han sido confirmados biológicamente. Las líneas color verde representan interacciones respaldadas de una búsqueda de alta calidad, derivada de la elaboración de patrones y tendencias a través de medios estadísticos. Las líneas de color negro sugieren la co-expresión de dos proteínas. La longitud de las líneas representa las asociaciones específicas y significativas entre una proteína y otra, es decir las proteínas contribuyen conjuntamente a una función compartida, sin embargo, no necesariamente habrá un contacto físico entre ellas.



7.1.5 SUMOilación en ESCRT-II de *E. histolytica*

Dado que EhVps36 no contiene el dominio GLUE, el cual permite la unión a proteínas cargo ubiquitinadas, a fosfolípidos y a Vps28 del ESCRT-I, realizamos la búsqueda en diferentes trabajos para averiguar de qué otra manera EhVps36 podría ejecutar este papel tan importante. De acuerdo a la literatura, la maquinaria ESCRT no sólo se recluta a través de proteínas ubiquitinadas, si no también mediante la SUMOilación de proteínas cargo, tal es el caso de salida de la α -sinucleína al medio extracelular (Kunadt y col., 2015).

Mediante herramientas bioinformáticas para la predicción de esta modificación post-traducciona, se determinó que las proteínas de la maquinaria ESCRT en *E. histolytica* así existe la SUMOilación. Este análisis muestra que la mayoría de las proteínas del complejo ESCRT (Tabla 2), hasta ahora estudiadas, pueden ser modificadas por la proteína SUMO y además que pueden contener motivos SIMs, del inglés *SUMO Interaction Motifs* (Figura 21). Debido a que la SUMOilación se lleva a cabo en los sitios de lisina, al igual que la ubiquitinación, también realizamos el análisis *in silico* de posibles sitios de ubiquitinación en la maquinaria ESCRT con la finalidad de descartar que fueran los mismos aminoácidos los que se modificaran postraducciona, por ambas proteínas. El resultado de este análisis arroja que, a excepción de tres sitios, todas las lisinas que pueden SUMOilarse no son las mismas que pueden ser marcadas por ubiquitina en la maquinaria ESCRT de amiba (Tabla 3). Con este análisis, comprobamos que la modificación postraducciona en ambos casos es específica.

EhVps22 contiene dos motivos SIMs y un sitio de SUMOilación, con los cuales podría interactuar con proteínas cargo o proteínas Vps SUMOiladas y con fosfolípidos de membrana a través de estos sitios, respectivamente. EhVps25 tiene un sitio de SUMOilación (Figura 21) en la lisina del carboxilo terminal y además un sitio SIM en el aminoácido 98 (Tabla 2), el cual sugiere que esta proteína podría interactuar con la membrana endosomal y con proteínas cargo SUMOiladas mediante estos dominios, respectivamente. En Vps36 se identificó un

sitio de SUMOilación en la última lisina en carboxilo terminal (Tabla 2; Figura 21), el cual le podría permitir también el anclaje a membrana endosomal, sin embargo, no se encontró ningún sitio SIM, por lo que no podría interactuar con proteínas SUMOiladas. En otros organismos se ha reportado que Vps36 interactúa con Vps28 del ESCRT-I, pero ya que Vps28 no fue identificada en amiba, se analizó la existencia de algún sitio de SUMOilación o sitio SIM en EhVps23, una Vps que pertenece al ESCRT-I y que ya ha sido identificada y estudiada en *E. histolytica* (Galindo-Olea, 2015; López-Reyes, 2010). Se encontró que EhVps23 tiene un sitio SIM en el carboxilo terminal (Tabla 2; Figura 21), el cual probablemente interactúa con SUMO en Vps36; lo anterior podría sugerir un vínculo entre ESCRT-I y ESCRT-II.

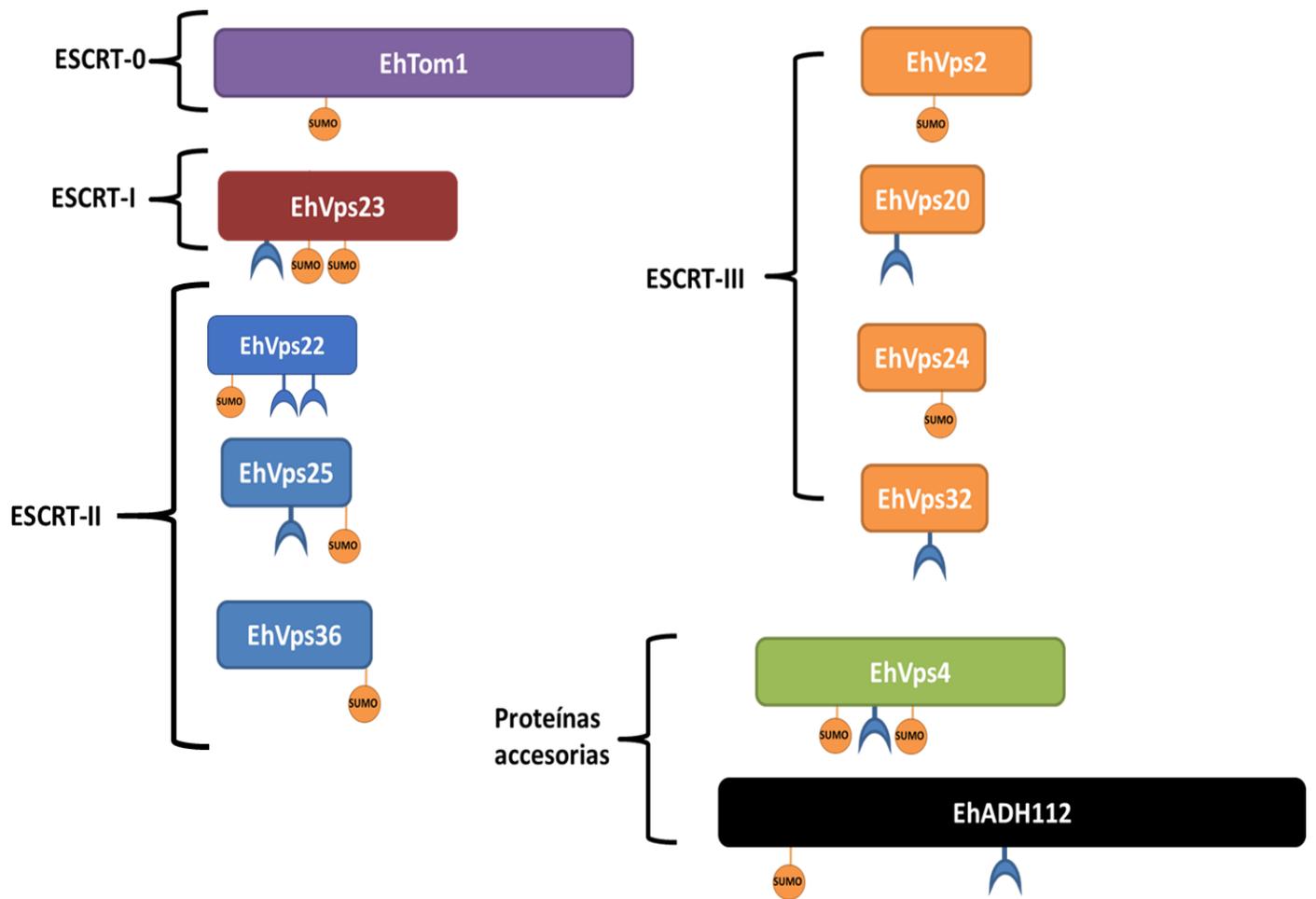
Tabla 2.- Análisis de SUMOilación y sitios SIM en la maquinaria ESCRT de *E. histolytica*. Se detallan los resultados obtenidos del programa GPS-SUMO 1.0 (<http://sumosp.biocuckoo.org/>) para la predicción de sitios de SUMOilación y sitios SIM.

	Proteína	Posición	Péptido/secuencia	Score	Tipo	Tamaño de proteína
ESCRT-0	EhTom1	99	SEGMEIVKHKHPEVDE	37.628	SUMOilación	494 aa
ESCRT-I	EhVps23	91-95	TTIECPE LIDLY STSAWQD	61.875	SIM	284 aa
	-	203	ILELEQLKEDMEIKE	44.401	SUMOilación	-
	-	214	EIKEIIFKLEKAQPI	18.002	SUMOilación	-
ESCRT-II	EhVps22	41	QINLFKLLKEEFLQN	26.79	SUMOilación	237 aa
		113-117	SRESNGGIIIEINKLCELIN	63.03	SIM	-
		150-154	AKCLGEGGLKVVTIYQQSYV	64.6	SIM	-
	EhVps25	171	EYGIFWLK****	38.326	SUMOilación	171 aa
		94-98	DLNKSSK LILLY KPLREWG	56.532	SIM	-
	EhVps36	235	TQYLQYIK***	41.096	SUMOilación	235 aa
ESCRT-III	EhVps2	117	RKVNEATKLPAMQKV	24.671	SUMOilación	246 aa
	EhVps20	32-36	VTDLQK IVDLD RQIRQNI	65.754	SIM	206 aa
	EhVps24	176	EGGIEAVKNEVIAES	43.439	SUMOilación	205 aa
	EhVps32	133-137	NNEKSHE IGDLL GEDLQDI	64.005	SIM	204 aa
Accesorias	EhVps4	78	MISGERVKSDDPDKE	45.994	SUMOilación	419 aa
	-	128-132	EALQEAV ILPIK FPQLFTD	59.356	SIM	-
	-	231	TEASRRVKTEFLVQM	41.814	SUMOilación	-
	EhADH112	154	QAAGAFQKAADCAQL	25.68	SUMOilación	687 aa
	-	366-370	EYNSKAQ VILND SKKCES	58.036	SIM	-

Tabla 3.- Comparación de los sitios de ubiquitinación y SUMOilación en las proteínas de la maquinaria ESCRT. Se detallan los posibles sitios de ubiquitinación en las proteínas de esta maquinaria predichos a partir del programa *Ubsite* (<http://csb.cse.yzu.edu.tw/UbiSite/>).

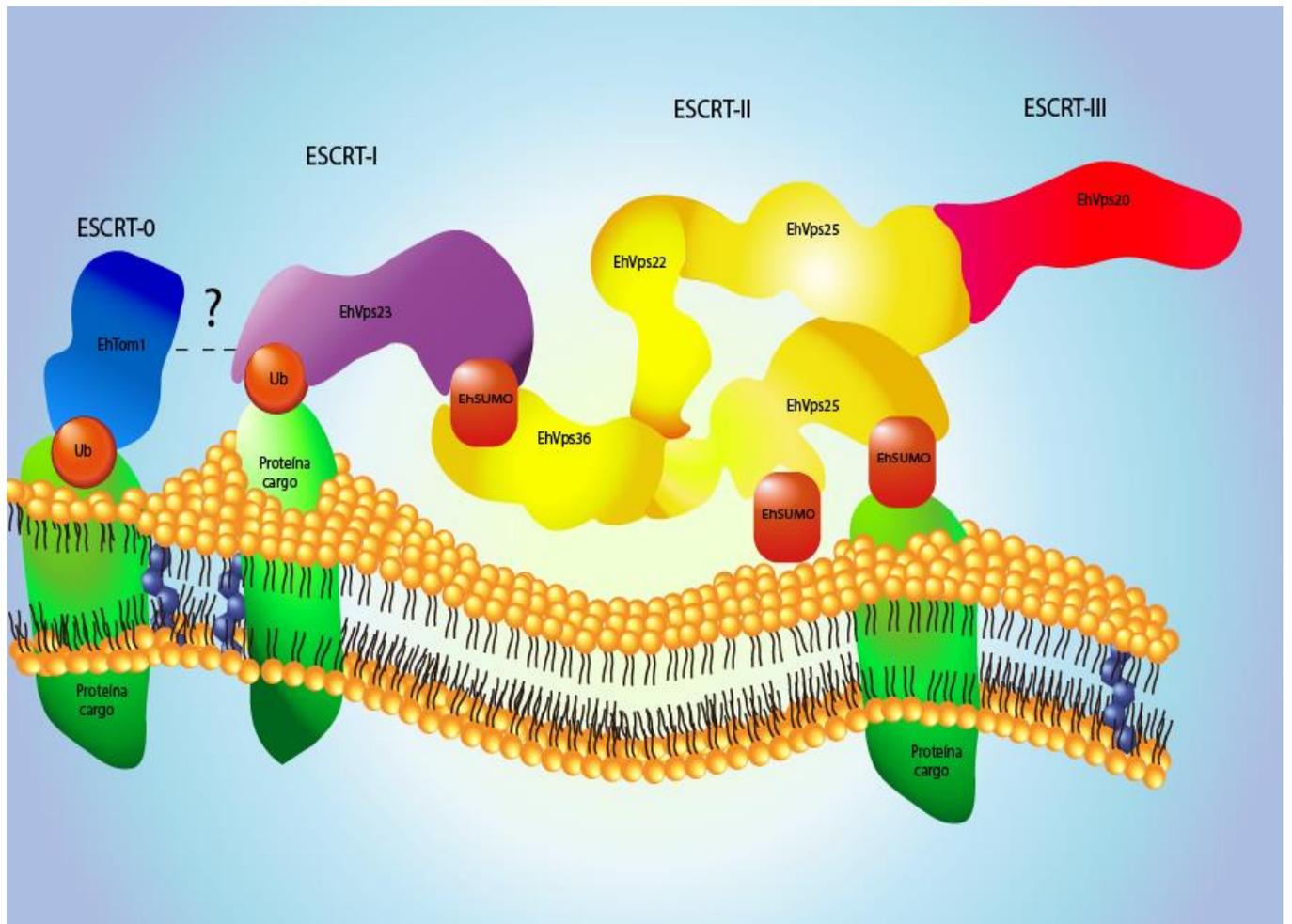
Proteína	¿Sitios ubiquitinación coinciden con los de SUMOilación?	Posición (aa)	Especificidad
EhTom1	-	-	-
EhVps23	-	-	-
EhVps25	-	-	-
EhVps36	-	-	-
EhVps2	X	117 aa	86.2 %
EhVps20	-	-	-
EhVps24	-	-	-
EhVps32	-	-	-
EhVps4	X	78 aa	86.2 %
EhADH112	X	154 aa	86.2 %

Figura 21.- Sitios de SUMOilación y sitios SIMs en la maquinaria ESCRT de *E. histolytica*. EhVps25 cuenta con un dominio de SUMOilación (círculo naranja) en la región carboxilo terminal y con un motivo SIM (copa invertida azul fuerte), que le permite el contacto con proteínas cargo SUMOiladas. EhVps36 de *E. histolytica* tiene un sitio de SUMOilación en la última lisina del carboxilo terminal, donde la proteína SUMO puede unirse (círculo naranja). EhVps23 de *E. histolytica* contiene en el carboxilo terminal un motivo SIM el cual podría interactuar con SUMO de EhVps36.



De acuerdo a los resultados *in silico*, mencionados anteriormente se puede integrar toda la información en un modelo hipotético (Figura22), el cual muestra a EhVps23 interactuando con ubiquitina y por otro lado con SUMO, esta última interacción le permite a EhVps23 el contacto con EhVps36, quien tiene un sitio de SUMOilación, esto representa el vínculo entre los complejos ESCRT-I y ESCRT-II. La SUMOilación de EhVps25 podría permitir el contacto con fosfoinositoles de membrana endosomal, anclando así el complejo a la membrana, además contiene un motivo PPXY, que le permite el contacto con EhVps36 y un motivo SIM, el cual le permiten el anclaje a la membrana por el contacto con proteínas cargo SUMOiladas para la formación de las vesículas intraluminales. EhVps25 permite el vínculo entre ESCRT-II y ESCRT-III, ya que sus dos dominios WH podrían interactuar con EhVps20.

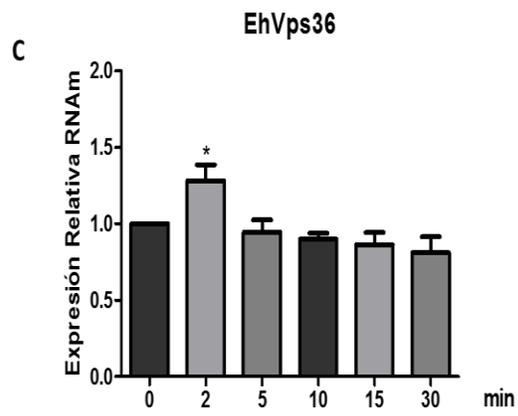
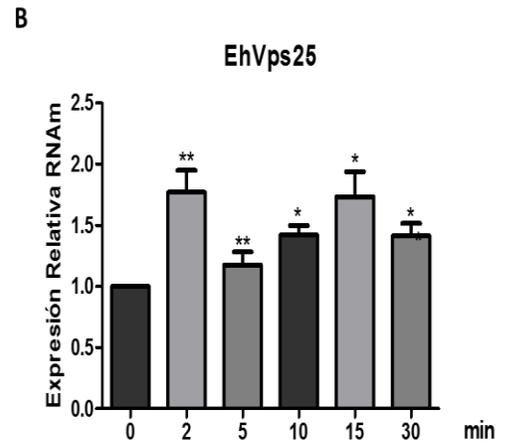
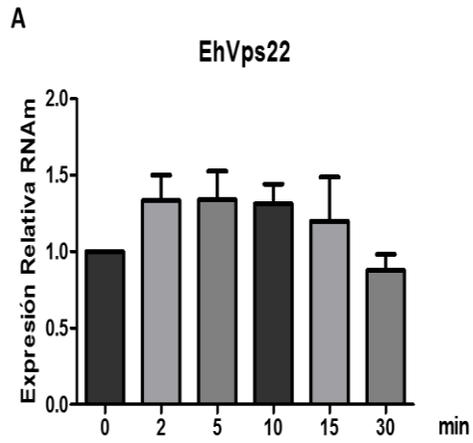
Figura 22.- Modelo hipotético de interacción del ESCRT-II con complejos ESCRT-I y ESCRT-II de la maquinaria ESCRT en *E. histolytica*. La maquinaria ESCRT-II vincula al ESCRT-I con el ESCRT-III y se ancla a membrana e interactúa con las proteínas cargo (verde) a través de la SUMOilación (rectángulo café). ESCRT-0 (azul); ESCRT-I (morado); ESCRT-II (amarillo); ESCRT-III (rojo); ubiquitina (círculo café).



7.2 Niveles de ARNm de los genes de la maquinaria ESCRT-II en *E. histolytica*

Para analizar la participación de los genes de la maquinaria ESCRT-II durante la fagocitosis, primero se diseñaron iniciadores para cada gen de la maquinaria (Tabla 1). Posteriormente, se realizaron ensayos de RT-qPCR (Figura 23) a partir del ARNm obtenido y los datos recolectados fueron analizados mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se usaron el gen S2 *eh40s* y la condición basal para normalizar los resultados. El *gen ehvps22* no mostró cambios significativos en la expresión de ARNm en los diferentes tiempos de eritrofagocitosis (2, 5, 10, 15 y 30 min) con respecto a la condición basal. En cambio, la transcripción del *gen ehvps25* aumentó significativamente desde los 2 min de eritrofagocitosis con respecto a la condición basal y aunque en los tiempos de 5, 10, 15 y 30 min la expresión varía, los niveles de ARNm siempre se matuvieron significativamente superiores a los de la condición basal. Los niveles de ARNm para el *gen ehvps36* aumentaron significativamente a los 2 min con respecto a la condición basal, sin embargo, estos niveles descendieron a partir de los 5 min y hasta los 30 min la expresión se mantuvo similar a la condición basal.

Figura 23.- Expresión relativa de los genes de la maquinaria ESCRT-II durante la eritrofagocitosis en *E. histolytica*. Los niveles de ARNm durante 0, 2, 5, 10, 15 y 30 minutos de eritrofagocitosis fueron determinados por ensayos de RT-qPCR y los datos obtenidos fueron analizados con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando como normalizadores el gen 40s ribosomal y el estado basal o tiempo 0. A) Valores obtenidos para el gen *ehvps22*. B) Valores obtenidos para el gen *ehvps25*. C) Valores obtenidos para el gen *ehvps36*. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes por duplicado y cada uno con su réplica técnica. La significancia estadística fue determinada por el *T student test*. Nivel de significancia de las pruebas estadísticas: * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; ns = no significativo.



7.3 Localización y expresión de las proteínas EhVps25 y EhVps36 del complejo ESCRT-II en *E. histolytica* durante la endocitosis.

7.3.1 Producción de anticuerpos policlonales.

Se obtuvieron anticuerpos policlonales a partir de péptidos diseñados *in silico* de la secuencia de las proteínas EhVps25 (Figura 24) y EhVps36 (Figura 25). Los animales de experimentación utilizados fueron rata y conejo, de los cuales se obtuvo el suero preinmune y se obtuvo el suero del sangrado final se realizó la titulación de anticuerpos, usando diluciones 1:1000, 1:2000 y 1:3000 (Figura 26). En esta última dilución los anticuerpos α -EhVps25 identificaron una banda de 59 kDa (Figura 26 A) y los anticuerpos α -EhVps36 detectaron una banda de 46 kDa, sin embargo, los pesos esperados eran de 20 kDa y 28 kDa respectivamente (Figura 26 B).

Figura 24.-Diseño de péptido de EhVps25. El diseño del péptido para EhVps25 se realizó mediante análisis *in silico*, utilizando la herramienta bioinformática BCEpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/bcepred/>) y evaluando diferentes propiedades de la secuencia de la proteína. A) Información general acerca del péptido diseñado. B, C y D) Tres tomas diferentes del péptido (verde) dentro de la estructura terciaria de la proteína EhVps25 (rojo).

A	Proteína	Secuencia	Tamaño	Posición	Score
	EhVps25	KGLIGQSDTFFSIEND	16 aa	115-131 aa	0.90

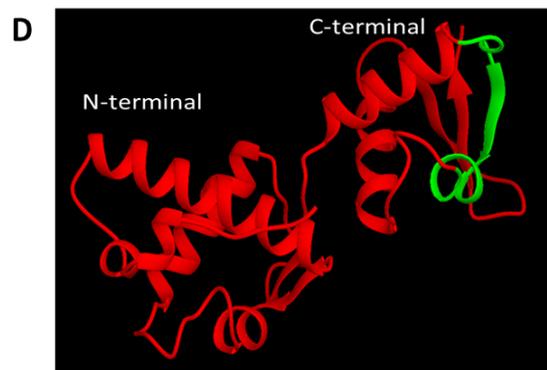
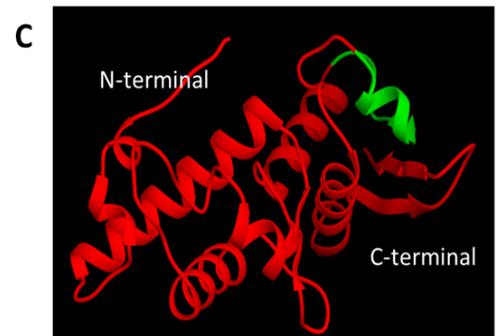
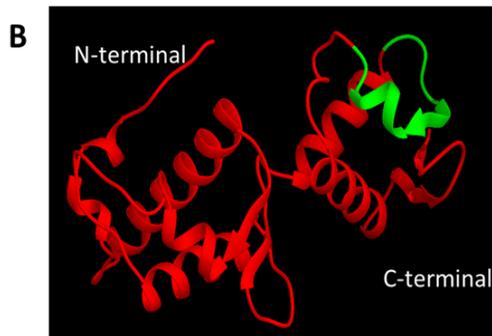


Figura 25.- Diseño de péptido de EhVps36. El diseño del péptido para EhVps36 se realizó mediante análisis *in silico*, utilizando la herramienta bioinformática BCEpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/bcepred/>) y evaluando diferentes propiedades de la secuencia de la proteína. A) Información general acerca del péptido diseñado. B, C y D) Tres tomas diferentes del péptido (verde) dentro de la estructura terciaria de la proteína EhVps36 (rojo).

A

Proteína	Secuencia	Tamaño	Posición	Score
EhVps36	QLEQNELICRDESEEG	16 aa	203-219 aa	0.997

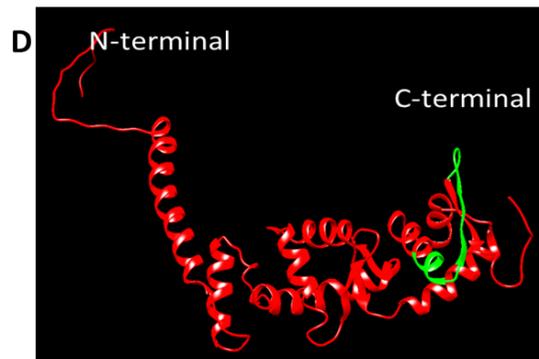
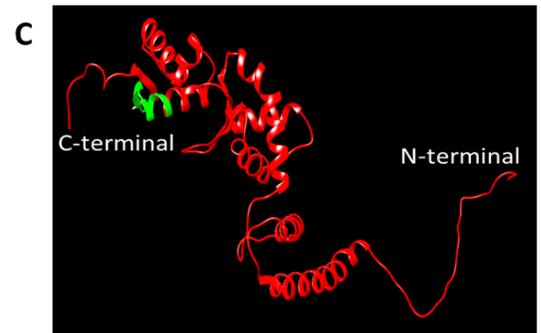
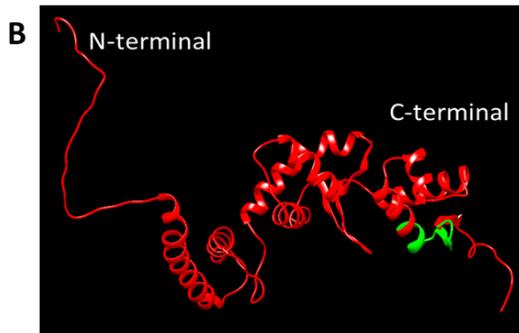
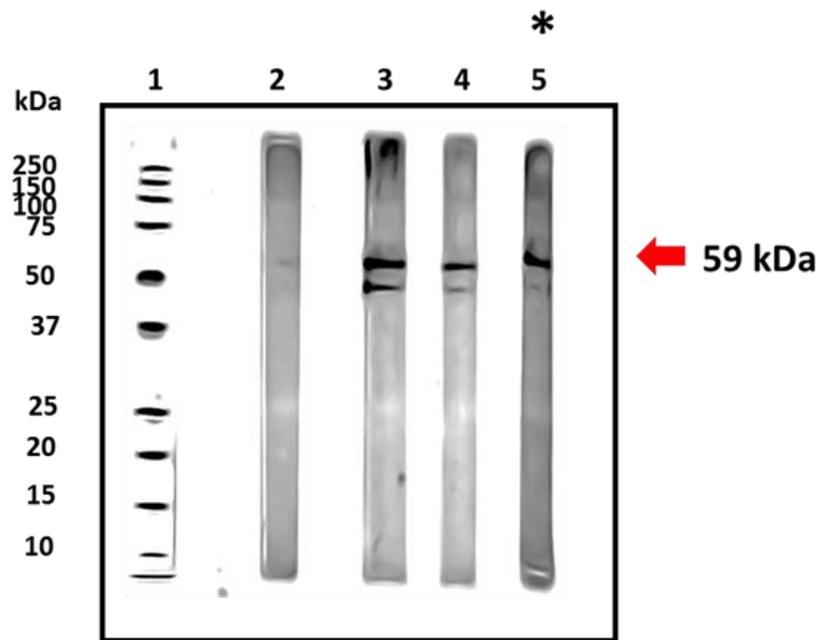
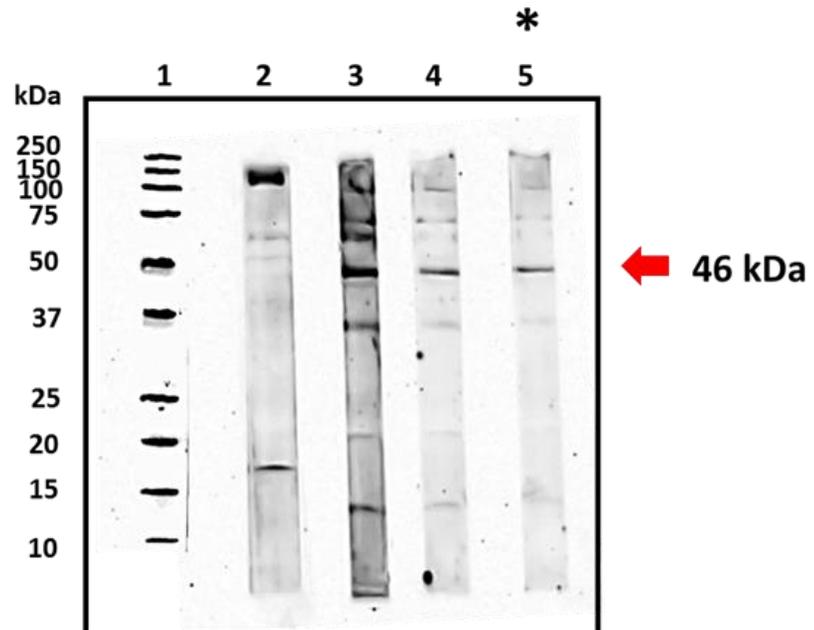


Figura 26.- Titulación de anticuerpos α -EhVps25 y α -EhVps36. Los anticuerpos α -EhVps25 (rata) y α -EhVps36 (conejo) fueron probados para el reconocimiento de las proteínas EhVps25 y EhVps36 en extractos totales de amiba. Para el suero preinmune se usó una dilución 1:500 y para el suero inmune se usaron diluciones 1:1000, 1:2000 y 1:3000. Como control de carga se usaron anticuerpos α -actina a una dilución 1:4000. Se utilizaron anticuerpos secundarios α -rata y α - conejo dilución 1:10,000. A) Anticuerpos α -EhVps25: Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, suero preinmune; carril 3, dil.1:1000; carril 4, dilución 1: 2000; carril 5, dilución 1:3000.B) Anticuerpos α -EhVps36: carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, suero preinmune; carril 3, dilución1:1000; carril 4, dilución 1: 2000; carril 5, dilución 1: 3000. *Dilución elegida para usar en los ensayos de *Western blot*.

A



B



7.3.2 Inmunolocalización

Posteriormente, se realizaron ensayos de microscopía confocal para determinar por inmunofluorescencia indirecta la localización de estas proteínas a los 0, 2, 5, 10, 15 y 30 min de eritrofagocitosis, empleando los anticuerpos primarios ya generados (Figura 27). En condiciones basales se observó a las proteínas EhVps25 (en rojo) y EhVps36 (en verde) en citoplasma y en algunas regiones de la membrana sin colocalizar, a diferencia de la zona del pseudópodo en donde estas proteínas si co-localizan; en tanto que EhVps36 se encontró en el núcleo. A los 2 minutos de fagocitosis, ambas proteínas colocalizan en la boca fagocítica y en regiones de la membrana cercanas a esta boca. EhVps25 se observó también en citoplasma y cerca de los eritrocitos que son recién endocitados por la amiba; EhVps36 se observó en citoplasma y en algunas regiones de la membrana. A los 5 minutos, las dos proteínas permanecieron en el citoplasma y colocalizaron en la boca fagocítica, además se les observó en eritrocitos que el trofozoíto está a punto de endocitar; EhVps25 rodea a los eritrocitos que están dentro de la amiba; EhVps36 se observa también en la membrana. A los 10 minutos, estas proteínas co-localizaron nuevamente en la boca fagocítica, en el núcleo y las regiones que rodean los fagosomas que contienen eritrocitos. Sin embargo; se observaron a las dos proteínas, sin co-localizar, en el citoplasma, en la membrana y en los eritrocitos adheridos a los trofozoítos y que estaban a punto de ser fagocitados. A los 15 minutos, EhVps25 y EhVps36 colocalizaron en algunas regiones cerca de fagosomas que contenían eritrocitos, en algunos puntos en el citoplasma y en la boca fagocítica. Se observó que la colocalización aumentó en las regiones más cercanas al contacto con los eritrocitos. Ambas proteínas aparecieron sin colocalizar en los eritrocitos que estaban en vía de ser endocitados: en las imágenes EhVps25 los rodea, mientras que EhVps36 se distribuye a lo largo de todas las células. A los 30 minutos de eritrofagocitosis, se observó a ambas proteínas colocalizando aún en la boca fagocítica y en la membrana de la amiba, lo cual no se observó en tiempos anteriores; EhVps25 se observó en citoplasma, rodeando a los eritrocitos que estaban en vía de ser endocitados y en los que ya fueron fagocitados por el parásito; EhVps36 también se encontró en estas zonas,

aunque no colocaliza con EhVps25 y se encontró también dispersa sobre los eritrocitos en vía de ser endocitados.

Figura 27.- Inmunolocalización de proteína EhVps25 durante la eritrofagocitosis. Trofozoítos de *E. histolytica* fueron incubados con eritrocitos por 0, 2, 5, 10, 15 y 30 min; se utilizó anti-EhVps25 (1:100) y anti-rata (1:500) acoplado a TRITC. Se utilizó DAPI (1:3000) para marcar los núcleos. Para examinar las muestras se utilizó un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700 Imager y el análisis se hizo con el software ZEN 2009 Light Edition, proporcionado por el fabricante. Se observa a EhVps25 en color rojo, a EhVps36 en color verde y los núcleos en azul.

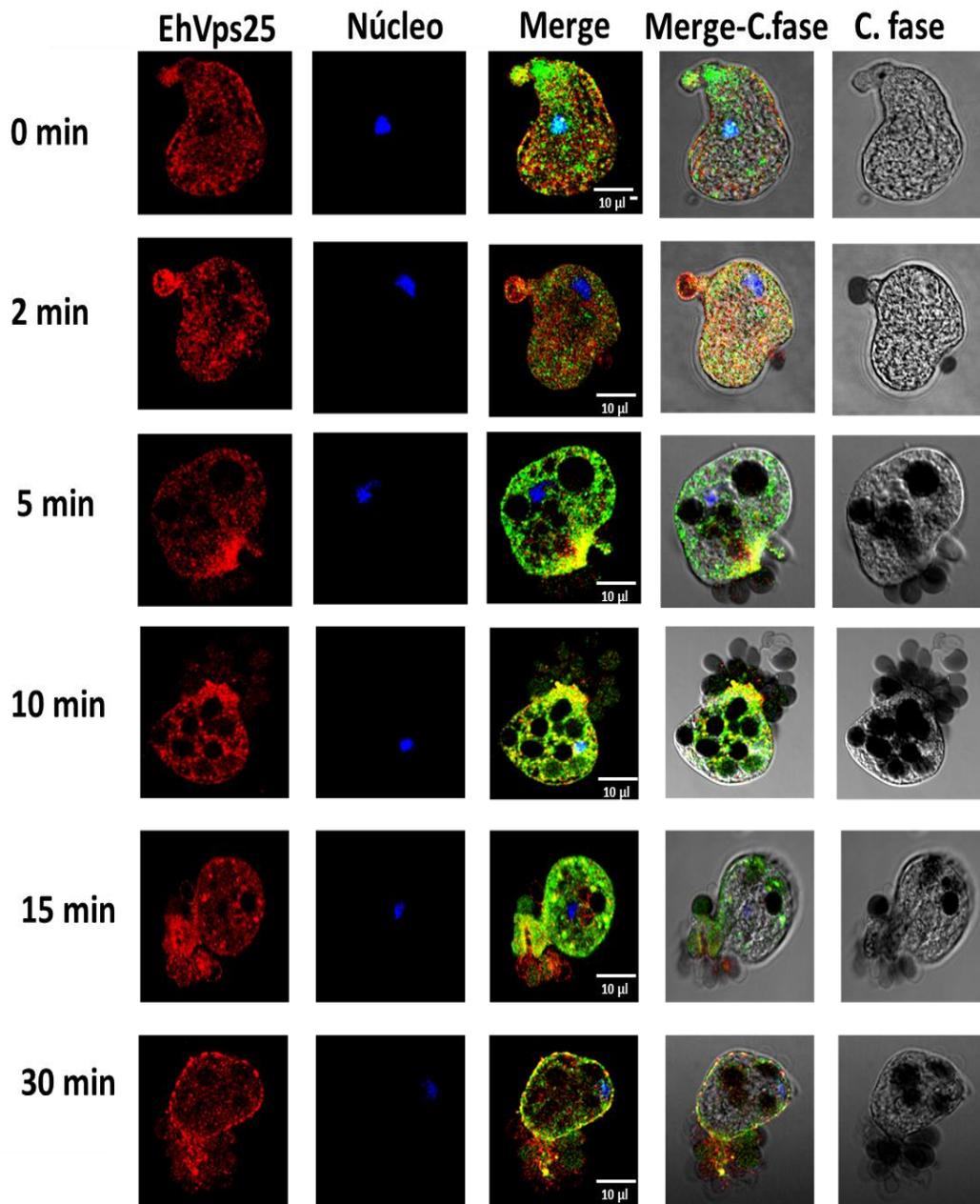
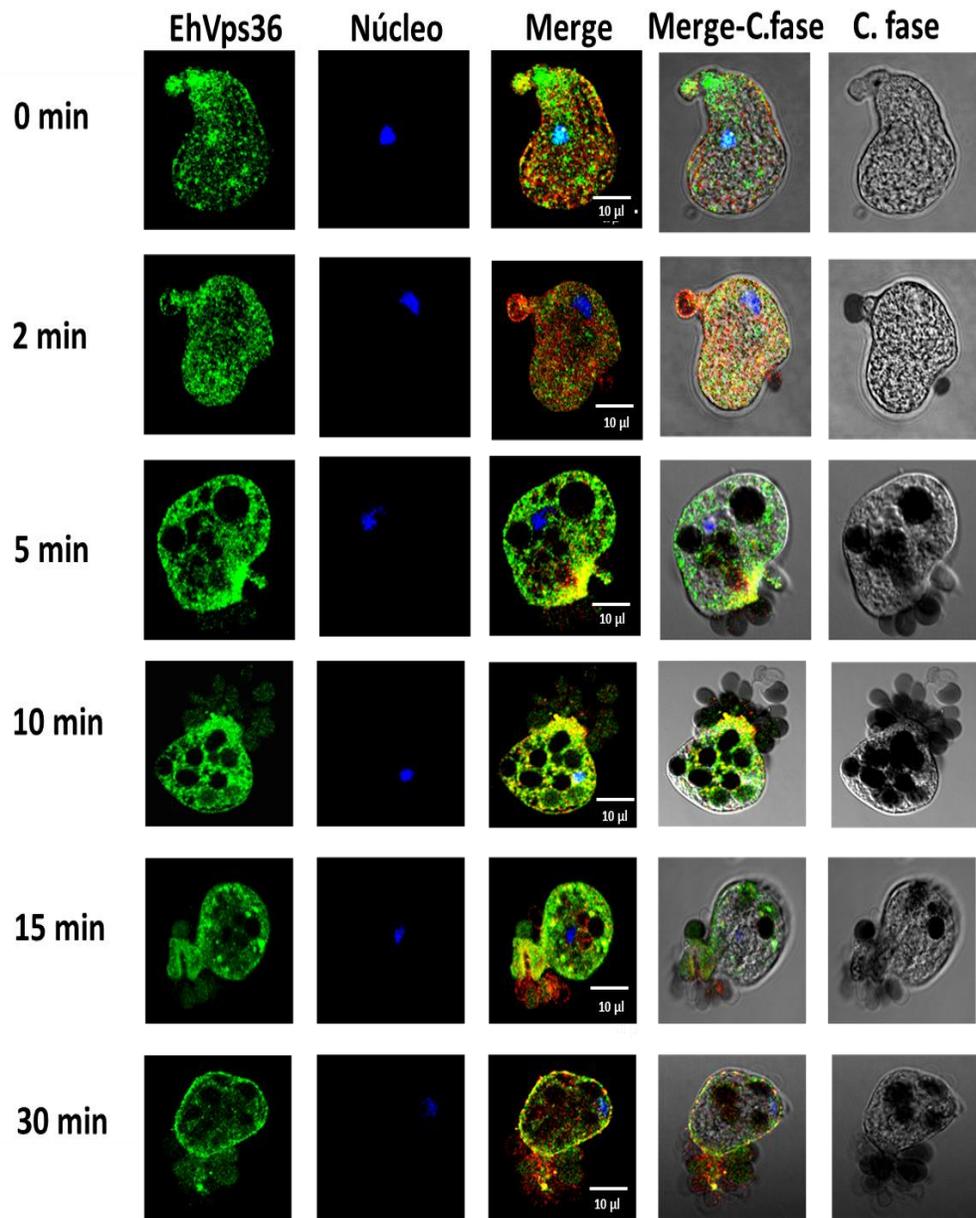


Figura 28.- Inmunolocalización de proteína EhVps36 durante la eritrofagocitosis. Trofozoítos de *E. histolytica* fueron incubados con eritrocitos por 0, 2, 5, 10, 15 y 30 min; se utilizó anti-EhVps36 (1:100) y anti-rata (1:500) acoplado a FITC. Se utilizó anti-EhVps36 (1:100) y anti-ratón (1:500) acoplado a FITC. Se utilizó DAPI (1:3000) para marcar los núcleos. Para examinar las muestras se utilizó un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700 Imager y el análisis se hizo con el software ZEN 2009 Light Edition, proporcionado por el fabricante. Se observa a EhVps25 en color rojo, a EhVps36 en color verde y los núcleos en azul.



7.3.3 Niveles de proteína

Para determinar los niveles de las proteínas EhVps25 y EhVps36 a los 0, 2, 5, 10, 15 y 30 min de la eritrofagocitosis se realizaron ensayos de *Western blot* usando los anticuerpos generados en esta tesis. EhVps25 no presenta cambios significativos en ninguno de los tiempos evaluados durante la fagocitosis de *E. histolytica* (Figura 29). Sin embargo, la proteína EhVps36 modificó sus niveles en los 15 y 30 min de eritrofagocitosis, mientras que en tiempos que a los 2, 5 y 10 min no se observó algún incremento o disminución a comparación de la condición basal (Figura 30).

Figura 29.- Niveles de proteínas EhVps25 durante la eritrofagocitosis. A) Figura superior: Ensayo de Western blot para la indentificación de EhVps25 durante los 0, 2, 5, 10, 15 y 30 min de eritrofagocitosis en *E. histolytica*. Figura inferior: Actina B) Análisis densitométrico de los niveles de EhVps25 durante la eritrofagocitosis. Se realizó la normalización de los valores obtenidos con actina en cada uno de los casos. La significancia estadística se obtuvo mediante el test *T student*. Gráficas obtenidas en el programa GraphPad Prism 6.

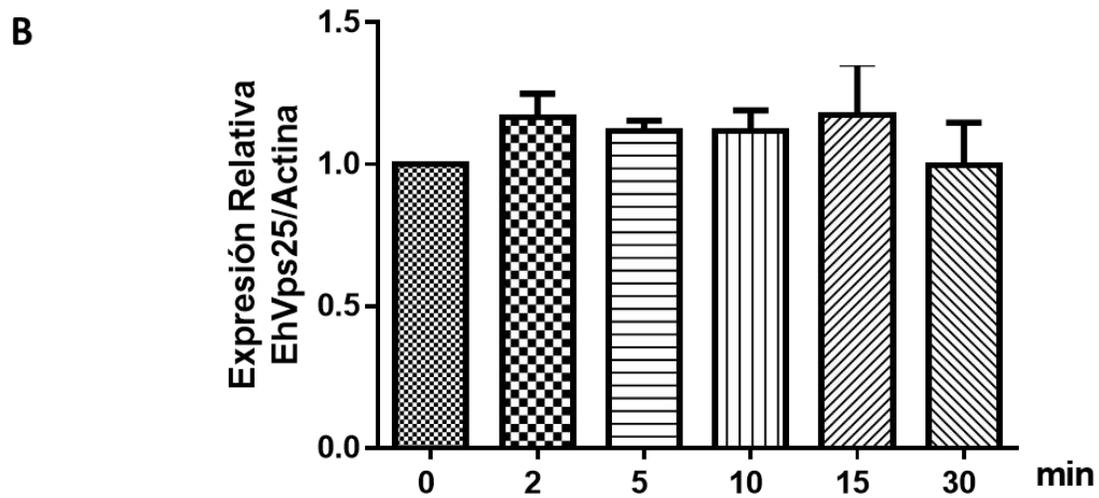
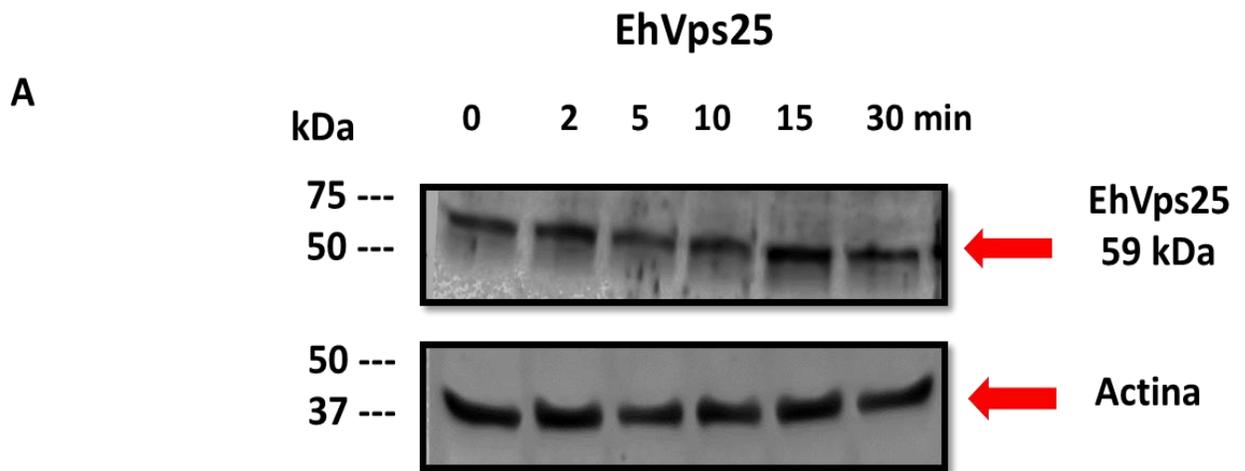
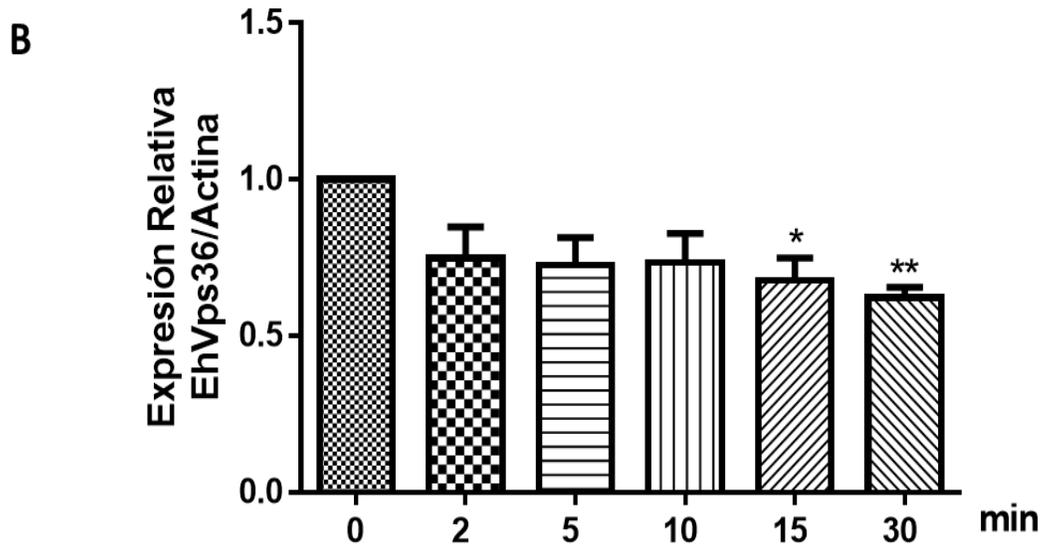
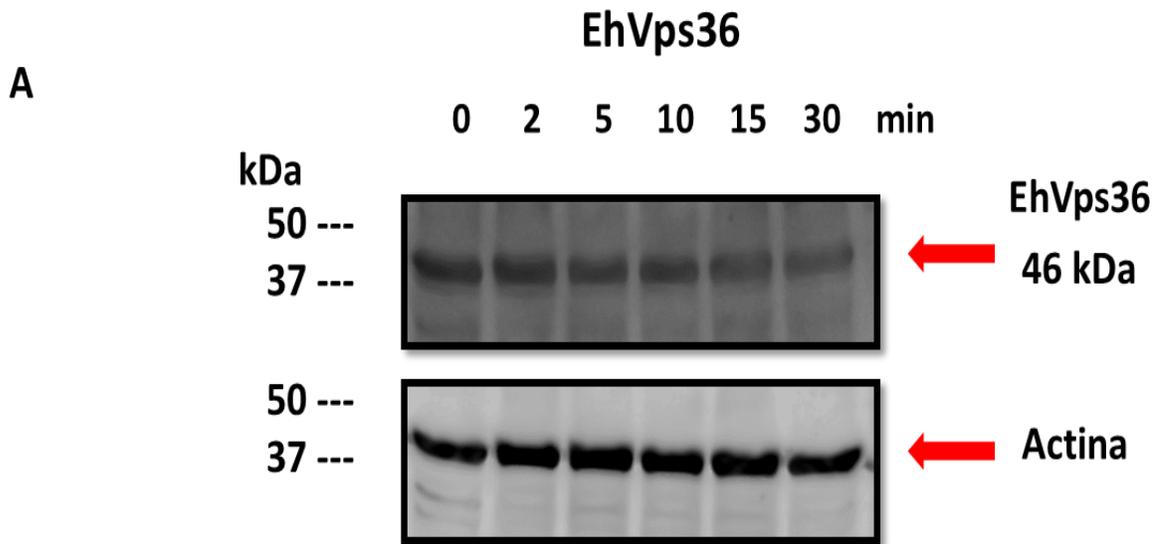


Figura 30.- Niveles de proteínas EhVps36 durante la eritrofagocitosis. A) Figura superior: Ensayo de Western blot para la indentificación de EhVps36 durante los 0, 2, 5, 10, 15 y 30 min de eritrofagocitosis en *E. histolytica*. Figura inferior: Actina B) Análisis densitométrico de los niveles de EhVps36 durante la eritrofagocitosis. Se realizó la normalización de los valores obtenidos con actina en cada uno de los casos. La significancia estadística se obtuvo mediante el test *T student*. Gráficas obtenidas en el programa GraphPad Prism 6.



8 DISCUSIÓN

E. histolytica es el agente causal de la amebiasis, la cual causa alrededor de 100,000 muertes al año a nivel mundial, es por ello importante el estudio de los mecanismos y las moléculas que participan en los procesos de virulencia: la adhesión, la citotoxicidad y la fagocitosis. Dentro del proceso de fagocitosis de este parásito se han observado estructuras similares a MVBs, los cuales derivan de fagosomas (Okada et al., 2006; Bañuelos et al., 2012).

En otros organismos eucariontes, como *H. sapiens* y *S. cerevisiae*, existe una maquinaria multicomplejos llamada ESCRT formada por proteínas Vps que inducen la formación de los MVBs (Winter y Hauser, 2006). Mediante análisis *in silico* del genoma de *E. histolytica* se encontraron proteínas putativas de la maquinaria ESCRT, las cuales conservan los dominios funcionales conocidos en humano y en levadura, y a través de ensayos de RT-PCR se determinó que en su mayoría estos genes se expresan en condiciones basales y durante la eritrofagocitosis (López-Reyes y col., 2010). En *E. histolytica* se han estudiado más a fondo algunos de los miembros de la maquinaria ESCRT y refuerza la idea de una maquinaria funcional asociada a los procesos de fagocitosis (Galindo-Olea, 2016; Ávalos-Padilla., 2015; Bañuelos y col., 2005; López-Reyes y col., 2010)). Sin embargo, el complejo ESCRT-II no ha sido caracterizado, por lo que en este trabajo decidimos enfocarnos en su estudio.

Al realizar el alineamiento de la secuencia de EhVps22 con la de humano y levadura se obtuvo una baja identidad (Figura 11); sin embargo, en amiba se ha encontrado que existen proteínas que pese a que no tienen los mismos aminoácidos, estos pueden tener propiedades similares y les permiten conservar una estructura terciaria muy parecida a la de sus ortólogos, por lo tanto pueden realizar la misma función (Galindo-Olea, 2016; Bañuelos y col., 2012). Al obtener la estructura terciaria de EhVps22 y compararla con humano se obtuvo una identidad estructural y de dominios alta (Figuras 14 y 15), lo que refuerza aún más que EhVps22 pueda realizar las funciones conocidas en otros organismos. El

análisis de interacción *in silico* sugiere que EhVps22 (Figura 18) podría interactuar con EhVps25 y EhVps36 lo cual era un resultado esperado de acuerdo a lo que se sabe en otros organismos, sin embargo, el análisis arroja otras posibles interacciones con EhVps2 y EhVps32 del ESCRT-III, con Vps23 (un posible componente del ESCRT-I), con las proteínas accesorias EhVps4 y EhADH112 y también con proteínas no relacionadas a la maquinaria ESCRT, como la proteína snRNP-F que participa en los complejos que forman el spliceosoma (Green y col., 1986; Lerner y col., 1980; Rogers y col., 1980; Ohshima y col., 1981) y con la proteína de unión a calcio EhCaBP1, que participa en la fagocitosis de una manera dependiente de calcio relocalizándose hacia las bocas fagocíticas y que está involucrada en la dinámica del citoesqueleto de actina (Jain R y col., 2008; Jain R y col., 2009; Sahoo y col., 2004).

En amiba, EhVps25 contiene los dominios WH, además de contar con un motivo PPXY en el extremo N-terminal, al igual que en humano y levadura por lo que podría tener las mismas funciones (Figuras 14 y 16). Al realizar el análisis de interacciones *in silico* (Figura 19) encontramos que EhVps25 podría interactuar con EhVps22 y EhVps36, lo cual confirmó la función que se conoce de esta proteína en humano y levadura, también se evidenciaron interacciones que no se esperaban como el contacto con una proteína putativa Vps23 del ESCRT-I, con EhVps2 y EhVps32 del ESCRT-III, con las proteínas accesorias EhVps4 y EhADH112, y además con un grupo de proteínas que forman el complejo retrómero: Vps26, Vps29 y Vps35 (Nothwehr y col., 1999; Seaman y col., 1997; 1998), sin embargo, dicho complejo aún no ha sido estudiado en *E. histolytica*.

EhVps36, al igual que las otras proteínas del complejo ESCRT, tiene baja identidad de secuencia con sus ortólogos (Figura 13) y al analizar la predicción de dominios en EhVps36, encontramos que contiene sólo los dos dominios WH, pero no el dominio GLUE (Figura 14). Sin embargo, al realizar el análisis de interacción *in silico* (Figura 20), se determinó que EhVps36 podría interactuar con EhVps25, lo cual era de esperarse ya que contiene los dominios WH, interesantemente, este

análisis también predice la interacción con EhVps22, con una proteína Vps23 relacionada al ESCRT-I, con EhVps2 y EhVps32 del ESCRT-III y con Vps35. Estos resultados, muestran que EhVps36, aún sin contar con el dominio GLUE, podría realizar las funciones que se conocen en sus ortólogos.

Después de esto, la pregunta fue ¿cómo es que el ESCRT-II de amiba podría interactuar con proteínas ubiquitinadas, fosfolípidos de membrana y con el ESCRT-I ya que EhVps36 no cuenta con el dominio GLUE? Una probable explicación es que tanto las proteínas cargo como los componentes de este complejo sean modificados post-traduccionalmente por la proteína SUMO, ya que, en *Homo sapiens* esta modificación recluta a algunos componentes de la maquinaria ESCRT y a proteínas cargo hacia la membrana, interacciona con lípidos de membrana endosomal y plasmática (Kunadt y col., 2015) y permite la interacción entre proteínas a través del contacto SUMO-SIM (Husnja y col., 2016). En *E. histolytica* no se ha comprobado experimentalmente la presencia de SUMO, sin embargo, realizamos la búsqueda *in silico* de esta proteína basándonos en la secuencia de SUMO de *Giardia lamblia*, un parásito en el que ha sido estudiada ampliamente, y se identificó una proteína con el número de acceso EHI_170060. Para sustentar aún más la posible intervención de SUMO en las funciones del ESCRT en *E. histolytica* se predijeron *in silico* sitios de SUMOilación y sitios SIM en las proteínas de esta maquinaria, encontrando que todas las proteínas estudiadas poseen al menos un sitio de SUMOilación y en algunos casos cuentan con sitios SIMs (Tabla 2; Figura 21. Estos resultados, si bien son *in silico*, sugieren que esta modificación podría tener un papel importante dentro del complejo ESCRT-II en amiba, realizando las mismas funciones que tiene el dominio GLUE en el ESCRT-II de humano y en levadura (Teo y col., 2006; Alam y col., 2006; Wang y col., 2017).

En *E. histolytica* diferentes condiciones externas como la supresión de suero (Ahamad y col., 2015), la radiación UV (Weber y col., 2009) y condiciones internas como el enquistamiento (Hendrick y col., 2016; Singh y col., 2015), el calcio

(Moreno y col., 2003; McLaughlin y col., 1981) y la fagocitosis (Sateriale y col., 2016; Galindo-Olea, 2016) pueden regular diferentes genes. Durante este último proceso se ha estudiado la regulación de genes que pertenecen a proteínas Rab (Guzmán-Medrano y col., 2005; Rodríguez-MA y col., 2000; Katz y col., 2011), proteasas, histona metiltransferasas de lisinas (HKMTs) (Borbolla-Vázquez y col., 2016) y otros componentes de la maquinaria ESCRT (Galindo-Olea, 2016), por lo que es importante conocer como este evento puede regular los genes del complejo ESCRT-II. Los resultados indican que la transcripción de los genes *ehvps25* y *ehvps36* aumenta durante el evento de fagocitosis en *E. histolytica* (Figura 23), lo que sugiere una participación dinámica de estas proteínas durante este evento y por eso se induce su síntesis. Si bien el gen *ehvps22* no presenta cambios significativos al menos hasta los 30 min de fagocitosis, será importante evaluar su expresión a tiempos más largos de este proceso.

En este proyecto se produjeron los anticuerpos α -EhVps25 y α -EhVps36 para el reconocimiento específico de las dos proteínas del complejo ESCRT-II a partir de la inmunización de péptidos diseñados *in silico* mediante el programa BCpred. La ventaja del uso de estos péptidos es la rapidez con que se diseñan y su síntesis, sin embargo, fue necesario corroborar que sus secuencias no se encontraran en proteínas de los animales de experimentación en donde se inmunizaron ni con alguna otra proteína de ameba para evitar resultados cruzados o falsos positivos.

El anticuerpo α -EhVps25 identifica una banda de 59 kDa (Figura 26), y aunque su peso esperado fue de 20 kDa, esto podría deberse a que este formando dímeros con la segunda EhVps25 como se ha reportado en sus ortólogos en humano y levadura (Wernimont y col., 2004; Slater y col., 2006; Winter y col., 2010). Otra posible explicación es que debido a las propiedades intrínsecas de la proteína se genere una migración aberrante, como sucede con otros componentes de la maquinaria ESCRT en ameba (Ávalos-Padilla y col., 2012).

El anticuerpo α -EhVps36 detecta una banda de 46 kDa (Figura 26) (peso esperado: 28kDa), sin embargo, el cambio en el peso esperado puede deberse a propiedades intrínsecas de la molécula generando su migración aberrante como

se ha visto que en otros componentes de la maquinaria ESCRT en *E. histolytica* y en eucariontes (Saksena y col., 2007; Ávalos- Padilla, 2012) o ser modificada por la proteína SUMO (Tabla 2), la cual tiene un peso de 11 kDa y que además puede estar en contacto con más proteínas SUMO.

Una vez que se comprobó la presencia de estas proteínas en extractos totales de trofozoitos de amiba, analizamos su localización subcelular, utilizando los anticuerpos α -EhVps25 (Figura 27) y α -EhVps36 (Figura 28), y mediante la técnica de microscopía confocal localizamos a EhVps25 y EhVps36 en citoplasma y en pseudópodos a los 0 min de la eritrofagocitosis, interesantemente, estas proteínas cambian su localización hacia núcleo, membrana, fagosomas que contienen eritrocitos y bocas fagocíticas desde los 2 hasta los 30 min de la fagocitosis, lo que sugiere su participación dentro de este evento. Llamó nuestra atención que a pesar de que ambas proteínas coincidan en la localización, no en todas las regiones existía colocalización entre ellas. Sin embargo, se visto que la maquinaria ESCRT en otros organismos tiene funciones como participar en la dinámica del citoesqueleto de actina (Echard y col., 2012), en el reciclaje de proteínas por el contacto con el complejo retrómero (Lumb y col., 2011; McDonald y col., 2014;), inclusive en funciones en el núcleo participando en la eficiencia de la elongación de la transcripción (Gaur y col., 2013; Ventimiglia y col., 2016) y de acuerdo a los resultados obtenidos en el interactoma estas funciones también podrían ejecutarse por la maquinaria ESCRT-II en amiba.

Al determinar los niveles de estas proteínas en el evento de eritrofagocitosis, observamos que EhVps25 no tiene un comportamiento significativamente diferente con respecto a la condición basal, por lo menos hasta los 30 min de eritrofagocitosis, esto no se relaciona directamente con los resultados de los niveles de mensajero, sin embargo dentro del proceso de traducción probablemente ocurra algún tipo de regulación del RNAm o bien que las proteínas sintetizadas sean degradadas y no alcancen a superar los niveles de la condición basal, otra posible explicación pudiera ser que durante la eritrofagocitosis la región que es reconocida por los anticuerpos se encuentre en contacto con otras proteínas, por lo que el reconocimiento por parte del anticuerpo disminuye. Al

evaluar los niveles de EhVps36 se determinó disminuye significativamente a los 15 y 30 min (a comparación de la condición basal). Estos resultados no se relacionan directamente con los valores obtenidos en los ensayos de RT-qPCR, sin embargo, dentro del proceso de traducción existen puntos de regulación en donde el RNAm puede ser degradado, lo que al final afectaría la cantidad de proteína, además de que de la vida media de las proteínas puede ser menos 15 min produciendo la degradación de estas y resultando en la disminución de sus niveles.

Ensayos posteriores nos ayudarán a elucidar el mecanismo de cómo el complejo ESCRT-II puede realizar sus funciones que se conocen en otros organismos, además de investigar cuál es su papel en la fagocitosis de la amiba, ya que este es un mecanismo de virulencia del parásito.

9 CONCLUSIONES

En este proyecto se analizaron las proteínas del complejo ESCRT-II de *E. histolytica* las cuales conservan los dominios WH característicos en *Homo sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae* que le permiten interaccionar con otras proteínas y que probablemente tengan funciones similares. Durante la fagocitosis el gen *ehvps36* es regulado positivamente. Además, las proteínas EhVps25 y EhVp36 se relocalizan desde citoplasma y pseudópodos hacia núcleo, fagosomas, membrana y bocas fagocíticas durante la eritrofagocitosis, sugiriendo su participación en este mecanismo de virulencia de la amiba.

REFERENCIAS

- Adams, E.B., and MacLeod, I.N. (1977). Invasive amebiasis. I. Amebic dysentery and its complications. *Medicine* 56, 315-323.
- Alam, S.L., Langelier, C., Whitby, F.G., Koirala, S., Robinson, H., Hill, C.P., and Sundquist, W.I. (2006). Structural basis for ubiquitin recognition by the human ESCRT-II EAP45 GLUE domain. *Nature structural & molecular biology* 13, 1029-1030.
- Alam, S.L., Sun, J., Payne, M., Welch, B.D., Blake, B.K., Davis, D.R., Meyer, H.H., Emr, S.D., and Sundquist, W.I. (2004). Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers. *The EMBO journal* 23, 1411-1421.
- Ali, I.K., Clark, C.G., and Petri, W.A., Jr. (2008). Molecular epidemiology of amebiasis. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 8, 698-707.
- Ali, I.K., Hossain, M.B., Roy, S., Ayeh-Kumi, P.F., Petri, W.A., Jr., Haque, R., and Clark, C.G. (2003). *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. *Emerging infectious diseases* 9, 580-584.
- Anaya-Velazquez, F., Martinez-Palomo, A., Tsutsumi, V., and Gonzalez-Robles, A. (1985). Intestinal invasive amebiasis: an experimental model in rodents using axenic or monoxenic strains of *Entamoeba histolytica*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 34, 723-730.
- Andra, J., Berninghausen, O., and Leippe, M. (2004). Membrane lipid composition protects *Entamoeba histolytica* from self-destruction by its pore-forming toxins. *FEBS letters* 564, 109-115.
- Andra, J., Herbst, R., and Leippe, M. (2003). Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. *Developmental and comparative immunology* 27, 291-304.
- Aristizabal, H., Acevedo, J., and Botero, M. (1991). Fulminant amebic colitis. *World journal of surgery* 15, 216-221.

- Arroyo, R., and Orozco, E. (1987). Localization and identification of an Entamoeba histolytica adhesin. *Molecular and biochemical parasitology* 23, 151-158.
- Ávalos-Padilla, Y. (2016). "Caracterización funcional del complejo ESCRT-III en Entamoeba histolytica". In *Infectómica y Patogénesis Molecular* (México, D.F., CINVESTAV), p. 199.
- Avalos-Padilla, Y., Betanzos, A., Javier-Reyna, R., Garcia-Rivera, G., Chavez-Munguia, B., Lagunes-Guillen, A., Ortega, J., and Orozco, E. (2015). EhVps32 Is a Vacuole-Associated Protein Involved in Pinocytosis and Phagocytosis of Entamoeba histolytica. *PLoS pathogens* 11, e1005079.
- Babst, M. (2011). MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Current opinion in cell biology* 23, 452-457.
- Babst, M., Sato, T.K., Banta, L.M., and Emr, S.D. (1997). Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *The EMBO journal* 16, 1820-1831.
- Babst, M., Wendland, B., Estepa, E.J., and Emr, S.D. (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *The EMBO journal* 17, 2982-2993.
- Banuelos, C., Garcia-Rivera, G., Lopez-Reyes, I., Mendoza, L., Gonzalez-Robles, A., Herranz, S., Vincent, O., and Orozco, E. (2012). EhADH112 is a Bro1 domain-containing protein involved in the Entamoeba histolytica multivesicular bodies pathway. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012, 657942.
- Banuelos, C., Garcia-Rivera, G., Lopez-Reyes, I., and Orozco, E. (2005). Functional characterization of EhADH112: an Entamoeba histolytica Bro1 domain-containing protein. *Experimental parasitology* 110, 292-297.
- Barr, F., and Lambright, D.G. (2010). Rab GEFs and GAPs. *Current opinion in cell biology* 22, 461-470.

- Bishop, N., Horman, A., and Woodman, P. (2002). Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *The Journal of cell biology* 157, 91-101.
- Bruhn, H., and Leippe, M. (2001). Novel putative saposin-like proteins of *Entamoeba histolytica* different from amoebapores. *Biochimica et biophysica acta* 1514, 14-20.
- Caballero-Salcedo, A., Viveros-Rogel, M., Salvatierra, B., Tapia-Conyer, R., Sepulveda-Amor, J., Gutierrez, G., and Ortiz-Ortiz, L. (1994). Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 50, 412-419.
- Chadee, K., Petri, W.A., Jr., Innes, D.J., and Ravdin, J.I. (1987). Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of clinical investigation* 80, 1245-1254.
- Christy, N.C., and Petri, W.A., Jr. (2011). Mechanisms of adherence, cytotoxicity and phagocytosis modulate the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Future microbiology* 6, 1501-1519.
- Debnath, A., Tashker, J.S., Sajid, M., and McKerrow, J.H. (2007). Transcriptional and secretory responses of *Entamoeba histolytica* to mucins, epithelial cells and bacteria. *International journal for parasitology* 37, 897-906.
- Diamond, L.S., and Clark, C.G. (1993). A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *The Journal of eukaryotic microbiology* 40, 340-344.
- Dowlathshahi, D.P., Sandrin, V., Vivona, S., Shaler, T.A., Kaiser, S.E., Melandri, F., Sundquist, W.I., and Kopito, R.R. (2012). ALIX is a Lys63-specific polyubiquitin binding protein that functions in retrovirus budding. *Developmental cell* 23, 1247-1254.
- Frisardi, M., Ghosh, S.K., Field, J., Van Dellen, K., Rogers, R., Robbins, P., and Samuelson, J. (2000). The most abundant glycoprotein of amebic cyst

walls (Jacob) is a lectin with five Cys-rich, chitin-binding domains. *Infection and immunity* 68, 4217-4224.

- Fuchs, E., Haas, A.K., Spooner, R.A., Yoshimura, S., Lord, J.M., and Barr, F.A. (2007). Specific Rab GTPase-activating proteins define the Shiga toxin and epidermal growth factor uptake pathways. *The Journal of cell biology* 177, 1133-1143.
- Galindo Olea, A. (2016). Identificación de las proteínas Tom1 y Vps23 en *Entamoeba histolytica*. In *Infectómica y Patogénesis Molecular (Centro de Investigación y Estudios Avanzados)*, p. 114.
- Garcia-Nieto, R.M., Rico-Mata, R., Arias-Negrete, S., and Avila, E.E. (2008). Degradation of human secretory IgA1 and IgA2 by *Entamoeba histolytica* surface-associated proteolytic activity. *Parasitology international* 57, 417-423.
- Garcia-Rivera, G., Rodriguez, M.A., Ocadiz, R., Martinez-Lopez, M.C., Arroyo, R., Gonzalez-Robles, A., and Orozco, E. (1999). *Entamoeba histolytica* : a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular microbiology* 33, 556-568.
- Gathiram, V., and Jackson, T.F. (1987). A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* 72, 669-672.
- Gill, D.J., Teo, H., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D.B., Emr, S.D., and Williams, R.L. (2007). Structural insight into the ESCRT-I/II link and its role in MVB trafficking. *The EMBO journal* 26, 600-612.
- Gómez, J.C.C., J. A.;Cuervo, S.I.;López, M.C. (2007). Amebiasis intestinal. *11(1): 36-45*.
- Gonciarz, M.D., Whitby, F.G., Eckert, D.M., Kieffer, C., Heroux, A., Sundquist, W.I., and Hill, C.P. (2008). Biochemical and structural studies of yeast Vps4 oligomerization. *Journal of molecular biology* 384, 878-895.
- Hanson, P.I., Shim, S., and Merrill, S.A. (2009). Cell biology of the ESCRT machinery. *Current opinion in cell biology* 21, 568-574.

- Haque, R., Ali, I.K., Akther, S., and Petri, W.A., Jr. (1998). Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Journal of clinical microbiology* 36, 449-452.
- Haque, R., Huston, C.D., Hughes, M., Houpt, E., and Petri, W.A., Jr. (2003a). Amebiasis. *The New England journal of medicine* 348, 1565-1573.
- Haque, R., Mondal, D., Kirkpatrick, B.D., Akther, S., Farr, B.M., Sack, R.B., and Petri, W.A., Jr. (2003b). Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infections in preschool children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 69, 398-405.
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., and Emr, S.D. (2011). The ESCRT pathway. *Developmental cell* 21, 77-91.
- Henne, W.M., Stenmark, H., and Emr, S.D. (2013). Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.
- Hirano, S., Suzuki, N., Slagsvold, T., Kawasaki, M., Trambaiolo, D., Kato, R., Stenmark, H., and Wakatsuki, S. (2006). Structural basis of ubiquitin recognition by mammalian Eap45 GLUE domain. *Nature structural & molecular biology* 13, 1031-1032.
- Hirata, K.K., Que, X., Melendez-Lopez, S.G., Debnath, A., Myers, S., Herdman, D.S., Orozco, E., Bhattacharya, A., McKerrow, J.H., and Reed, S.L. (2007). A phagocytosis mutant of *Entamoeba histolytica* is less virulent due to deficient proteinase expression and release. *Experimental parasitology* 115, 192-199.
- Hou, Y., Mortimer, L., and Chadee, K. (2010). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 5 binds integrin on colonic cells and stimulates NFkappaB-mediated pro-inflammatory responses. *The Journal of biological chemistry* 285, 35497-35504.
- <http://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/pathogen.html>.
- Hurley, J.H. (2008). ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Current opinion in cell biology* 20, 4-11.

- Hurley, J.H. (2010). The ESCRT complexes. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 45, 463-487.
- Huston, C.D., Boettner, D.R., Miller-Sims, V., and Petri, W.A., Jr. (2003). Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection and immunity* 71, 964-972.
- Huston, C.D., Houpt, E.R., Mann, B.J., Hahn, C.S., and Petri, W.A., Jr. (2000). Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Cellular microbiology* 2, 617-625.
- Im, Y.J., and Hurley, J.H. (2008). Integrated structural model and membrane targeting mechanism of the human ESCRT-II complex. *Developmental cell* 14, 902-913.
- Irmer, H., Tillack, M., Biller, L., Handal, G., Leippe, M., Roeder, T., Tannich, E., and Bruchhaus, I. (2009). Major cysteine peptidases of *Entamoeba histolytica* are required for aggregation and digestion of erythrocytes but are dispensable for phagocytosis and cytopathogenicity. *Molecular microbiology* 72, 658-667.
- Jang, Y.S., Song, K.J., Kim, J.Y., Lee, Y.A., Kim, K.A., Lee, S.K., and Shin, M.H. (2011). Calpains are involved in *Entamoeba histolytica*-induced death of HT-29 colonic epithelial cells. *The Korean journal of parasitology* 49, 177-180.
- Jouvenet, N. (2012). Dynamics of ESCRT proteins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 4121-4133.
- Juarez, P., Sanchez-Lopez, R., Stock, R.P., Olvera, A., Ramos, M.A., and Alagon, A. (2001). Characterization of the Ehrab8 gene, a marker of the late stages of the secretory pathway of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology* 116, 223-228.
- Katz, U., Ankri, S., Stolarsky, T., Nuchamowitz, Y., and Mirelman, D. (2002). *Entamoeba histolytica* expressing a dominant negative N-truncated light subunit of its gal-lectin are less virulent. *Molecular biology of the cell* 13, 4256-4265.

- Katzenstein, D., Rickerson, V., and Braude, A. (1982). New concepts of amebic liver abscess derived from hepatic imaging, serodiagnosis, and hepatic enzymes in 67 consecutive cases in San Diego. *Medicine* 61, 237-246.
- Katzmann, D.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106, 145-155.
- Katzmann, D.J., Stefan, C.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *The Journal of cell biology* 162, 413-423.
- Kim, J., Sitaraman, S., Hierro, A., Beach, B.M., Odorizzi, G., and Hurley, J.H. (2005). Structural basis for endosomal targeting by the Bro1 domain. *Developmental cell* 8, 937-947.
- Kim, K.A., Kim, J.Y., Lee, Y.A., Song, K.J., Min, D., and Shin, M.H. (2011). NOX1 participates in ROS-dependent cell death of colon epithelial Caco2 cells induced by *Entamoeba histolytica*. *Microbes and infection* 13, 1052-1061.
- Kim, K.A., Lee, Y.A., and Shin, M.H. (2007). Calpain-dependent calpastatin cleavage regulates caspase-3 activation during apoptosis of Jurkat T cells induced by *Entamoeba histolytica*. *International journal for parasitology* 37, 1209-1219.
- Kim, K.A., Lee, Y.A., and Shin, M.H. (2010). Calpain-dependent cleavage of SHP-1 and SHP-2 is involved in the dephosphorylation of Jurkat T cells induced by *Entamoeba histolytica*. *Parasite immunology* 32, 176-183.
- Leippe, M., Andra, J., and Muller-Eberhard, H.J. (1994). Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 2602-2606.
- Lemmon, S.K., and Traub, L.M. (2000). Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Current opinion in cell biology* 12, 457-466.

- Lopez-Reyes, I., Garcia-Rivera, G., Banuelos, C., Herranz, S., Vincent, O., Lopez-Camarillo, C., Marchat, L.A., and Orozco, E. (2010). Detection of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport in *Entamoeba histolytica* and Characterization of the EhVps4 Protein. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 890674.
- Lushbaugh, W.B., Hofbauer, A.F., and Pittman, F.E. (1985). *Entamoeba histolytica*: purification of cathepsin B. *Experimental parasitology* 59, 328-336.
- Lynch, E.C., Rosenberg, I.M., and Gitler, C. (1982). An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *The EMBO journal* 1, 801-804.
- Madriz, X., Martinez, M.B., Rodriguez, M.A., Sierra, G., Martinez-Lopez, C., Riveron, A.M., Flores, L., and Orozco, E. (2004). Expression in fibroblasts and in live animals of *Entamoeba histolytica* polypeptides EhCP112 and EhADH112. *Microbiology* 150, 1251-1260.
- Martinez-Lopez, C., Orozco, E., Sanchez, T., Garcia-Perez, R.M., Hernandez-Hernandez, F., and Rodriguez, M.A. (2004). The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cellular microbiology* 6, 367-376.
- Martinez, M.B., Rodriguez, M.A., Garcia-Rivera, G., Sanchez, T., Hernandez-Pando, R., Aguilar, D., and Orozco, E. (2009). A pcDNA-Ehcpadh vaccine against *Entamoeba histolytica* elicits a protective Th1-like response in hamster liver. *Vaccine* 27, 4176-4186.
- McGugan, G.C., Jr., and Temesvari, L.A. (2003). Characterization of a Rab11-like GTPase, EhRab11, of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology* 129, 137-146.
- Moncada, D., Keller, K., and Chadee, K. (2003). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. *Infection and immunity* 71, 838-844.
- Mora Galindo, J., Martinez-Palomo, A., and Chavez, B. (1978). [Interaction between *Entamoeba histolytica* and the cecal epithelium in the guinea pig]. *Archivos de investigacion medica* 9 *Suppl* 1, 261-274.

- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Ali, V., and Nozaki, T. (2005). A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular biology of the cell* 16, 5294-5303.
- Ocadiz, R., Orozco, E., Carrillo, E., Quintas, L.I., Ortega-Lopez, J., Garcia-Perez, R.M., Sanchez, T., Castillo-Juarez, B.A., Garcia-Rivera, G., and Rodriguez, M.A. (2005). EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cellular microbiology* 7, 221-232.
- Orozco, E., Guarneros, G., Martinez-Palomo, A., and Sanchez, T. (1983). *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *The Journal of experimental medicine* 158, 1511-1521.
- Pertuz Belloso, S., Ostoa Saloma, P., Benitez, I., Soldevila, G., Olivos, A., and Garcia-Zepeda, E. (2004). *Entamoeba histolytica* cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines. *Parasite immunology* 26, 237-241.
- Petri, W.A., Jr. (2002). Pathogenesis of amebiasis. *Current opinion in microbiology* 5, 443-447.
- Petri, W.A., Jr., Haque, R., and Mann, B.J. (2002). The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annual review of microbiology* 56, 39-64.
- Petri, W.A., Jr., Smith, R.D., Schlesinger, P.H., Murphy, C.F., and Ravdin, J.I. (1987). Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of clinical investigation* 80, 1238-1244.
- Picazarri, K., Luna-Arias, J.P., Carrillo, E., Orozco, E., and Rodriguez, M.A. (2005). *Entamoeba histolytica*: identification of EhGPCR-1, a novel putative G protein-coupled receptor that binds to EhRabB. *Experimental parasitology* 110, 253-258.

- Prathap, K., and Gilman, R. (1970). The histopathology of acute intestinal amebiasis. A rectal biopsy study. *The American journal of pathology* 60, 229-246.
- Ragland, B.D., Ashley, L.S., Vaux, D.L., and Petri, W.A., Jr. (1994). *Entamoeba histolytica*: target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2. *Experimental parasitology* 79, 460-467.
- Raiborg, C., Bremnes, B., Mehlum, A., Gillooly, D.J., D'Arrigo, A., Stang, E., and Stenmark, H. (2001). FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *Journal of cell science* 114, 2255-2263.
- Raiborg, C., and Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458, 445-452.
- Ravdin, J.I., and Guerrant, R.L. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *The Journal of clinical investigation* 68, 1305-1313.
- Ravdin, J.I., Moreau, F., Sullivan, J.A., Petri, W.A., Jr., and Mandell, G.L. (1988). Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infection and immunity* 56, 1505-1512.
- Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Guerrant, R.L., and Long-Krug, S.A. (1985). Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of infectious diseases* 152, 542-549.
- Rawal, S., Majumdar, S., and Vohra, H. (2005). Activation of MAPK kinase pathway by Gal/GalNAc adherence lectin of *E. histolytica*: gateway to host response. *Molecular and cellular biochemistry* 268, 93-101.
- Reed, S.L., Ember, J.A., Herdman, D.S., DiScipio, R.G., Hugli, T.E., and Gigli, I. (1995). The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *Journal of immunology* 155, 266-274.

- Reed, S.L., Keene, W.E., McKerrow, J.H., and Gigli, I. (1989). Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Journal of immunology* 143, 189-195.
- Rodriguez, M.A., Garcia-Perez, R.M., Garcia-Rivera, G., Lopez-Reyes, I., Mendoza, L., Ortiz-Navarrete, V., and Orozco, E. (2000). An *Entamoeba histolytica* rab-like encoding gene and protein: function and cellular location. *Molecular and biochemical parasitology* 108, 199-206.
- Rodriguez, M.A., Hernandez, F., Santos, L., Valdez, A., and Orozco, E. (1989). *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Molecular and biochemical parasitology* 37, 87-99.
- Rodriguez, M.A., and Orozco, E. (1986). Isolation and characterization of phagocytosis- and virulence-deficient mutants of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of infectious diseases* 154, 27-32.
- Saito-Nakano, Y., Loftus, B.J., Hall, N., and Nozaki, T. (2005). The diversity of Rab GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Experimental parasitology* 110, 244-252.
- Saito-Nakano, Y., Nakazawa, M., Shigeta, Y., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2001). Identification and characterization of genes encoding novel Rab proteins from *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology* 116, 219-222.
- Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Nakada-Tsukui, K., Leippe, M., and Nozaki, T. (2004). Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *The Journal of biological chemistry* 279, 49497-49507.
- Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A.E., and Emr, S.D. (2009). Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* 136, 97-109.
- Samuelson, J., and Robbins, P. (2011). A simple fibril and lectin model for cyst walls of *Entamoeba* and perhaps *Giardia*. *Trends in parasitology* 27, 17-22.

- Scott, A., Gaspar, J., Stuchell-Brereton, M.D., Alam, S.L., Skalicky, J.J., and Sundquist, W.I. (2005). Structure and ESCRT-III protein interactions of the MIT domain of human VPS4A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13813-13818.
- Seydel, K.B., and Stanley, S.L., Jr. (1998). *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis. *Infection and immunity* 66, 2980-2983.
- Sim, S., Yong, T.S., Park, S.J., Im, K.I., Kong, Y., Ryu, J.S., Min, D.Y., and Shin, M.H. (2005). NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of ERK1/2 is required for apoptosis of human neutrophils induced by *Entamoeba histolytica*. *Journal of immunology* 174, 4279-4288.
- Slagsvold, T., Aasland, R., Hirano, S., Bache, K.G., Raiborg, C., Trambaiolo, D., Wakatsuki, S., and Stenmark, H. (2005). Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *The Journal of biological chemistry* 280, 19600-19606.
- Spadafora, L.J., Kearney, M.R., Siddique, A., Ali, I.K., Gilchrist, C.A., Arju, T., Hoffstrom, B., Nguyen, F.K., Petri, W.A., Jr., Haque, R., *et al.* (2016). Species-Specific Immunodetection of an *Entamoeba histolytica* Cyst Wall Protein. *PLoS neglected tropical diseases* 10, e0004697.
- Stanley, S.L., Jr. (2003). Amoebiasis. *Lancet* 361, 1025-1034.
- Tanyuksel, M., and Petri, W.A., Jr. (2003). Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clinical microbiology reviews* 16, 713-729.
- Teis, D., Saksena, S., and Emr, S.D. (2008). Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Developmental cell* 15, 578-589.
- Temesvari, L.A., Harris, E.N., Stanley, S.L., Jr., and Cardelli, J.A. (1999). Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab GTPases. *Molecular and biochemical parasitology* 103, 225-241.

- Teo, H., Gill, D.J., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D.B., Vallis, Y., Emr, S.D., and Williams, R.L. (2006). ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes. *Cell* 125, 99-111.
- Van Dellen, K.L., Bulik, D.A., Specht, C.A., Robbins, P.W., and Samuelson, J.C. (2006). Heterologous expression of an *Entamoeba histolytica* chitin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* 5, 203-206.
- Vines, R.R., Ramakrishnan, G., Rogers, J.B., Lockhart, L.A., Mann, B.J., and Petri, W.A., Jr. (1998). Regulation of adherence and virulence by the *Entamoeba histolytica* lectin cytoplasmic domain, which contains a beta2 integrin motif. *Molecular biology of the cell* 9, 2069-2079.
- Welter, B.H., Laughlin, R.C., and Temesvari, L.A. (2002). Characterization of a Rab7-like GTPase, EhRab7: a marker for the early stages of endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology* 121, 254-264.
- WHO (1985). Amoebiasis and its control. In WHO 63, Bull, ed., pp. 417-426.
- Winkelmann, J., Leippe, M., and Bruhn, H. (2006). A novel saposin-like protein of *Entamoeba histolytica* with membrane-fusogenic activity. *Molecular and biochemical parasitology* 147, 85-94.
- Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., and Hurley, J.H. (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 458, 172-177.
- Xiao, J., Xia, H., Yoshino-Koh, K., Zhou, J., and Xu, Z. (2007). Structural characterization of the ATPase reaction cycle of endosomal AAA protein Vps4. *Journal of molecular biology* 374, 655-670.
- Ximenez, C., Moran, P., Rojas, L., Valadez, A., and Gomez, A. (2009). Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 9, 1023-1032.
- Yan, L., and Stanley, S.L., Jr. (2001). Blockade of caspases inhibits amebic liver abscess formation in a mouse model of disease. *Infection and immunity* 69, 7911-7914.

- Zhang, X., Zhang, Z., Alexander, D., Bracha, R., Mirelman, D., and Stanley, S.L., Jr. (2004). Expression of amoebapores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis. *Infection and immunity* 72, 678-683.