

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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**“La proteína EhVps35 durante la eritrofagocitosis  
en *Entamoeba histolytica*”**

**T E S I S**

Que presenta:

**Biol. Joselin Díaz Valdez**

Para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular**

Directoras de la Tesis

**Dra. María Esther Orozco Orozco**

**Dra. Cecilia Bañuelos Barrón**

**Ciudad de México**

**Agosto, 2018**

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) con el número de CVU 780779. En el Laboratorio 2 del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección de la Dra Ma. Esther Orozco Orozco.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis directoras de tesis, la Dra. Esther Orozco Orozco y la Dra. Cecilia Bañuelos Barrón por el apoyo y la asesoría para la realización de este proyecto.

A la Dra. Guillermina por su asesoría y aportaciones para la realización de las estandarizaciones de extracción de DNA de triatominos y PCR's realizados en este trabajo.

A la Dra. Guadalupe Miriam Huerta Pérez por su asesoría para la extracción de RNA, producción de cDNA y RT-qPCR, para determinar los niveles de transcripción del gen *Ehvps35*.

Al M. en C. Ausencio Galindo Olea por su asesoría para la realización de la clonación de la proteína recombinante EhVps35<sub>(1-476 aa)</sub>.

A mis asesoras de tesis por las aportaciones a este trabajo:

Dra. Abigail Betanzos Fernández

Dra. Rosa Ma. Del Ángel Núñez de Cáceres

## **DEDICATORIAS**

A mi mama, por ser mi apoyo incondicional, tú me enseñaste a luchar por mis sueños contra viento y marea. Gracias por creer en mí y motivarme a seguir.

A mis hermanos Jonathan y Gustavo, por el apoyo, consejos y regaños que siempre me han dado. Gracias.

A mi pequeña Bilma, tu siempre me acompañaste en cada desvelo.

## ABSTRACT

The retromere is a protein complex composed of two subcomplexes, a heterodimer of SNX proteins and the CRC (Load Recognition Complex) integrated by Vps26, Vps29 and Vps35. In *E. histolytica*, the retromer is composed of CRC proteins, so it is called a retrograde-like protein, which has only been characterized by the Vps26 protein and participates in the recycling of cysteine proteases (CPs), which it recruits through the recognition of a receiver of these.

In the trophozoites of *E. histolytica*, it is necessary to detect the proteins of the rearranger, study their function and their interaction with other proteins involved in vesicular traffic, to better understand the processes of recycling and degradation of proteins with fundamental functions during the invasion tissue and events that occur, particularly, during phagocytosis. With this background, the objective of this work is to determine the participation of Vps35 during phagocytosis. For which proteins that have been proposed as orthologs of Vps35 in the amoeba were detected in silico. We chose the one we considered the best prospect based on motifs present in its amino acid sequence, with which a peptide was designed that was used to immunize mice and produce polyclonal  $\alpha$ -EhVps35, as working tools to study its function. These antibodies detected a 71 kDa band in total amoebic extracts, which was detected in protein extracts of *E. histolytica* from an erythrophagocytosis kinetics, according to which the amount of the Vps35 protein did not vary significantly. So we began the study of the location of the protein EhVps35 by immunofluorescence assays, in which we found that the protein is located in the cytoplasm in clusters in a base condition and relocated in clusters around the phagosomes and forming structures Circulars that could be vesicles in different conditions of erythrophagocytosis, at 60 min of erythrophagocytosis the location of this protein tends to return to its basal condition. Finally, the level of messenger RNA was analyzed during an erythrophagocytosis kinetics and significant changes in the amount of transcript were identified after 15 minutes. With these results we can conclude that the event of phagocytosis influences the levels of messenger RNA of Vps35 and produces a relocation of the protein EhVps35, without affecting the levels of expression of the protein.

## RESUMEN

El retromero es un complejo proteico integrado por dos subcomplejos un heterodímero de proteínas SNX y el CRC (Complejo de Reconocimiento de Carga) integrado por Vps26, Vps29 y Vps35. En *E. histolytica*, el retromero se encuentra compuesto por las proteínas del CRC, por lo que se denomina retrómero-like del que solo se ha caracterizado la proteína Vps26 y participa en el reciclaje de cisteín proteasas (CPs) a las que recluta mediante el reconocimiento de un receptor de estas.

En los trofozoítos de *E. histolytica* es necesario detectar a las proteínas del retrómero, estudiar su función y su interacción con otras proteínas que participan en el tráfico vesicular, para comprender mejor los procesos de reciclaje y degradación de las proteínas con funciones fundamentales durante la invasión tisular y los eventos que se presentan, particularmente, durante la fagocitosis. Con estos antecedentes, el objetivo de este trabajo es determinar la participación de la Vps35 durante la fagocitosis. Para lo cual se detectaron *in silico* las proteínas que han sido propuestas como ortólogos de Vps35 en la amiba. Se eligió a la que consideramos el mejor prospecto basados en motivos presentes en su secuencia de aminoácidos, con la que se diseñó un péptido que fue utilizado para inmunizar ratones y produciendo  $\alpha$ -EhVps35 policlonales, como herramientas de trabajo para estudiar su función. Dichos anticuerpos detectaron en extractos totales de amibas una banda de 71 kDa, la cual fue detectada en extractos proteicos de *E. histolytica* procedentes de una cinética de eritrofagocitosis, según lo cual la cantidad de la proteína Vps35 no varió significativamente. Por lo que se inició el estudio de la localización de la proteína EhVps35 por ensayos de inmunofluorescencia, en los cuales encontramos que la proteína se encuentra localizada en el citoplasma en cúmulos en una condición basa y se relocalizó en cúmulos alrededor de los fagosomas y formando estructuras circulares que podrían ser vesículas en las diferentes condiciones de eritrofagocitosis, a los 60 min de eritrofagocitosis la localización de esta proteína tiende a regresar a su condición basal. Finalmente se analizó el nivel de RNA mensajero durante una cinética de eritrofagocitosis y se identificaron cambios significativos en la cantidad de transcrito a partir de los 15 minutos. Con estos resultados podemos concluir que el evento de fagocitosis influye en los niveles de RNA mensajero de Vps35 y produce una relocalización de la proteína EhVps35, sin afectar los niveles de expresión de la proteína.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	10
1.1 Generalidades de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	10
1.1.1 Taxonomía de <i>E. histolytica</i> .....	10
1.1.2 Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .....	2
1.1.3 La amibiasis .....	3
1.1.4 Mecanismos de virulencia de <i>E. histolytica</i> .....	3
1.2 Tráfico vesicular en eucariontes .....	5
1.2.1 La endocitosis.....	6
1.2.2 Trafico vesicular en <i>E. histolytica</i> .....	14
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	17
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	18
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	18
<b>4.1 OBJETIVO GENERAL</b> .....	18
<b>4.2 OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	18
<b>5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	19
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
6.1 Análisis <i>in silico</i> de la proteína EhVps35 de <i>E. histolytica</i> .....	20
6.2 Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	21
6.3 Ensayos de eritrofagocitosis de <i>E. histolytica</i> para extracción de proteína totales y RNA .....	21
6.4 Determinación de los niveles de mRNA del gen <i>Ehvps35</i> .....	22
6.4.1 Extracción de RNA total de <i>E. histolytica</i> .....	22
6.4.2 Diseño del <i>primer</i> para los ensayos de RT-qPCR del gen <i>Ehvps35</i> de <i>E. histolytica</i> .....	23
6.4.3 Cuantificación del mRNA del gen <i>Ehvps35</i> durante una cinética de eritrofagocitosis de <i>E. histolytica</i> .....	24
6.5 Clonación del fragmento <i>Ehvps35(1-1428 pb)</i> de <i>E. histolytica</i> .....	24
6.5.1 Diseño del <i>primers</i> para la clonación del fragmento <i>Ehvps35(1-1428</i> <i>pb)</i> de <i>E. histolytica</i> .....	24

6.5.2	Producción de <i>Escherichia coli</i> competentes de las cepas DH5 $\alpha$ y BL21 .....	25
6.5.3	Amplificación del fragmento <i>Ehvps35</i> (1-1428 pb) de <i>E. histolytica</i> 26	26
6.5.4	Ligación del fragmento <i>Ehvps35</i> (1-1428 pb) al vector de clonación pJET1.2/blunt .....	26
6.5.5	Transformación de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con la construcción pJET1.2/ <i>Ehvps35</i> (1-1428 pb).....	27
6.5.6	Purificación de la construcción pJET1.2/ <i>Ehvps35</i> (1-1428 pb).....	27
6.5.7	Ensayo de restricción de la construcción pJET1.2/ <i>Ehvps35</i> (1-1428 pb) 28	28
6.5.8	Ligación del fragmento <i>Ehvps35</i> (1-1428 pb) al vector pColdI .....	28
6.5.9	Secuenciación de la construcción pColdI/ <i>Ehvps35</i> (1-1428 pb)....	29
6.1.10	Inducción de las proteínas recombinantes His-EhVps35(1-476 aa) .....	29
6.7	Extracción de proteínas totales de <i>E. histolytica</i> .....	30
6.8	Obtención de anticuerpos policlonales $\alpha$ -EhVps35 .....	30
6.9	Determinación de los niveles de expresión de la proteína EhVps35 durante una cinética de eritrofagocitosis de <i>E. histolytica</i> .....	35
6.10	Localización de la proteína EhVps35 durante una cinética de eritrofagocitosis de <i>E. histolytica</i> .....	36
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	38
7.1	Análisis <i>in silico</i> de la proteína EhVps35 de <i>E. histolytica</i> .....	38
7.1.1	Identificación de las secuencias homologas a Vps35 en <i>E. histolytica</i> .....	38
7.1.2	Identificación de dominios en las proteínas EhVps35 de <i>E. histolytica</i> .....	40
7.1.3	Búsqueda del motivo PRLYL característico de las proteínas Vps35 en EhVps35 de <i>E. histolytica</i> .....	42
7.1.4	Alineamiento estructural del cristal de HsVps35 con las predicciones de la estructura terciaria de las proteínas EhVps35 de <i>E. histolytica</i> .....	44
7.1.5	Predicción de la interacción de EhVps35 con membrana.....	48
7.1.6	Predicción de las interacciones de EhVps35 .....	50
7.3	Determinación del nivel de expresión del gen <i>Ehvps35</i> en <i>E. histolytica</i> .....	52
7.5	Obtención, análisis de la especificidad y titulación del suero inmune contra la proteína EhVps35 .....	54
7.4	Producción de la proteína recombinante EhVps35 .....	56

7.4.1 Amplificación del gen <i>Ehvps35</i> .....	56
7.4.2 Ligación del fragmento <i>Ehvps35(1-1428 pb)</i> al vector de transición y digestión de esta construcción.....	58
7.4.3 Ligación del fragmento <i>Ehvps35(1-1428 pb)</i> al vector de expresión .....	60
7.4.4 Inducción del fragmento de EhVps35(1-476 aa) en bacterias transformadas con la construcción pColdI/ EhVps35(1-476 aa).....	62
7.6 Determinación de los niveles de la proteína EhVps35 durante una cinética de eritrofagocitosis de <i>E. histolytica</i> .....	64
7.8 Ubicación subcelular de la proteína EhVps35 durante una cinética de eritrofagocitosis de <i>E. histolytica</i> . .....	66
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	69
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	74
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	75
<b>11. BIBLIOGRAFIA</b> .....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tráfico vesicular .....	7
Figura 2: Complejo proteico retrómero.....	11
Figura 3: Funciones del complejo proteico retrómero.....	12
Figura 4: Estrategia experimental.....	19
Figura 5: Ubicación del péptido diseñado para la inmunización en ratones.....	32
Figura 6: Esquema de inmunización del péptido de la proteína EhVps35 en ratones. ....	34

Figura 7: Ubicación del dominio Vps35 en EhVps35-B, EhVps35-C, EhVps35-D, HsVps35 y ScVps35.....	41
Figura 8: Ubicación del motivo PRLYL en EhVps35-B, EhVps35-C, EhVps35-D, HsVps35 y ScVps35.....	43
Figura 9 : Estructura terciaria de las proteínas EhVps35-B y EhVps35-D. ....	46
Figura 10: Alineamiento estructural de EhVps35-B y EhVps35-D con HsVps35.....	47
Figura 11: Modelo de la interacción de la proteína EhVps35 con la membrana plasmática.....	49
Figura 12: Predicción de las interacciones de EhVps35 de <i>E. histolytica</i> .....	51
Figura 13: Expresión relativa del gen <i>Ehvps35</i> durante la eritrofagocitosis de <i>E. histolytica</i> .....	53
Figura 14: Reconocimiento del $\alpha$ -EhVps35 en extractos de proteína total de <i>E. histolytica</i> .....	55
Figura 15: Amplificación del gen <i>Ehvps35(1-1428 pb)</i> .....	57
Figura 16: Selección de la clona transformada con el vector de subclonación.....	59
Figura 17: Selección de clones de <i>E. coli</i> de la cepa DH5 $\alpha$ transformadas con el vector de clonación.....	61
Figura 18: Inducción de la proteína recombinante EhVps35 en bacterias <i>E. coli</i> de la cepa BL21.....	63
Figura 19: Expresión relativa de la proteína EhVps35 durante una cinética de eritrofagocitosis de <i>E. histolytica</i> .....	65
Figura 20: Inmunolocalización de la proteína EhVps35 durante una cinética de eritrofagocitosis de <i>E. histolytica</i> .....	65

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características de las proteínas que integran el retrómero en <i>E. histolytica</i> .....	15
Tabla 2: <i>Primers</i> diseñados para la amplificación del gen <i>Ehvps35</i> . ....	23
Tabla 3: <i>Primers</i> diseñados para la amplificación del fragmento <i>Ehvps35(1-1428 pb)</i> .....	25

## **ABREVIATURAS**

MVB	<i>Multivesicular Body</i>
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
Vps	Vacuolar Protein Sorting
ECM	Enterprise Content Management
Gal/GalNac	Galactosa y N-acetil-D-galactosamina
ROS	Reactive Oxygen Species
DNA	Acido desoxirribonucleico

RNA	Acido ribonucleico
mRAN	RNA mensajero
cDNA	DNA complementario
PCR	Polymerase chain reaction
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription PCR
Tm	Temperatura de alineamiento
pb	Pares de bases
agua DEPC	Agua dietilpirocarnato
CRC	Complejo de reconocimiento de carga
SNX	Sorting Nexins
PX	Dominios Phox
BAR	Bin-anfifisina-RVs
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Ehvps35	Gen <i>Ehps35</i>
EhVps35	Proteína EhVps35
S2 40Sr	Gen S2 de la subunidad ribosomal 40S
TAE	Tris-Acetato-EDTA)
Rpm	Revoluciones por minuro
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tio-galactosido
SDS	Duodecilsulfato sódico
PBS	Phosphate buffered soline
V	Volts
BSA	Albumina de suero bovino
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria-Bertani
DAPI	Diclorohidrato de 4', 5-diamidino-fenilindol
FITC	Isotiocinato de fluoresceina

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Generalidades de *Entamoeba histolytica*

---

#### 1.1.1 Taxonomía de *E. histolytica*

El protozooario *Entamoeba histolytica* es un eucarionte unicelular sin forma fija (pleomorfo) y carente de flagelo por lo que su locomoción está mediada por proyecciones del citoplasma (pseudópodos), además no tiene mitocondria, aparato de Golgi, ni retículo endoplasmático típicos. Por las anteriores características, Adl *et al.* (2012) y Corliss (1994) ubicaron taxonómicamente a *E. histolytica* en:

Imperio: Eukayota  
Clado: Amorphea  
Super-grupo: Amoebazoa  
Primer rango: Entamoebida  
Phylum: Rhizopoda  
Clase: Entamoebidea  
Orden: Entamoebida  
Familia: Entamoebidae  
Género: *Entamoeba*  
Especie: *histolytica*

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

El parásito *E. histolytica* es el agente causal de la amibiasis en los humanos. Dicho parasito presenta dos estadios durante su ciclo de vida, una forma de resistente (quiste) y una forma ameboide (trofozoíto). El quiste es una forma no motil, esférico con un diámetro entre 10 a 15  $\mu\text{m}$ , es la forma infecciosa del parásito y es liberado en las heces (Stanley, 2003; Ximénez *et al.*, 2007; Ximénez *et al.*, 2009). El trofozoíto es una forma motil con un diámetro entre 10 a 50  $\mu\text{m}$  que coloniza la mucosa intestinal en el intestino grueso (Stanley, 2003; Ximénez *et al.*, 2007; Ximénez *et al.*, 2009).

En orden cronológico, debido a la pared de quitina en el quiste, éste puede ser ingerido en alimentos o agua contaminados sin sufrir daño por la acidez en el estómago y una vez en el intestino delgado (íleon terminal) desenquista, para dar origen a ocho trofozoítos que emigran al intestino grueso, para colonizar la mucosa intestinal del colon. En este lugar se multiplican por fisión binaria y después de la

segunda división nuclear sucesiva se producen los quistes tetranucleados, que finalmente son expulsados en las heces (Stanley, 2003; Ximénez *et al.*, 2007; Ximénez *et al.*, 2009).

### **1.1.3 La amibiasis**

La amibiasis es la tercera causa de muerte por enfermedades parasitarias, siendo endémica de la India, África, México y Sudamérica (Chelsea y William, 2014; Nagata *et al.*, 2012; Stanley, 2003). *E. histolytica* es transmitido por el consumo de alimentos y agua contaminada con quistes, como antes se mencionó, y en menor proporción por vía sexual (Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016). La estimación global de casos de amibiasis es complicada por la limitada capacidad de diagnóstico y vigilancia en las zonas endémicas, además de la existencia de una gran variación temporal entre el periodo de infección y la aparición de síntomas (en casos extremos hasta después de varios años de infección se presentan síntomas), aunque se estima que a nivel mundial entre 40 y 50 millones de personas tienen amibiasis y 40 000 a 100 000 mueren por dicha infección (Chelsea y William, 2014; Nagata *et al.*, 2012; Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016; Stanley, 2003).

La infección por *E. histolytica* es asintomática en el 80 a 90% de los casos, ya que presentan únicamente colonización de la mucosa intestinal (Nagata *et al.*, 2012; Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016; Prakash y Bhimji, 2017; Ximénez *et al.*, 2009). En el 10 a 20% restante de los casos, las personas presentan síntomas como fiebre, náuseas, vómito, diarrea, estreñimiento y dolor abdominal dentro de las dos a cuatro semanas posteriores a la infección, y sólo entre el 4 a 10 % presenta colitis autolimitante, colitis invasiva e infecciones extraintestinales, evacuaciones con sangre, náuseas y anorexia (Nagata *et al.*, 2012; Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016; Prakash y Bhimji, 2017; Ximénez *et al.*, 2009).

### **1.1.4 Mecanismos de virulencia de *E. histolytica***

La capacidad de *E. histolytica* para causar daño en su huésped, es decir, la virulencia depende de múltiples mecanismos moleculares de patogénesis del parásito que implican la adhesión a las células huésped, la inducción de apoptosis de la célula huésped, la degradación de mucinas, la degradación de la matriz extracelular (ECM), la invasión de tejidos, la fagocitosis y mecanismos de evasión del sistema inmunológico, aunque en este proceso también intervienen otros factores del medio como la microbiota intestinal, por lo que el grado de virulencia es difícil de predecir en este parásito (Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016). Sin embargo, para el establecimiento de la infección es necesaria la unión y adhesión del trofozoíto al colon del huésped, para lo cual el trofozoíto cuenta en su superficie con una lectina con dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) para galactosa (Gal) y N-acetil-D-galactosamina (GalNac), nombrada Gal/GalNac, la cual hace posible la adhesión a la mucosa y a las células epiteliales del colon (Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016; Sateriale y Huston, 2011). Gal/GalNac está compuesta por dos subunidades denominadas: pesada ligada a disulfuro (HgL) y ligera (LgL), de las cuales la subunidad HgL al contener un dominio rico en cisteínas (CRD) homólogo a CD59 de humano, un inhibidor humano del complemento le confiere a *E. histolytica* la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal y de evasión del sistema del complemento (Faust y Guillen, 2012). Otra proteína importante en el proceso de adhesión al epitelio intestinal del huésped es el complejo proteico EhCPADH, integrado por la proteína EhCP112 de 49 kDa y la proteína EhADH112 de 75 kDa. Esta última, tiene un dominio implicado en la adherencia de la amiba a su célula diana (Serrano-Luna et al., 2013; García-Rivera et al., 1999).

Debido a que el epitelio intestinal del humano está recubierto de moco, una sustancia principalmente compuesta de mucinas altamente glucosilada, al siguiente paso para la colonización de las amibas es la degradación de carbohidratos de la mucosa intestinal (Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016). Para la primera línea de degradación de mucinas, los trofozoítos secretan glucosidasas y cisteín proteasas (CP), las cuales también son importantes factores para la invasión extraintestinal, particularmente para la desintegración de la membrana basal y la entrada de *E.*

*histolytica* en circulación sanguínea (Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016). Además, la liberación de las proteínas amebaporos forma poros en la membrana de la célula huésped (Sateriale y Huston, 2011). Dichos poros inducen citotoxicidad y apoptosis en la célula huésped, al desencadenar múltiples eventos intracelulares que implican un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, producción de ROS (por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*), pérdida de la integridad en la membrana, fragmentación de DNA, exposición de fosfatidilserina en la superficie celular y activación de caspasa-3 (Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016). Las células en apoptosis son preferentemente fagocitadas por los trofozoítos de *E. histolytica* (Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016; Sateriale y Huston, 2011).

La fagocitosis es un evento esencial para que los de trofozoíto de *E. histolytica* obtengan alimento, sin embargo, este proceso también está implicado en la invasión tisular, ya que se plantea que la fagocitosis selectiva de células apoptóticas o muertas minimiza la respuesta inmunológica pro-inflamatoria del huésped (Tsukui y Nozaki, 2016; Sateriale y Huston, 2011). Pese a la importancia de la fagocitosis en este organismo, aún se desconocen muchos de los mecanismos moleculares que están implicados en los pasos iniciales de este proceso (desde la copa fagocítica hasta el cierre del fagosoma) ya que algunos de los componentes descritos en otros modelos de estudio no están presentes en los trofozoítos, por lo que pueden existir caminos moleculares alternativos (Sateriale y Huston, 2011).

## 1.2 Tráfico vesicular en eucariontes

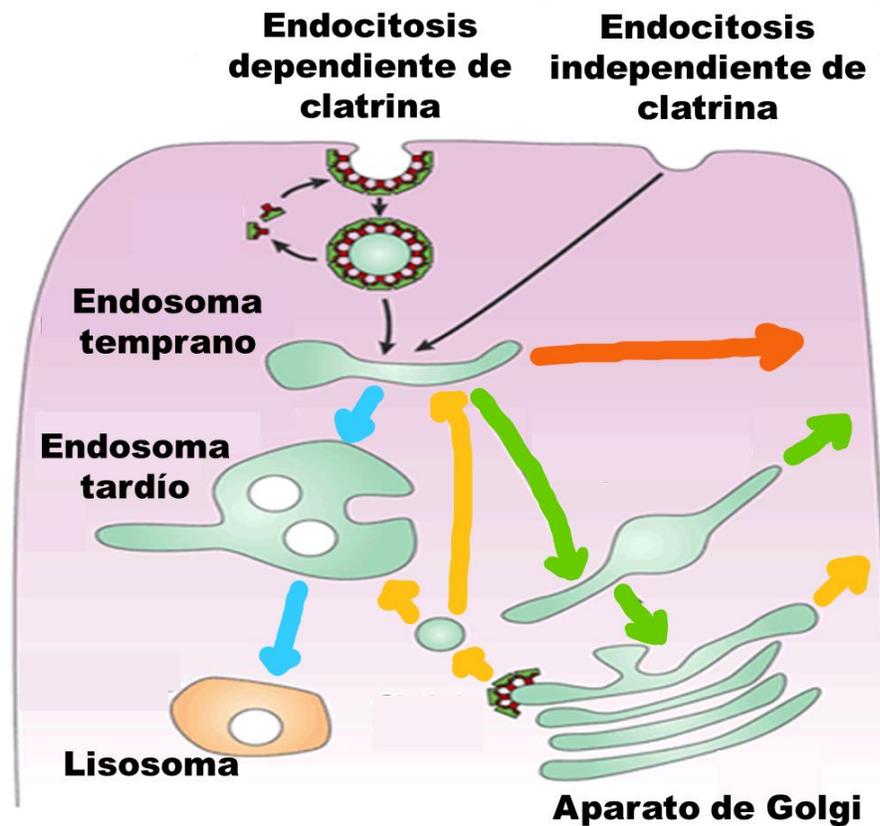
El movimiento de vesículas compuestas de membrana es denominado tráfico vesicular y es fundamental para controlar entre otras cosas: mantener la arquitectura de los diferentes compartimientos intracelulares y media la comunicación entre la célula y su entorno, así como intracelular (Sorkin y Von Zartrow, 2002; Alberts *et al.*, 2015). El tráfico vesículas se puede reducir de forma simplificada en dos por el flujo de las vesículas: el movimiento de vesículas formadas de la membrana de un organelo celular con algún destino dentro de la

célula se denomina endocitosis y el movimiento de vesículas formadas de la membrana plasmática con una migración hacia el exterior es nombrada exocitosis (Sorkin y Von Zartrow, 2002; Vassilleva y Nusrat, 2008).

La exocitosis suministra proteínas de nueva síntesis, carbohidratos y lípidos a la membrana plasmática y el medio extracelular, mientras la endocitosis permite la captación de nutrientes, controla la comunicación celular y regula el intercambio de componentes de la membrana plasmática (Alberts *et al.*, 2015; Christ *et al.*, 2017; Vassilleva y Nusrat, 2008). En cambio, la endocitosis proporciona un suministro de nutrientes en células fagocíticas y regula la transducción de señales, mediante el control de la cantidad de receptores de señalización y sus ligandos en la superficie celular o medio extracelular (Sorkin y Von Zartrow, 2002)

### 1.2.1 La endocitosis

La vía endocíticas se clasifican en dos según la proteína que sea reclutada para la formación del endosoma en dependiente de clatrina o independiente de clatrina (Figura 1) (Vassilleva y Nusrat, 2008; Sorkin y Von Zartrow, 2002). La endocitosis dependiente de clatrina implica la formación de vesículas por el ensamblaje el reclutamiento de AP2 (*Adaptor Protein Complex 2*) y CLASP (*Clathrin-associated sorting protein*) que se asocia a clatrina monomérica para formar la red de clatrina que recubre dichas vesículas denominada CCV (*Clathrin-coated vesicles*); en cambio la endocitosis independiente de clatrina incluye la formación de vesículas independiente del reclutamiento de proteínas o por el reclutamiento de proteínas alternativas a clatrina (Vassilleva y Nusrat, 2008).



**Figura 1: Tráfico vesicular**

Naranja: vía de reciclaje rápido desde el endosoma a la membrana plasmática.  
 Verde: vía de reciclaje lento mediada por el complejo proteico retrómero. Azul:  
 vía de degradación de las proteínas seleccionadas en las vesículas  
 intraendosomales en el MVC (endosoma tardía). Amarillo: vía exocíticas  
 (imagen modificada de Sorkin y Von Zartrow, 2002).

La formación de endosomas por las dos vías endocíticas (dependientes e independiente de clatrina) requieren de la proteína dineína, una GTPasa capaz de autoensamblarse para producir la fisión del endosoma de la membrana plasmática (Vassilleva y Nusrat, 2008). Los endosomas tienen un proceso de maduración que

permite la clasificación de su contenido hacia reciclaje o degradación, dicho proceso es el paso de endosoma temprano a un endosoma con múltiples vesículas internas llamado cuerpo multivesiculares (MVB, del inglés *Multivesicular Body*) y finalmente la acidificación del endosoma que se denomina endosoma tardío (Figura 1, flecha azul) (Alberts *et al.*, 2015; Okada y Nozaki, 2006; Vassilleva y Nusrat, 2008). Tanto en endosomas tempranos como en endosomas con MVB se da la selección de proteínas para reciclarse, en el primer caso es un retorno directo hacia la membrana plasmática es regulado por GTPasas de tipo Rab (Figura 1, flecha naranja) y en endosomas con MVB primero selección para reciclaje es mediado por el complejo proteico retrómero que guían las proteínas seleccionadas hacia el aparato de Golgi y posteriormente a la membrana plasmática (Figura 1, flecha verde).

#### **1.2.1.1 La maquinaria proteica ESCRT**

La formación de MVB requiere de la maquinaria ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), la cual está compuesta por cuatro complejos denominados ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II y ESCRT-III, además de proteínas accesorias (Alberts *et al.*, 2015; Okada y Nozaki, 2006). La maquinaria ESCRT tiene como la remodelación y la escisión de la membrana, particularmente en los endosomas este proceso tiene el fin de clasificar del contenido endosomas etiquetado con ubiquitina en vesículas intraendosomales que serán guiadas hacia degradación (Alberts *et al.*, 2015; Okada y Nozaki, 2006).

La maquinaria ESCRT de forma típica se recluta de forma sucesiva según su numeración de cada complejo, es decir, los complejos proteicos ESCRT-0 (Vps27 y Hse1), ESCRT-I (Vps23, Vps28, Vps37 y Mvb12) y ESCRT-II (Vps22, Vps25 y Vps36) (Bilodeau *et al.*, 2003; Gill *et al.*, 2007; Hurley, 2008; Katzmann, Babst y Emr, 2001; Pornillos *et al.*, 2001; Raiborg y Stenmark, 2009; Reiborg *et al.*, 2001). El complejo ESCRT-II afinidad por el ESCRT-III (Vps2, Vps20, Vps24 y Vps32) (Raiborg y Stenmark, 2009; Christ *et al.*, 2017; Babst *et al.*, 2002; Luhtala y Odorizzi, 2004). Finalmente, el complejo ESCRT-III recluta a proteínas accesorias como la enzima desubiquinasa Doa4 y una ATPasa que da la energía necesaria para el

desensamble de la maquinaria ESCRT del endosoma (Vps4) (Luhtala y Odorizzi, 2004; Teis, Seksená y Emr, 2008).

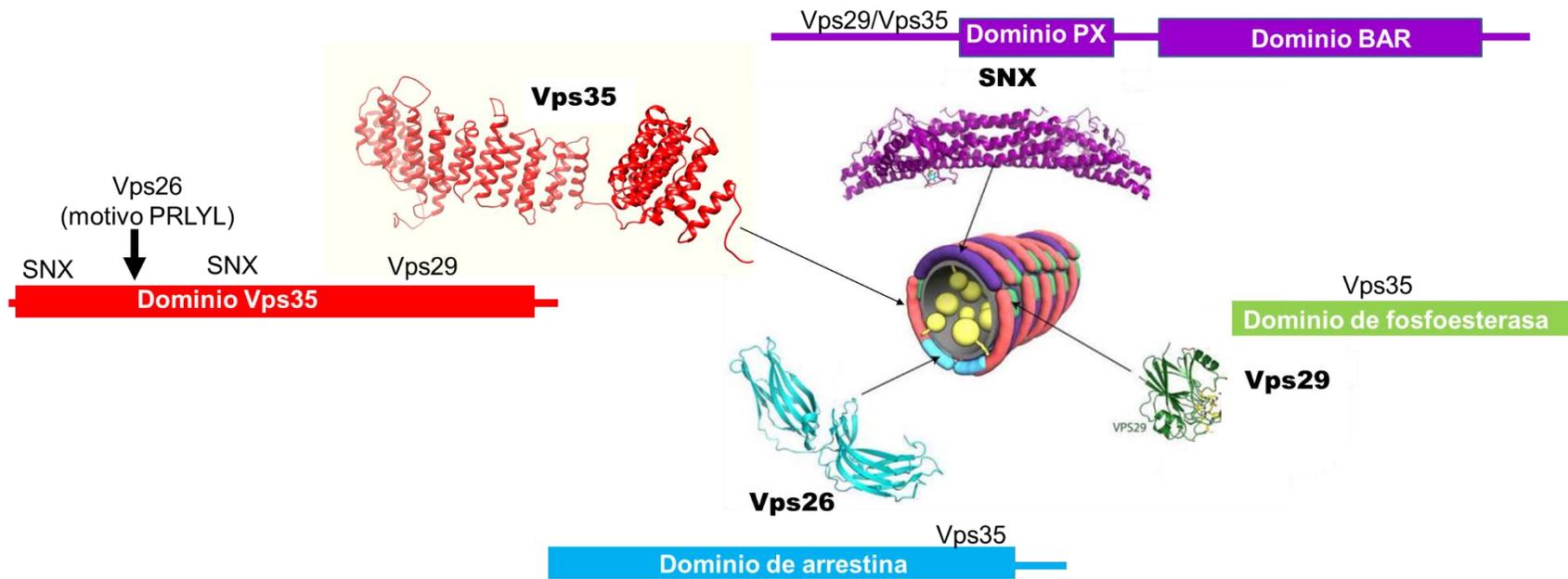
La etiqueta de ubiquitina reconocida por los complejos proteicos ESCRT-0, ESCRT-I y ESCRT-II se da mediante un proceso denominado ubiquitinación. Dicho proceso requiere de una o más etiquetas de ubiquitina añadida a los dominios citosólicos de las proteínas de la membrana endosomal, dicha etiqueta por su ubicación define la vía de degradación, es decir, vía de degradación proteosomal es resultado de la ubiquitinación en el residuo de lisina en la posición 48 y la vía de degradación lisosomal es producto de la ubiquitinación en el residuo de lisina en la posición 63 (Alberts *et al.*, 2015; Raiborg y Stenmark, 2009).

#### **1.2.1.2 Complejo proteico retrómero**

El retrómero es un complejo de proteínas compuesto por dos subunidades: el complejo de carga o CRC (*Cargo Recognition Complex*) y un heterodímero de proteínas SNX (*Sorting Nexins*), ambas se asocian con la cara citosólica del endosoma con el fin de mediar el transporte de proteínas específicas a la red Trans-Golgi (TGN) y finalmente hacia la membrana plasmática (Figura 1, flecha verde) (Bonifacino y Hurley, 2008).

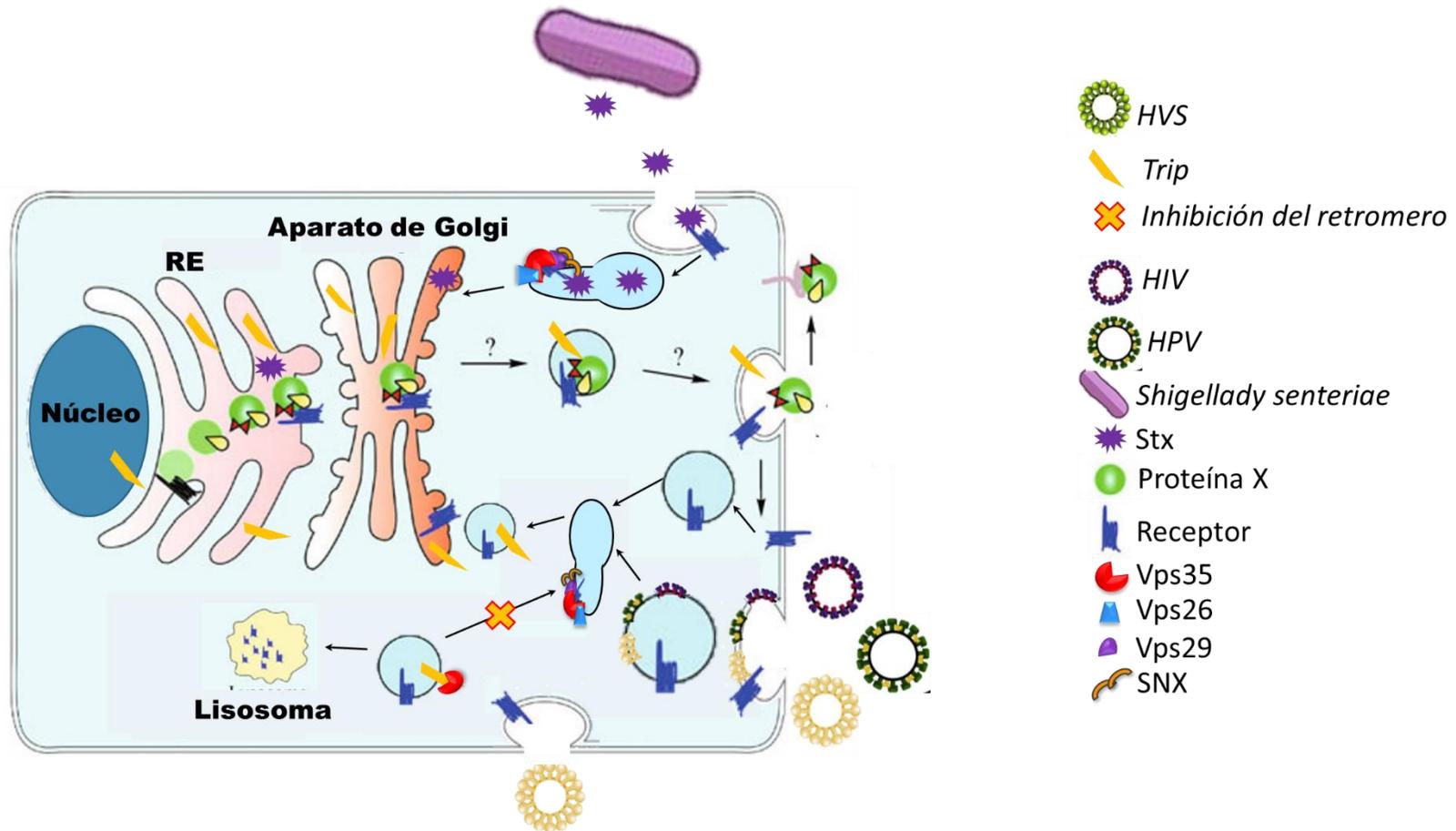
El retrómero se ha caracterizado principalmente en dos modelos, *Saccharomyces cerevisiae* (levadura) y *Homo sapiens* (humano) entre los que hay diferencias entre las proteínas que componen el heterodímero de proteínas SNX. En levaduras, el retrómero está compuesto por cinco proteínas, un heterodímero de proteínas SNX compuesto por las proteínas Vps5 y Vps17; mientras el del CRC está formado tres proteínas Vps26, Vps29 y Vps35 (Trousdale y Kim, 2015). En mamíferos, el CRC se compone de las tres proteínas identificadas en levaduras y el heterodímero de proteínas SNXs está compuesto por SNX1 o SNX2 ambas homologas a Vps5 de levaduras, y SNX5 o SNX6 homologas a Vps17 de levaduras (Trousdale y Kim, 2015).

El reclutamiento del complejo proteico al endosoma se da por el CRC, por lo que este también media la selección de las proteínas a reciclar. Dicho reclutamiento inicia con la unión de la proteína Vps35 (Figura 2, color rojo) a secuencias de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos presentes en la porción citosólica de receptores en la membrana endosomal (Trousdale y Kim, 2015). Vps35 también tiene la función de interaccionar/reclutar a las otras proteínas que componen el CRC (Vps26 y Vps29), esto mediante la unión del motivo PRLYL ubicado hacia el N-terminal de Vps35 a Vps26 (Figura 2, color azul) y en el caso de Vps29 (Figura 2, color verde), la porción C-terminal de Vps35 interacciona con el dominio de fosfoesterasa de Vps29 (Trousdale y Kim, 2015; Bonifacino y Hurley, 2008). Al CRC se le une al heterodímero de proteínas SNX, por las proteínas Vps29 y Vps35 (Bonifacino y Hurley, 2008). Adicionalmente la familia de proteínas SNX tiene dos dominios: el dominio PX (*Phox homology*) que es responsable de la unión con fosfatidilinositol 3-fosfato (PI(3)P) presente en la membrana por lo que permite el reclutamiento de estas proteínas hacia endosomas en transición de temprano a tardíos de una forma independiente del CRC; y el dominio BAR (*Bin-antifisina-RVs*) necesario para la unión con otra proteína SNX, dicha unión le da la capacidad de curvarse la cual es característica del heterodímero de proteínas SNX útil para la formación de alargamientos de una parte del endosoma que darán paso a la formación de una nueva vesícula con los receptores de la membrana de endosomal que será reciclados (Figura 1, flecha verde) (Trousdale y Kim, 2015; Bonifacino y Hurley, 2008; Watanabe et al., 2018; Deng et al., 2013).



**Figura 2: Complejo proteico retrómero**

El complejo de reconocimiento de carga (CRC) está compuesto por tres proteínas Vps35 (rojo), Vps26 (verde) y Vps29 (azul). Las proteínas SNX (morado) forman dímeros que interactúan con el CRC y la membrana del endosoma para formar las estructuras tubulares características del retrómero (Figura modificada de Bonifacino y Hurley, 2008)).



**Figura 3: Funciones del complejo proteico retrómero.**

El retrómero tiene una función principal en el reciclaje de receptores que median el transporte de proteínas (Proteína X) desde el aparato Golgi. Además, tiene un papel durante infecciones bacterianas y en infecciones virales. Los virus HPV, HIV y HVS utilizan el reconocimiento del retrómero para evitar la degradación de las proteínas que formaran nuevos virus. En el caso de HVS mediante la unión de la proteína Trip (amarillo) con la proteína Vps35 inhibe la formación del complejo proteico retrómero. En las bacterias *Shigella dysenteriae* y *Escherichia coli* con la producción de toxinas, al ser internalizadas son reconocidas por el retrómero para evitar su degradación y ser transportadas al retículo endoplasmático (ER), donde impiden la síntesis de proteínas.

### 1.2.1.2.1 Funciones del complejo proteico retromero

La función mejor caracterizada del complejo proteico retromero es el reciclamiento de receptores en la membrana, siendo el ejemplo de *Saccharomyces cerevisiae* con Vps10, en mamíferos con el receptor de manosa 6-fosfato independiente de cationes (Figura 4) (CI-MPR) y SORT (*Sortilin*) (Trousdale y Kim, 2015; Bonifacino y Hurley, 2008). Dichos receptores son reconocidos por la proteína Vps35 por secuencias de aminoácidos de tipo hidrofóbico y aromático variantes, en caso de CI-MPR es WLM y Vps10 es FYVFSN (Trousdale y Kim, 2015; Bonifacino y Hurley, 2008). Estos receptores llevan los precursores de hidrolasa ácida recién sintetizados desde el Aparato de Golgi a los endosomas para su posterior administración a la vacuola y a los lisosomas, respectivamente (Trousdale y Kim, 2015). Tras la liberación de su ligando (precursores de hidrolasa acida) estos son reconocidos por la proteína Vps35 del retromero.

Otros receptores reciclados por el retromero incluyen Sortilina que es reconocido por la secuencia FLV, SorLA/SorL1 (*Sortilin-related receptor L*) se reconoce por la secuencia FTAFANSHY, AtVSR1 (Vacuolar sorting receptor in *Arabidopsis thaliana*), Wntless (Wls) receptor de Wnt, DMT1 (*Divalent Metal Transporter 1*) en el que se reconoce la secuencia YLL,  $\beta$ 2ARs (*Beta-2 adrenergic receptors*) que es reconocido por la secuencia PDZ, APP (*Amyloid Precursor Protein*), BASE1 ( $\beta$ -Secretase-1). (Das *et al.*, 2012; Trousdale y Kim, 2015; Shimada *et al.*, 2006; Fiji *et al.*, 2007; Seaman, 2012)

El retrómero tiene un papel durante el mecanismo de infección de tres virus, Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo-1 (VIH-1), Virus del Pappiloma Humano del serotipo 16 (PVH-16) y Herpesvirus saimirí (HVS), esto debido a que el proceso de formación de nuevas partículas virales en una célula infectada requiere del secuestro de la maquinaria su célula huésped (Trousdale y Kim, 2015). En VIH-1 la glicoproteína de la envoltura (Env) se une directamente a los componentes del retrómero Vps35 y Vps26, evento que tiene como fin evitando su detección por el sistema inmune transportar esta proteína del endosoma al aparato de Golgi

(Trousdale y Kim, 2015; Gropelli *et al.*, 2014). En VPH dos proteínas que componen la cápside (L1 y L2) son separadas por las proteínas ciclifilina y SNX17, una vez separada la proteína L1 se une a los tres componentes del CRC y migra hacia el lisoma, mientras L2 unido al genoma viral se une a SNX17 y se moviliza hacia el aparato de Golgi (Pim *et al.*, 2015; Popa *et al.*, 2015). En HVS el proceso de infección interrumpe directamente la fusión del CRC, mediante la interacción de la proteína Trip (Tirosina cinasa) a Vps35, las cuales se movilizan hacia el lisosoma (Figura 4) (Trousdale y Kim, 2015).

En las bacterias causantes de infecciones gastrointestinales, *Shigella dysenteriae* productora de la toxina Stx (Shiga toxin) y *Escherichia coli* enterohemorrágica productora de verotoxina (Trousdale y Kim, 2015; Jia—Jia, 2016). Estas toxinas son internalizadas por los receptores en la membrana plasmática de células epiteliales del intestino, después son transportadas al aparato de Golgi por medio de la unión a proteínas SNX de donde migra al retículo endoplasmático para bloquear la síntesis de proteínas (Figura 4) (Bujny *et al.*, 2007).

### **1.2.2 Trafico vesicular en *E. histolytica***

En el parásito *E. histolytica* los procesos de endocitosis y exocitosis juegan un papel clave para el transporte de las moléculas implicadas en el proceso de colonización antes descrito (adhesión, inducción de citotoxicidad y fagocitosis). Además, el tráfico vesicular es un evento fundamental, ya que *E. histolytica* depende de fuentes exógenas para acceder a nutrientes (fagocitosis de microorganismos en el intestino grueso y células del huésped) y la secreción de las proteínas implicadas en cada uno de los mecanismos de patogenicidad (Chelsea y William, 2014).

#### **1.2.1.1.1 El retrómero en *E. histolytica***

En *E. histolytica*, el retrómero según un análisis *in silico* del genoma de la cepa HM-1: IMSS reportado por Loftus *et al.* (2005), está formado únicamente por el complejo de carga (CRC) que incluye a las proteínas: Vps26, Vps29 y Vps35, y al momento no se conocen genes ortólogos de las proteínas SNX de levadura (Vps5 y Vps17) o

de mamífero (SNX1, SNX2, SNX5 y SNX6) con los dominio característicos de este tipo de proteínas (PX y BAR) descritos antes (Bonifacino y Hurley, 2008; Nakada-Tsukui *et al.*, 2005). Según lo cual, el retrómero identificado por Nakada-Tsukui y colaboradores (2005) en *E. histolytica* se integra por tres proteínas denominadas EhVps26, EhVps29 y EhVps35 (Tabla 1) se denominó retrómero-*like*. Este complejo proteico tiene un peso molecular de 300 a 500 kDa y se reclutan de forma típica, es decir el extremo N-terminal de EhVps35 interacciona con el C-terminal de EhVps26 y el C-terminal de EhVps35 interacciona con el C-terminal de EhVps29.

**Tabla 1: Características de las proteínas que integran el retrómero en *E. histolytica*.**

	Tamaño (aa)	Peso molecular (kDa)	Punto isoeléctrico (pI)	Identidad con humano	Identidad con levadura
EhVps26	413	48	4.96	44%	38%
EhVps29	185	20.8	5.56	56 %	35 %
EhVps35	757	87.2	5.46	27 %	22 %

Recientemente en *E. histolytica* se han identificado dos proteínas con el dominio PX y ausencia del dominio BAR necesario para la dimerización de las proteínas SNX que fueron nombradas EhSNX1 y EhSNX2 (Watanabe *et al.*, 2018). Estas proteínas tienen unidos a PI3P y se localizan en fagosomas. Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado una interacción proteína-proteína entre estas SNX y las proteínas del complejo retrómero-*like* de *E. histolytica* (Watanabe *et al.*, 2018).

Debido a la ausencia del motivo BAR característico de las proteínas SNX EhSNX1 y EhSNX2, se plantea la posibilidad de que la regulación de la función del retrómero en *E. histolytica* esté relacionado con GTPasas pequeñas, especialmente las del tipo Rab7 (Bonifacino y Hurley, 2008). Esta hipótesis está basada en la interacción de la proteína Rab7A en estado activo (GTP-Rab7A) con el C-terminal de la proteína Vps26 del retrómero (Nakada-Tsukui *et al.*, 2005). La importancia de la interacción de las GTPasas pequeñas con el retrómero en *E. histolytica* para su función, se sustenta además en la presencia de múltiples genes para este tipo de proteínas en el genoma amibiano y de su interacción con vesículas. Especialmente las GTPasas

pequeñas de tipo Rab tienen 102 genes, pero solo para algunas de estas se ha demostrado su función en la secreción de proteínas como cisteína proteasas, amebaporos y la lectina Gal/GalNac (Bosch y Siderovski, 2013; Nakada-Tsukui *et al.*, 2010; Welter y Temesvari, 2009; Saito-Nakano *et al.*, 2004; Saito-Nakano *et al.*, 2007; Bonifacino y Hurley, 2008; Nakada-Tsukui *et al.*, 2005).

Experimentalmente también se ha demostrado la ubicación de la proteína EhVps26 en co-localización con la proteína Rab7A en condición basal dispersa en el citoplasma, relocalizándose hacia PPV y fagosomas a los 5 y 30 minutos de eritrofagocitosis (Nakada-Tsukui *et al.*, 2005). Adicionalmente, se plantea al retromero con una función en el reciclaje de un receptor de cistein proteasas (CP) y por un análisis in silico de Díaz-Hernández (2017) en su tesis de maestría se predice una interacción del complejo ESCRT-II (EhVps22, EhVps25 y EhVps36), específicamente entre dos proteínas EhVps36 y EhVps25 con la proteína central del CRC del retrómero EhVps35 (Bosch y Siderovski, 2013; (Nakada-Tsukui *et al.*, 2010).

## 2. JUSTIFICACIÓN

El tráfico vesicular juega un papel importante en la selección de proteínas que van hacia una vía de degradación o de reciclaje, así como en la secreción de proteínas que participan en la patogénesis de *E. histolytica*. Los trofozoítos de este organismo al depender de la endocitosis para su nutrición son organismos altamente fagocíticos, resultado de esto el tráfico vesicular tiene un papel central en su biología y por ende en la expresión de su virulencia.

El complejo proteico retrómero en otros eucariontes ha sido descrito con un papel en la selección de proteínas que serán transportadas desde el endosoma al aparato de Golgi y de ahí hacia la membrana plasmática. Hasta el momento no existen estudios que caractericen la expresión de las proteínas formadoras del retrómero-*like* en *E. histolytica* durante la fagocitosis, ya que el único estudio previo del retrómero en este organismo analiza la relocalización de EhVps26 durante el proceso de eritrofagocitosis durante 5 y 30 min. Por lo que, es importante dilucidar el papel del resto de las proteínas que conforman el retrómero-*like* en *E. histolytica* no solo a nivel de localización. Particularmente el estudio de la proteína identificada como central para el retrómero en eucariontes superiores (Vps35) por ser la encargada de seleccionar las proteínas que serán recicladas y reclutar el resto de las proteínas del retrómero (Vps26, Vps29 y SNX), en el caso particular de *E. histolytica* ayudaría a comprender de la relación entre el reciclaje de proteínas durante la fagocitosis y los procesos de patogenicidad.

### **3. HIPÓTESIS**

Como parte del complejo retrómero-*like* de *E. histolytica*, EhVps35 participa durante el proceso de fagocitosis.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar a la proteína EhVps35 durante la fagocitosis en *E. histolytica*.

#### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Realizar un análisis *in silico* a la proteína EhVps35 de *E. histolytica*.
- Determinar los niveles de transcripción del gen *Ehvps35* durante la eritrofagocitosis de *E. histolytica*.
- Establecer los niveles de expresión de la proteína EhVps35 durante la eritrofagocitosis de *E. histolytica*.
- Analizar la localización la proteína EhVps35 durante la eritrofagocitosis de *E. histolytica*

## 5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

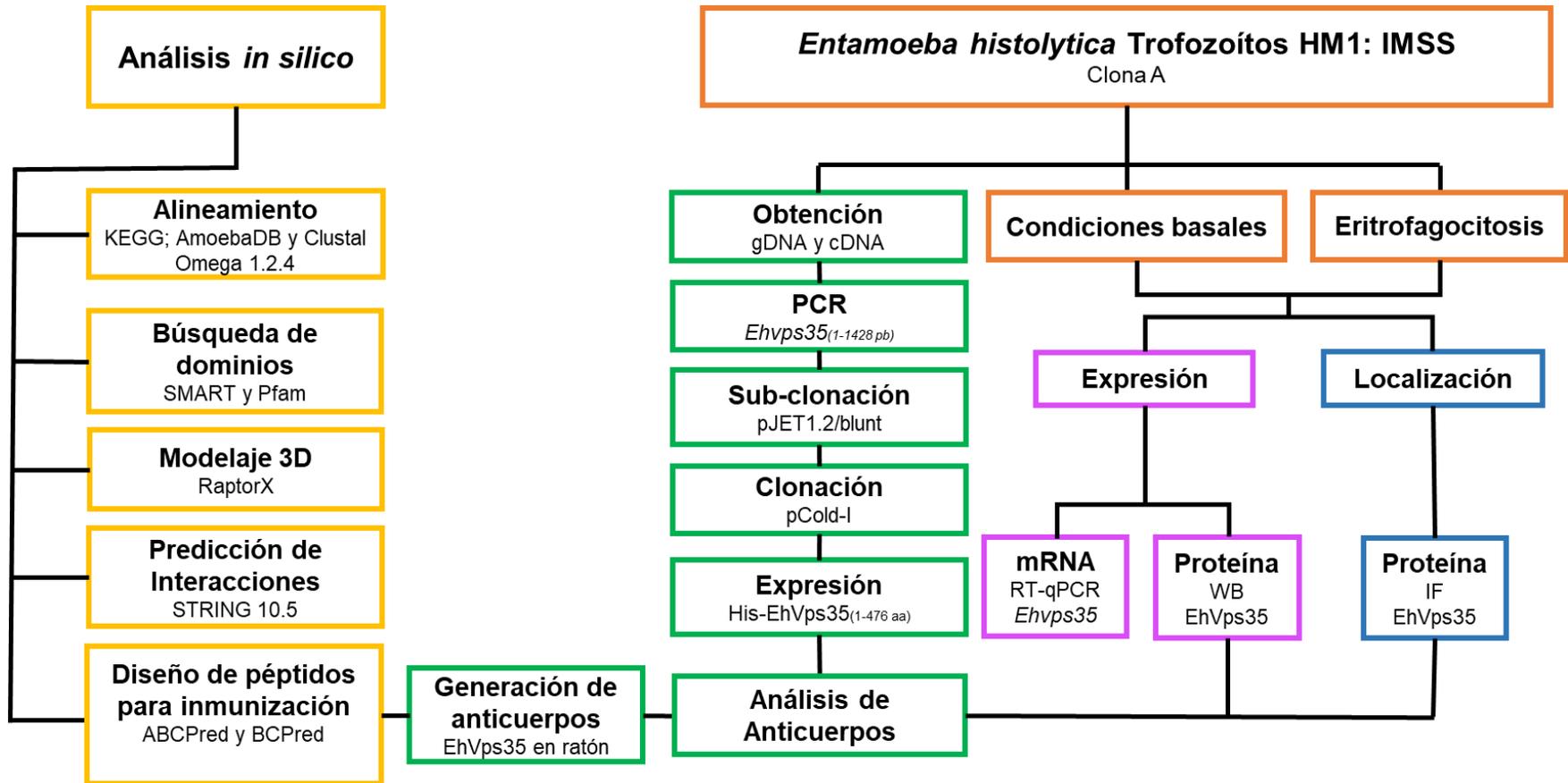


Figura 4: Estrategia experimental

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Análisis *in silico* de la proteína EhVps35 de *E. histolytica*

Con el fin de identificar las secuencias homólogas a Vps35 de humano (*Homo sapiens*, ID de NCBI: NP\_060676) y levadura (ScVps35 de *Saccharomyces cerevisiae*, ID de NCBI:NP\_012381) en el proteoma de *E. histolytica*, se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de HsVps35 o ScVps35 utilizando un BLAST (por sus siglas en inglés *Basic Local Alignment Search Tool*) en la base de datos AmoebaDB. Con lo que se encontraron cinco secuencias, que fueron nombradas en el trabajo como EhVps35-A (EHI\_096520), EhVps35-B (EHI\_086580), EhVps35-C (EHI\_411950), EhVps35-D (EHI\_002990) y EhVps35-E (EHI\_168080).

Las cinco secuencias identificadas en AmoebaDB fueron comparadas con HsVps35 y ScVps35 por medio de un alineamiento basado en el programa Clustal Omega 1.2.4. Los resultados se visualizaron en Jalview 2.10.1. Además, se predijo la estructura terciaria en las bases de datos I-TASSER y RaptorX. Dichos modelos, se eligieron mediante un análisis en ERRAT, Verify3D, ProSA-web y Rampage (Assessment of the Ramachandran Plot), para determinar el modelo con la mayor estabilidad y similitud con el cristal de HsVps35 (5F0K para la región N-terminal y 2R17 para la región C-terminal) disponibles en PDB (por sus siglas en inglés *Protein Data Bank*). El alineamiento estructural se realizó en RaptorX Structure Alignment Server. La búsqueda de los dominios funcionales se hizo usando las bases de datos SMART (por sus siglas en inglés *Simple Modular Architecture Research Tool*) y Pfam 31.0.

Con base en el mayor porcentaje de identidad con las secuencias de HsVps35 y ScVps35, presencia del motivo PRLYL hacia el N-terminal y el mayor valor de identidad estructural con respecto al cristal de HsVps35 se selecciono a la

secuencia que fue utilizada para los análisis *in silico* posteriores para predecir las interacciones con otras proteínas y la relación de EhVps35 con la membrana.

El modelo de predictivo de las interacciones de EhVps35 con otras proteínas se realice usando el programa STRING 10.5. Finalmente, la determinación de la relación de EhVps35 con la membrana se determinó mediante la identificación de regiones transnómbrales en los programas TMAP, TMHMM 2.0, CCTOP y HMMTOP, para por último hacer un modelo 3D que refleja la ubicación de las regiones transmembranales en la proteína para determinar el tipo de proteína (periférica o transmembranal) en el programa OPM (Orientations of Proteins in Membranes).

## 6.2 Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*

Trofozoítos de de *E. histolytica* HM1: IMSS clona A (Orozco, *et al.*, 1980) fueron cultivados en un medio axénico TYI-S-33 a 37 °C (Diamond, *et al.*, 1978) suplementado con 10% de suero bovino, una mezcla de vitamina Diamond (JRH, Biosciences), 1.2 U/ml de penicilina (Lakside) y 1.4 mg/ml de estreptomycin (Lakeside). Estos

## 6.3 Ensayos de eritrofagocitosis de *E. histolytica* para extracción de proteína totales y RNA

Los trofozoítos que se usaron fueron tratados por 10 min en hielo para promover su desprendimiento de cualquier sustrato y realizar el conteo respectivo en la cámara de Neubauer usando la siguiente fórmula:

$$\left( \frac{\text{No. amibas en los cuatro cuadrantes}}{4} \right) \times (\text{Factor de dilucion}) = \text{amiba/ml}$$

Los eritrocitos fueron obtenidos de una muestra de sangre humana lavada tres veces con la solución Alsever (glucosa 2.05%, cloruro de sódico 0.42%, ácido cítrico 0.055%) con centrifugaciones a 3 000 rpm por 5 min entre cada lavado. Los eritrocitos aislados se contaron en una cámara de Neubauer usando la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{\text{No. eritrocitos}}{5}\right) \times (25 \times 10\,000 \times \text{Factor de dilución}) = \text{eritrocitos/ml}$$

La cinética de eritrofagocitosis se realizó con la interacción de un millón de trofozoítos de *E. histolytica*, los cuales estuvieron en contacto con veinticinco millones de eritrocitos en medio TYI sin suero a 37 °C por 5, 15, 20, 30, 60 y 90 minutos, que fueron comparados con amibas en condición basal (sin contacto con eritrocitos). Finalizado el tiempo de interacción se usó agua estéril a 4 °C para causar la hemólisis de los eritrocitos no fagocitados.

## 6.4 Determinación de los niveles de mRNA del gen *Ehvps35*

### **6.4.1 Extracción de RNA total de *E. histolytica***

Trofozoítos de *E. histolytica* (HM1: IMSS de la clona A) procedentes de una cinética de eritrofagocitosis, se centrifugaron a 1 700 rpm por 7 min a 4 °C, la pastilla resultante se resuspendió en 200 µl de TRIzol® (Invitrogen) y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. A dicha muestra se le agregó 30 µl de cloroformo y se incubó por 3 min. Posteriormente, se centrifugó a 13 000 rpm por 15 min a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa únicamente y se le adicionaron 500 µl de isopropanol por cada mililitro de TRIzol® (Invitrogen). Esto se mezcló por inversión y se incubó por 10 min, para ser centrifugado a 13 000 rpm durante 10 min a 4 °C. Finalmente, se descartó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 500 µl de etanol al 75% y se centrifugó a 8 000 rpm por 5 min a 4 °C. Este procedimiento se repitió dos veces y la pastilla se resuspendió en 30 µl de agua DEPC (dietilpirocarbonato) para ser

cuantificar el RNA en el espectrofotómetro NanoDrop TM Life y visualizado usando 750 ng de RNA en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

#### 6.4.2 Diseño del *primer* para los ensayos de RT-qPCR del gen *Ehvps35* de *E. histolytica*

Para la cuantificación del mRNA de del gen *Ehvps35* (ensayo de RT-qPCR o Quantitative reverse transcription PCR) se diseñó un par de *primers* que amplificaran como máximo 200 pb y tuvieran una  $T_m$  (*Primer Melting Temperature*) de 60 °C. El diseño se realizó en la plataforma Primer3 usando la secuencia del gen *Ehvps35* (EHI\_002990) de *E. histolytica*. Las secuencias obtenidas se analizaron en el programa OligoAnalyzer 3.1 para verificar que la formación de estructuras secundarias, homodímeros y heterodímeros fuera a temperaturas diferente a la temperatura de alineamiento, según lo cual se eligió el siguiente par de *primers*:

**Tabla 2: *Primers* diseñados para la amplificación del gen *Ehvps35*.**

	Ubicación en el gen <i>Ehvps35</i> (pb)	Secuencia	$T_m$ (°C)	GC (%)
<b>Sentido <i>Ehvps35</i></b>	1567 a 1587	GCTGCGCCATTAATTTTTGT	60.1	40
<b>Antisentido <i>Ehvps35</i></b>	1735 a 1755	TACCAGCTTCACATGCTCCA	60.41	50

Adicionalmente se verificó la especificidad de los *primers* con un alineamiento en las bases de datos NCBI y AmoebaDB, según lo cual únicamente la secuencia resultado de dicho alineamiento fue correspondiente al gen *Ehvps35* (NCBI ID: EHI\_002990).

### 6.4.3 Cuantificación del mRNA del gen *Ehvps35* durante una cinética de eritrofagocitosis de *E. histolytica*

---

Para la cuantificación del mRNA de del gen *Ehvps35* se realizó un ensayo de RT-qPCR (Quantitative reverse transcription PCR) de muestras de RNA procedentes de trofozoítos de una cinética de eritrofagocitosis. La amplificación se realizó a partir de muestras de RNA de trofozoítos de *E. histolytica* procedentes de una cinética de eritrofagocitosis (Sección 6.4) usando los *primers* FW *Ehvps35* (5´ GCTGCGCCATTAATTTTTGT 3´) y RV *Ehvps35* (5´ TACCAGCTTCACATGCTCCA 3´) con el kit KAPA SYBR FAST One-Step RT-qPCT Master Mix (2X) en un volumen final de 10 µl en las siguientes condiciones de amplificación: 42 °C por 5 min, 95 °C a 3 min, seguido de 40 ciclos de amplificación con 95 °C por 3 seg y 60 °C por 30 seg, seguido de la curva de disociación. Los resultados obtenidos se analizan con el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  normalizando los resultados, usando como gen endógeno el S2 40S ribosomal de *E. histolytica* y finalmente los resultados obtenidos de la condición basal, dato al que siempre se le dio el valor de 1.

### 6.5 Clonación del fragmento *Ehvps35*(1-1428 pb) de *E. histolytica*

---

#### 6.5.1 Diseño del *primers* para la clonación del fragmento *Ehvps35*(1-1428 pb) de *E. histolytica*

Los *primers* se diseñaron para amplificar la secuencia correspondiente al extremo N-terminal de proteína EhVps35, denominado fragmento *Ehvps35*(1-1428 pb). Se usó la plataforma Primer3 y la secuencia del gen *Ehvps35* (EHI\_002990) de *E. histolytica*, las secuencias obtenidas se analizaron en OligoAnalyzer 3.1 para determinar que la formación de estructuras secundarias, homodímeros y heterodímeros fuera a temperaturas diferente a la temperatura de alineamiento, según lo cual se eligió el par de *primers* sentido *Ehvps35*(1-1428) y antisentido *Ehvps35*(1-1428) (Tabla 3). A dichos *primers* se les incorporo un par de nucleótidos

cisteína o guanina hacia el extremo 5', además de la secuencia que reconocen las enzimas *KpnI* (Tabla 3, color verde) o *BamHI* (Tabla 3, color azul)

**Tabla 3: Primers diseñados para la amplificación del fragmento *Ehvps35*(1-1428 pb).**

Verde: secuencia reconocida por la enzima *KpnI*. Azul: secuencia reconocida por la enzima *BamHI*

	Secuencia	Tm (°C)	GC (%)
Sentido <i>Ehvps35</i> (1-1428)	CCGGTACCATGAGTCGTCCACAACGAGA	59.3	50
Antisentido <i>Ehvps35</i> (1-1428)	GGGGATCCTTTATATCATCTGGTTGATCTTG	55.2	29.2

Los *primers* elegidos amplifican un producto de 1428 pb. Adicionalmente se verificó la especificidad de los primer con un alineamiento en las bases de datos de NCBI y AmoebaDB, según lo cual únicamente reconocimiento fue el gen *Ehvps35* de la secuencia con la que fue diseñado (EhVps35-D con numero de acceso EHI\_002990).

### 6.5.2 Producción de *Escherichia coli* competentes de las cepas DH5α y BL21

Bacterias *E. coli* de la cepa DH5α fueron cultivadas en 5 ml de medio Luria-Bertani (LB: 10 g de triptona; 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, 950 ml de agua desionizada) a 37°C con movimiento contante (170 rpm) por 16 horas. Posteriormente se hizo un nuevo cultivo con 40 ml de medio LB, al que se inoculó 400 µl de cultivo inicia. Dicho cultivo se mantuvo en las condiciones antes descritas, hasta que se tuvo una densidad óptica de 0.4, a una longitud de onda de 600 nm. El cultivo se cosecho por centrifugación a 1700 rpm a 4 °C por 5 min, la pastilla se resuspendió en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM a 4 °C y se incubo durante 20 min a 4 °C. Terminando este tiempo la muestra se centrifugó en las mismas condiciones y la pastilla se resuspendió en 4 ml de CaCl<sub>2</sub>50 mM a 4 °C. Finalmente las bacterias competentes se guardaron a 4 °C hasta su uso.

La producción de bacterias competentes para *E. coli* cepa BL21 se realizó de la misma forma que en la cepa DH5 $\alpha$ , excepto que se cultivaron en medio LB adicionado con cloranfenicol a una concentración de 34  $\mu$ g/ml.

### **6.5.3 Amplificación del fragmento *Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub> de *E. histolytica***

A partir de RNA de *E. histolytica* (Sección 6.4) se obtuvo DNA complementario (cDNA) utilizando el *kit* “First Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR”, en las condiciones descritas por el proveedor.

La amplificó el fragmento *Ehvps35* (1-1428 pb) usando cDNA de *E. histolytica*, los *primers* FW *Ehvps35* N-terminal y RV *Ehvps35* N-terminal (Sección 6.5) usando las condiciones descritos para el *kit* KAPA Hifi Hot Start PCR, con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos ( 20 segundos a 98 °C, 5 minutos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C) y finalmente un extensión final a 72 °C por 1 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1%, en amortiguador TAE (Tris-Acetato-EDTA) y tinción con bromuro de etidio. La banda del amplificado de 1428 pb se cortó del gel de agarosa y se almaceno a -20 °C hasta su uso.

Las bandas correspondientes con el fragmento de interés se purificaron con el *kit* “GeneJET Gel extraction” (Thermo scienyific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El DNA obtenido se cuantifico por espectrofotometría a 260/280 nm (Nanodrop) y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

### **6.5.4 Ligación del fragmento *Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub> al vector de clonación pJET1.2/blunt**

El vector de clonación pJET1.2/blunt (Thermo Scientific™) fue elegido debido a que permite la ligación directa de productos de PCR que posean extremos romos generados por la DNA polimerasa de alta fidelidad, por lo que el fragmento *Ehvps35* (1-1428 pb) amplificados y purificado (Sección 6.6.2) se ligó sin pasos adicionales

usando el kit “CloneJET PCR Cloning” (Thermo Scientific™) según las especificaciones del proveedor. Debido a que el *Ehvps35* (1-1428 pb) tiene un tamaño de 1428 pb se utilizó 75 ng del dicho amplificado para la reacción de ligación. Los productos de la ligación (pJET1.2/*Ehvps35* (1-1428 pb)) se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

#### **6.5.5 Transformación de *E. coli* DH5α con la construcción pJET1.2/*Ehvps35*(1-1428 pb)**

Una alícuota de 100 µl de bacterias *E. coli* de la cepa DH5α competentes (Sección 6.6.1) se colocaron en interacción con los productos de la reacción de ligación (Sección 6.6.3). La mezcla se incubó durante 15 min a 4 °C, posteriormente se dio un choque térmico a 42 °C por 45 segundos, seguido por una incubación a 4 °C por 5 minutos. Al término de este tiempo se adicionaron 300 µl de medio LB y se incubó una hora a 37 °C en agitación (200 rpm).

Las células transformadas fueron espatuladas en cajas Petri con medio agar LB adicionado con ampicilina a 100 µg /ml para las células DH5α. Las placas se incubaron por 16 horas a 37 °C. Finalmente se verificó por PCR-*colony* (usando las condiciones descritas en la Sección 6.6.2) que las colonias crecidas en la caja Petri tuvieron la construcción (pJET1.2/*Ehvps35* (1-1428 pb)), aunque es importante señalar que el vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific™) posee un gen letal en el sitio de clonación, por lo que solo las células que poseen los plásmidos recombinantes son capaces de sobrevivir.

#### **6.5.6 Purificación de la construcción pJET1.2/*Ehvps35*(1-1428 pb)**

Se tomó muestra de una colonia de *E. coli* de la cepa DH5α verificada por PCR-*colony* con la construcción la construcción pJET1.2/*Ehvps35*(1-1428 pb), para cultivarla en 5 ml de medio LB por 16 horas a 37 °C con agitación constante (180 rpm). El medio fue suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. A continuación, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 14 000 rpm por 1 minuto a temperatura

ambiente. De la pastilla resultante se extrajo el plásmido utilizando el *kit* “QUIAGEN Plasmid Purification” (QUIAGEN) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Finalmente, plásmido purificado se resuspendió en 25 µl de agua libre de nucleasas, se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop™ Life y se visualizó un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Se guardó a -20 °C hasta su uso.

#### **6.5.7 Ensayo de restricción de la construcción pJET1.2/*Ehvps35*(1-1428 pb)**

La restricción se realizó con las enzimas *KpnI* y *BamHI* Fast Digest (Thermo Scientific). La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente 2 µl de amortiguador Fast Digest 10X, 1 µg de DNA plasmídico, 1 µl de cada enzima, en un volumen final de 20 µl aforado con agua libre de nucleasas. La reacción se mezcló y se incubó por 16 horas a 37 °C y se inactivó a 80 °C durante 5 min. Al producto de la digestión se agregó 5 µl de buffer Gel Loading Dye Blue 6X para ser analizados en geles de agarosa al 1%, en amortiguador TAE (Tris-Acetato-EDTA) teñidos con bromuro de etidio. La banda correspondiente al fragmento *Ehvps35*(1-1428 pb) se purificó como se describió en la sección 6.6.5.

#### **6.5.8 Ligación del fragmento *Ehvps35*(1-1428 pb) al vector pColdI**

La ligación del fragmento *Ehvps35*(1-1428 pb) digeridos y purificados (Sección 6.6.7) al vector de expresión pColdI digerido con las mismas enzimas de restricción se hizo utilizando el kit “Rapid DNA ligation” (Thermo Scientific™). Se mezcló para la reacción: 100 ng del vector pColdI digerido, 300 ng del inserto, 4 µl del amortiguador de ligación rápida 5X, 1 µl de la T4 DNA ligasa, que se llevó a un volumen final de 20 µl con agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó a 22 °C por 5 min.

El producto de la se utilizó para transformar bacterias *E.coli* de la cepa DH5α de la manera que ya se explicó antes (Sección 6.6.4). Las colonias donde se verificó la presencia del fragmento de interés por PCR-*colony* fueron crecidas en medio LB para la purificación de la construcción pColdI/*Ehvps35*(1-1428 pb) como se describió en la sección 6.6.5

### 6.5.9 Secuenciación de la construcción pColdI/*Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub>

De forma preliminar para la identificación del gen *Ehvps35* y la identificación de errores en el marco de lectura de la construcción pColdI/*Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub> se realizó la secuenciación de dicha construcción usando las primeras 500 pb del *Ehvps35*. La reacción de amplificación requerida para la secuenciación se realizó con el *kit* “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing”, usando las especificaciones del fabricante. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf, utilizando el siguiente programa desnaturalización inicial a 96 °C durante 5 min y 30 ciclos: 96 °C por 30 segundos,  $T_m$  del *primers* por 30 segundos y 60 °C por 4 min. Se realizó el *primer* sentido EhVps35<sub>(1-1428)</sub>.

La precipitación de la reacción de secuenciación se realizó mediante la adición de 60 µl de etanol absoluto, donde se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos cubierto de la luz. Después, la mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 20 min, la pastilla se lavó dos veces con 250 µl de etanol al 70%. Para eliminar el sobrenadante se centrifugó a 14000 rpm por 5 min y se eliminó la totalidad del etanol. Finalmente, la muestra se envió a la unidad de secuenciación del CINVESTAV, unidad Zacatenco.

### 6.1.10 Inducción de las proteínas recombinantes His-EhVps35<sub>(1-476 aa)</sub>

Bacterias *E. coli* de la cepa BL21 fueron transformadas con la construcción pColdI/*Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub> como se describe en la sección 6.6.5. Una colonia de la cepa transformada se inoculó en 5 ml de medio LB adicionado con 100 µg/ml ampicilina, las bacterias se crecieron a 16 °C con agitación constante a 170 rpm por 16 horas, con un previo choque térmico de 20 min en hielo. El cultivo se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 a 600 nm. La inducción de la proteína recombinante se realizó por la adición de IPTG (isopropil-β-D-1-tio-galactósido) hasta una concentración de 0.1 mM e incubándose durante 16 h a 37 °C. Los cultivos se centrifugaron a 8,000 g durante 20 minutos. Adicionalmente un volumen

de 1ml del cultivo inducido se cosecho por una centrifugación a 13, 000 por 10 min y estas pastillas se resuspendieron con 100 µl de amortiguador de muestra 5X (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, glicerol 26%, SDS 10%, azul de bromofenol 0.05% y 5 µl de β-mercaptoetanol) y posteriormente las mezclas se pusieron a 98 °C durante 5 min. Las muestras se analizaron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12% cargando 30 µl de las muestras de cada condición por pozo.

### 6.7 Extracción de proteínas totales de *E. histolytica*

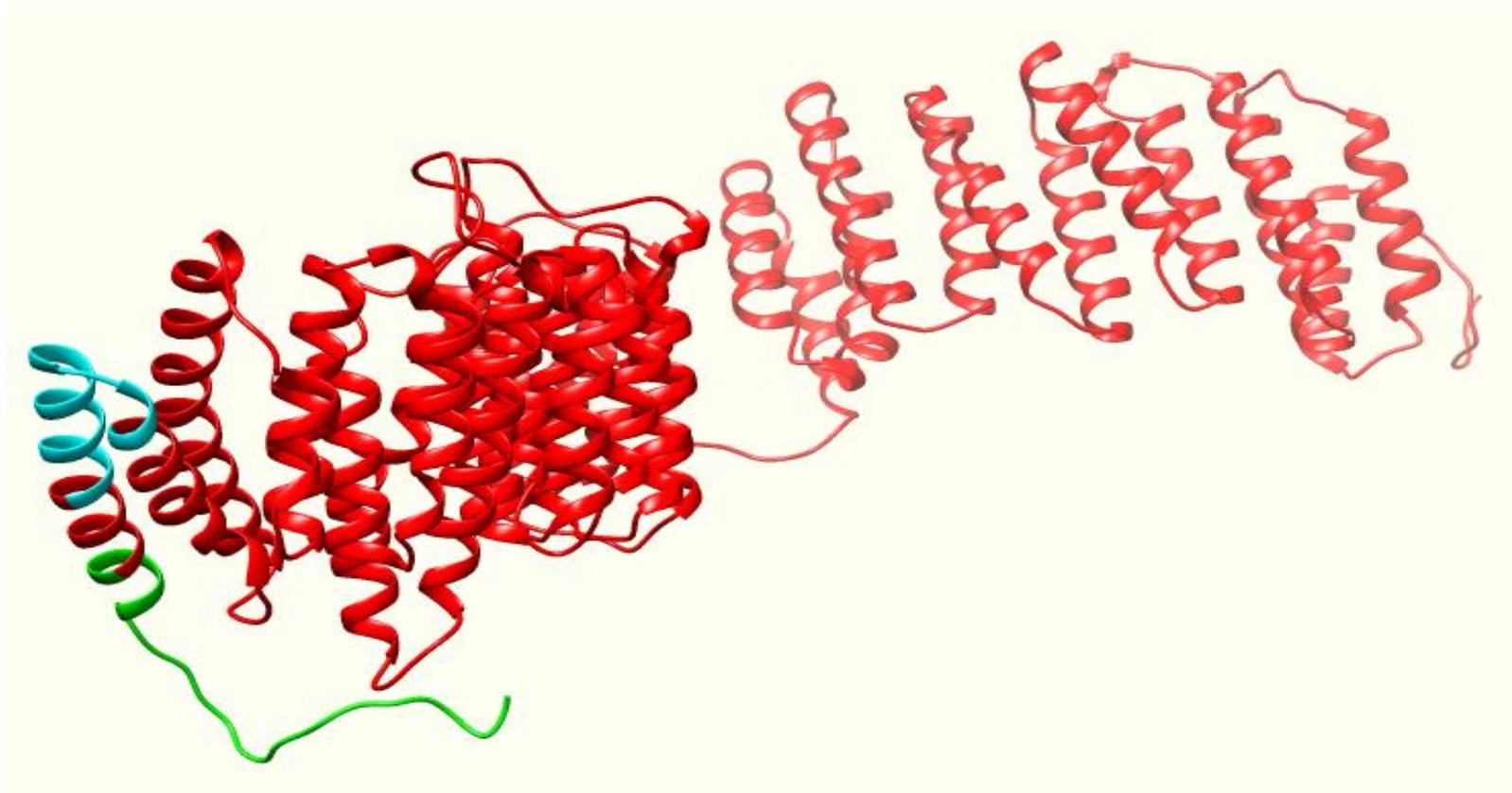
Los trofozoítos procedentes del ensayo de eritrofagocitosis, fueron tratados por 10 min en hielo para revertir la adhesión a cualquier sustrato y favorecer la hemolisis de los eritrocitos no fagocitados durante el ensayo. Posteriormente se centrifugó a 1,700 rpm por 7 min. La pastilla obtenida se resuspendió en PBS 1X y se centrifugó en las mismas condiciones, la nueva pastilla se resuspendió en una mezcla de inhibidores de proteasas según la siguiente proporción: 1 ml de PHMB 100 mM por cada 30 millones de trofozoítos de *E. histolytica*, 25 µl de E-64 1 mg/ml por cada 10 millones de amibas y 20 µl del cocktail de inhibidores de proteasas (PMSF 100 mM, benzamidina 49 mM, aprotinina 0.087 mM, peptatina A 0.1777 mM, leupeptina 0.2858 Mm y E-64 0.6824 mM) por cada 10 millones de amibas. Después, las muestras se incubaron en nitrógeno líquido por 5 min y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. Antes de ser empleadas, las muestras fueron cuantificadas usando el espectrofotómetro NanoDrop TM Life y se agregó un volumen de buffer de muestra 2X (Tris-base 0.125 M a pH 6.8, SDS 4%, glicina 20%, β-mercaptoetanol 10% y Azul de bromofenol 0.1%) y se incubarán a 100 °C por 3 min.

### 6.8 Obtención de anticuerpos policlonales α-EhVps35

A fin de tener anticuerpos policlonales específicos para el reconocimiento de la proteína EhVps35 en trofozoítos de *E. histolytica* se diseño un péptido a partir de la

secuencia de aminoácidos de la proteína EhVps35, que será inoculado en ratones de la cepa BALB/c para obtener anticuerpos policlonales  $\alpha$ -EhVps35.

El diseño del péptido se realizó usando los programas ABCpred y BCEpred, usando la secuencia de aminoácidos de la proteína EhVps35-D de *E. histolytica* (NCBI ID: EHI\_002990). De las secuencias obtenidas por ambos programas se eligió al péptido ubicado de 30 a 45 aa en la secuencia de EhVps35-D, que abarca la siguiente secuencia: ESEIMNAALNNKDLSK (Figura 4, azul) con base en su valor de SCORE y su exposición. El péptido elegido de los programas fue comparado con la secuencia de 22 aminoácidos (MSRPQRDSVFYSEEEQGNEVKR) propuesta en artículo de Nakada-Tsukui y colaboradores (2005) (Figura 4, verde). La comparación se realizó a nivel de exposición (ubicación en la estructura terciaria predicha para EhVps35) y valores de SCORE, lo cual representa los requerimientos necesarios para ser un buen inmunogénico. Finalmente se realizó un BLAST con la secuencia de los péptidos candidatos para identificar posibles reconocimientos inespecíficos por los anticuerpos que se obtendrán.



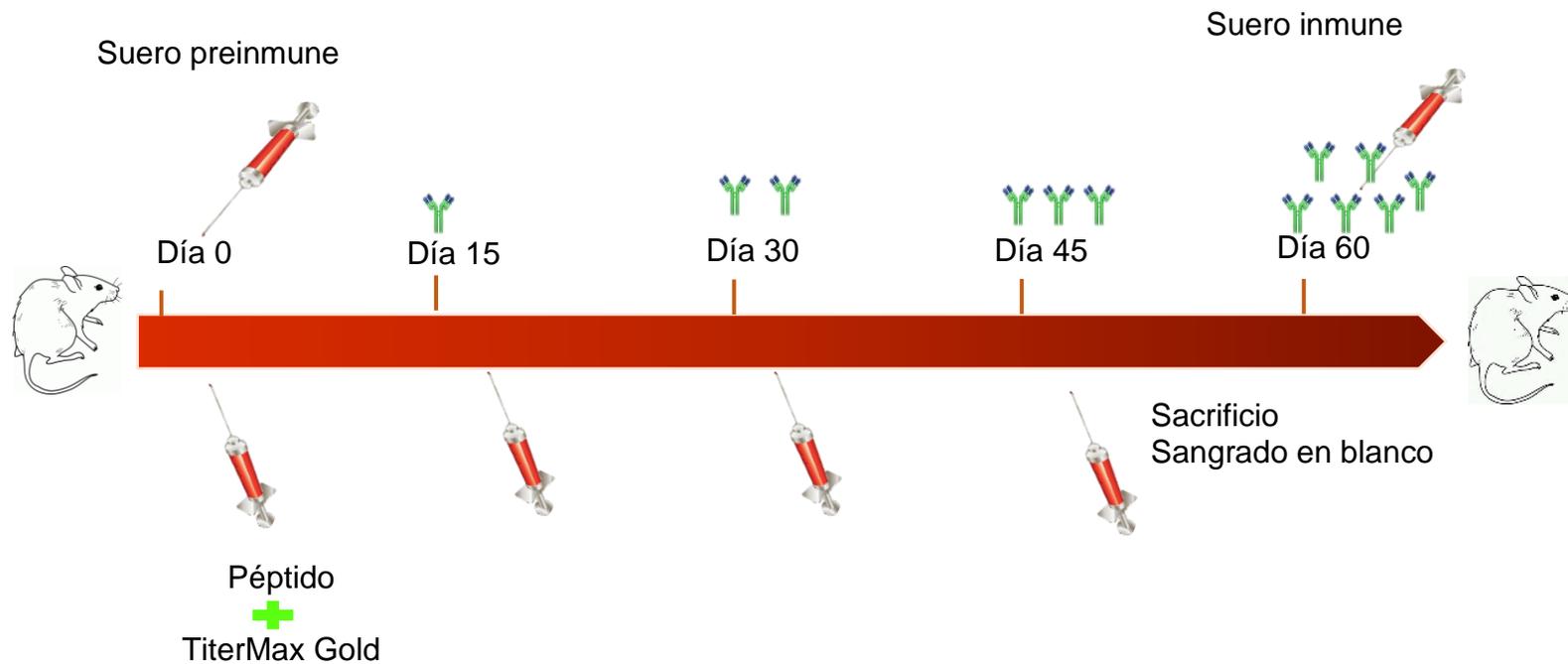
**Figura 5: Ubicación del péptido diseñado para la inmunización en ratones.**

Azul: péptido ubicado en el aminoácido 30 a 46 (ESEIMNAALNNKDLSK). Verde: péptido ubicado del aminoácido 1 a 22 (MSRPQRDSVFYSEEEQGNEVKR) usado por Nakada-Tsukui y colaboradores (2005). Rojo: EhVps35.

El péptido ESEIMNAALNNKDSLK se inoculó por vía intramuscular e intraepitelial en ratones machos de la cepa Balb/c. Realizando cuatro inoculaciones con 80 µg del péptido en una relación volumen/volumen con el adyuvante TiterMax Gold (Sigma Aldrich, T2684) cada 15 días según la Figura 5.

La titulación y especificidad del anticuerpo policlonal  $\alpha$ -EhVps35 se realizó mediante un ensayo de Western-blot (Sección 6.9) a partir de extractos totales de amiba y el suero obtenido de una muestra de sangre. Las muestras fueron previas a la inoculación del péptido (suero preinmune por sangrado retroorbital) y en el día 60 cuando se realizó el sangrado en blanco por punción cardiaca, seguido del sacrificio a los animales por dislocación cervical (Figura 3). Para obtener el suero de la muestra de sangre se incubó por una hora a 37 °C y posteriormente se centrifugó a 3 000 rpm por 20 min, se recuperó el suero, que se alicuotó y almacenó a -20 °C hasta su uso.

Finalmente, se verificó el reconocimiento específico del suero obtenido de los ratones inmunizados mediante un ensayo de Western-blot (Sección 6.5) con los extractos de proteína total de bacterias *Escherichia coli* cepa BL21 con la construcción pColdI/Ehvps35 inducidas como se describe en la sección 6.6.



**Figura 6: Esquema de inmunización del péptido de la proteína EhVps35 en ratones.**

Se tomó una muestra de sangre de ratones (cepa BALB/c) previo a la inoculación de péptido con el adyuvante TiterMax Gold. La inmunización se repitió cada 15 días y finalmente se realizó un sangrado en blanco y el sacrificio del animal en el día 60.

## 6.9 Determinación de los niveles de expresión de la proteína EhVps35 durante una cinética de eritrofagocitosis de *E. histolytica*

---

Los extractos proteicos fueron separadas por peso molecular mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, los cuales se corrieron por 1 hora a 130 volts. Al término de la electroforesis, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa por 1 hora y 15 min a 400 volts. La membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se tiñeron con rojo Ponceau (0.1% de rojo Ponceau y 1% de ácido acético) para verificar la correcta transferencia de las proteínas. La membrana se destiño usando buffer de transferencia (Tris-base 0.025 M, glicina 0.192 M y metanol 10% a pH 8.3) y se bloqueará con leche descremada al 5 % en PBS 1X a 4°C por 16 horas con agitación constante.

Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa se incubo con el anticuerpo anti-EhVps35 elaborado en ratón (Sección 6.5) a una dilución 1: 2000 disuelto en leche descremada al 5 % en PBS 1X durante toda la noche. A continuación, se realizaron 6 lavados con PBS 1X-Tween 20 a 0.05% cada uno de 6 min. La membrana se incubo con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) diluido 1: 10,000 en leche al 5% durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave. Finalmente, la membrana será lavada como se mencionó anteriormente y el revelado se realizará por el sistema ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE-Healthcare, RPN2132) en el equipo MicroChemi 4.2.

Adicionalmente en cada membrana de nitrocelulosa se realizó la inmunodetección de actina en una dilución 1:3000, con el mismo procedimiento antes descrito. Dicha detección sirvió de referencia para realizar la densitometría de cada muestra en el programa ImageJ, los valores obtenidos de cada muestra se normalizaron de la siguiente forma:

$$\frac{\text{Densitometría de EhVps35}}{\text{Densitometria de actina}} = \text{Normalizacion con la proteina control}$$

*Valor de la normalización con la proteína control*  

---

*Valor de la densitometría normalizada de la condición basal*

Los valores obtenidos de la densitometría fueron analizados en el el programa GraphPad Prism 6 usando la prueba estadística t-Student, para determinar si existieron diferencias significativas entre las muestras.

**6.10 Localización de la proteína EhVps35 durante una cinética de eritrofagocitosis de *E. histolytica***

---

Trofozoítos de *E. histolytica* en medio TYI sin suero se colocaron sobre un cubreobjetos estéril por 10 min a 37 °C, para promover la adhesión de estos. Finalmente, se le agregaran eritrocitos diluidos en medio TYI sin suero para tener una relación de una amiba por veinticinco eritrocitos (1:25), esta interacción se mantuvo por 2, 5, 30 y 60 min. Además, se realizó como control negativo un ensayo con trofozoítos sin fagocitosis (condición basal ó 0 min). Finalizado el tiempo de interacción se usó una solución de medio TYI sin suero con agua estéril en una relación volumen/volumen, en la cual se dejó por 10 minutos a 37 °C para causar la hemólisis de los eritrocitos no fagocitados.

La preparación se fijó con paraformaldehído al 4% en PBS 1X por 40 min a 37 °C, después se lavó tres veces con PBS 1X y se permeabilizó con una solución 0.2% Tritón X-100 en PBS 1X por 30 min. Después, se realizaron tres lavados con PBS 1X y se bloqueó por 1 h con 1 ml de BSA (albumina de suero bovino) al 1 %. A continuación, se lavó tres veces con PBS 1X y se adicionó el anticuerpo primario policlonal (anti-Vps35, anti-Vps36 o anti-Vps25) o suero preinmune en una dilución 1:200 en PBS 1X y se incubó toda la noche a 4 °C.

Previo a la adición del anticuerpo secundario se hicieron tres lavados con PBS 1X. Como anticuerpo secundario se utilizando: anti-IgG de ratón acoplado a FITC (para

la detección de anti-Vps35) en una dilución 1:100, por 30 min a 37 °C. Se realizaron tres lavados con PBS 1Xy después se teñeron los núcleos con DAPI (decolorhidrato de 4', 6'-diamido-2-fenilindo) con una incubación de 5 min a temperatura ambiente, seguido de cuatro lavados con PBS 1X. Finalmente, las muestras se colocaron sobre portaobjetos limpios y estériles, adicionando 10 µl de medio de montaje Vectashield. Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su uso.

Las muestras fueron visualizadas bajo un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700 Imager con el *software* del fabricante (ZEN 2009 Light Edition de Zeiss).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Análisis *in silico* de la proteína EhVps35 de *E. histolytica*

#### 7.1.1 Identificación de las secuencias homologas a Vps35 en *E. histolytica*

Actualmente existen diversas herramientas bioinformáticas de uso libre, que facilitan la identificación de secuencias de genes y proteínas similares en distintos sistemas biológicos, así como de regiones, dominios y motivos dentro de estos que aportan orientación respecto de su función. Por lo que este trabajo inicio con la elección de una de las cinco secuencias para la proteína EhVps35 reportadas por el análisis *in silico* de Koumandou y colaboradores (2011). La elección de una única secuencia servirá para el diseño de los *primers* y el péptido ocupado en los próximos ensayos para la determinación de los niveles de transcripción de Ehvps35 y la producción de un  $\alpha$ -EhVps35 policlonal para determinar los niveles/localización de la proteína EhVps35 respectivamente durante una cinética de eritrofagocitosis de *E. histolytica*, además para el diseño de *primers* ocupados en la amplificación del fragmento del gen *Ehvps35* que será clonado (*Ehvps35(1-1428)*).

La búsqueda de una secuencia a usar en este trabajo para la proteína EhVps35 inicio tomaron como referencia las secuencias completas de aminoácidos para Vps35 de humano o levadura (Hsvps35 con el NCBI ID: NP\_060676 o Scvps35 con el NCBI ID: NP\_012381), las cuales comparten un 36 % de identidad entre sí, y se compararon contra el proteoma de *E. histolytica* reportado en la base AmoebaDB, mediante un alineamiento múltiple realizado con la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). De este análisis se identificó a cinco secuencias que se denominaron EhVps35-A (NCBI ID: EHI\_096520), EhVps35-B (NCBI ID: EHI\_086580), EhVps35-C (NCBI ID: EHI\_411950), EhVps35-D (EHI\_002990) y EhVpS35-E (NCBI ID: EHI\_168080). Dichas las secuencias identificadas para EhVps35 tuvieron distintos valores de identidad, aunque en general tienen un mayor

porcentaje de identidad con ScVps35, ya que Hsvps35 oscila entre el 28 y 29%, en tanto que el porcentaje de identidad respecto de Scvps35 es de 31 y 33% (Tabla 4).

El segundo valor importante resultado del alineamiento es el valor de  $e$ , el cual representa la probabilidad de que el alineamiento con sus respectivos porcentajes de identidad sean producto del azar, es por ellos que se requieren valores de  $e$  negativos o cercanos a cero para definir a un alineamiento como confiable (no es producto del azar). De acuerdo con el valor de  $e$ , se pueden considerar proteínas homólogas a Vps35 de humano y levadura a las proteínas EhVps35-B, EhVps35-C y EhVps35-D (Tabla 4).

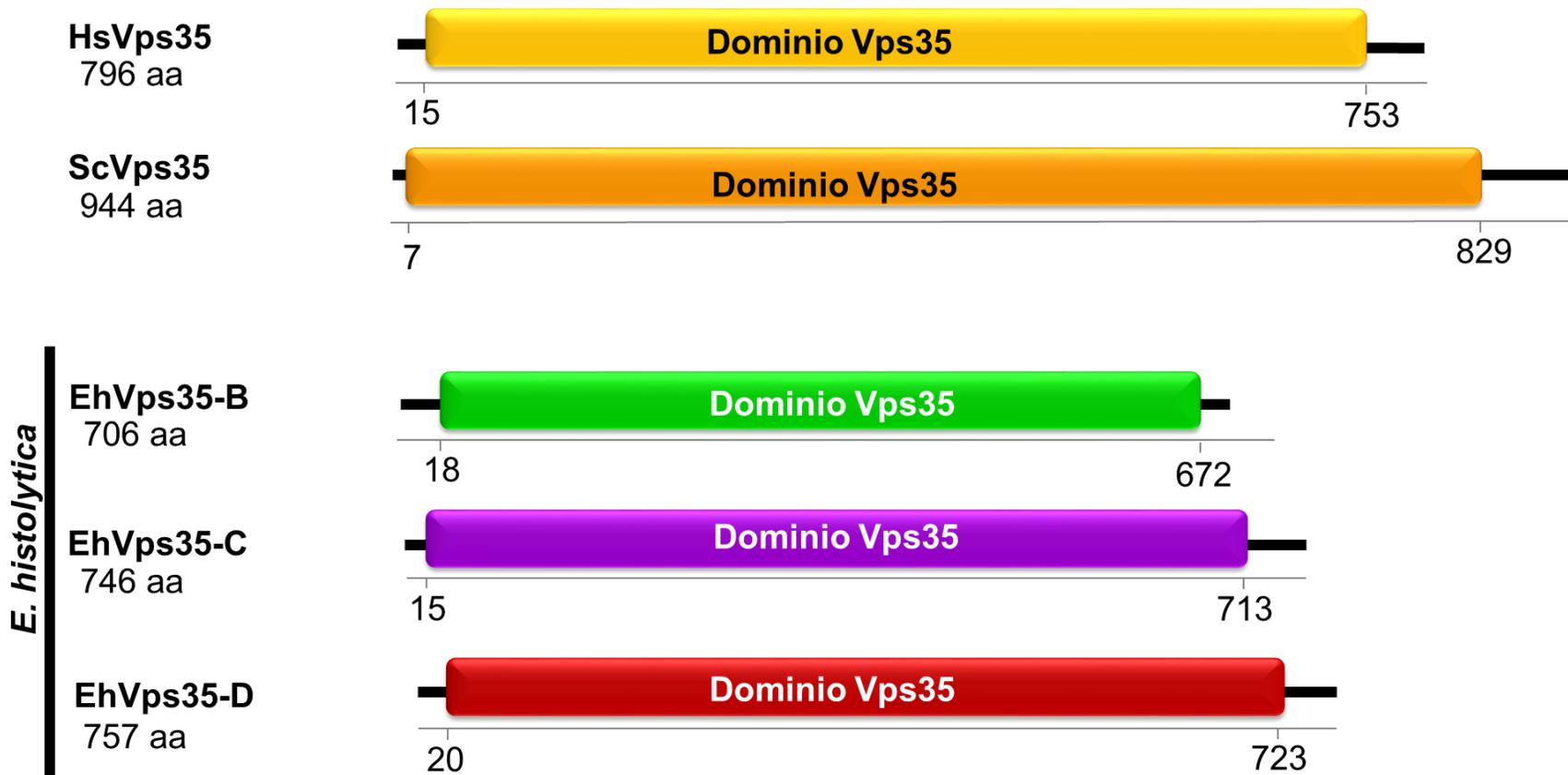
**Tabla 4: Isoformas de EhVps35 identificadas en *E. histolytica*.** Resultados del BLAST realizado en AmoebaDB usando las secuencias de aminoácidos de HsVps35 y ScVps35.

	<b><i>Homo sapiens</i> (Hs) 796 aa</b>		<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sc) 944 aa</b>	
	Identidad (%)	Valor e	Identidad (%)	Valor e
<b>EhVps35-A 697 aa</b>	20	9e-12	21	1.9
<b>EhVps35-B 706 aa</b>	28	8e-68	33	1e-38
<b>EhVps35-C 746 aa</b>	29	4e-71	32	4e-42
<b>EhVps35-D 757 aa</b>	29	7e-82	31	1e-43
<b>EhVps35-E 175 aa</b>	27	8e-06	24	5.5

### 7.1.2 Identificación de dominios en las proteínas EhVps35 de *E. histolytica*

Una vez identificadas a EhVps35-B, EhVps35-C y EhVps35-D como homólogas a Vps35 de humano y levadura, se procedió a buscar características comunes en todas las proteínas de este tipo. En primer lugar, se buscó al único dominio reportado en Vps35, el cual lleva el mismo nombre de la proteína (Vps35) y es importante para la interacción con las proteínas que conforman al retrómero (Vps26, Vps29 y SNX).

Se realizó un análisis de los dominios presentes en las proteínas EhVps35-B, EhVps35-C y EhVps35-D mediante los programas Pfam 31.0 y SMART, los cuales integran las colecciones de familias de proteínas que han sido caracterizadas a través de dominios o regiones funcionales, y mediante una comparación de las secuencias introducidas con múltiples bases de datos (UniProt, STRING y Ensembl) hacen un alineamiento para identificar regiones específicas correspondientes a dominios, motivos o regiones funcionales. De esta manera, se predijo la presencia del dominio Vps35 en las tres proteínas de *E. histolytica* analizadas (Figura 6), con un valor de  $e$  en EhVps35-B de  $1.6e-112$ , EhVps35-C de  $2.8e-130$  y EhVps35-D de  $2.2e-157$ . Dichos valores de  $e$  indican que una identificación confiable del dominio Vps35 en EhVps35-B, EhVps35-C y EhVps35-D de *E. histolytica*, el cual abarca casi la totalidad de la secuencia de aminoácidos salvo algunos aminoácidos hacia su extremo amino y carboxilo, de forma similar a la observada en las dos secuencias control utilizadas (HsVps35 y ScVps35) (Figura 6).

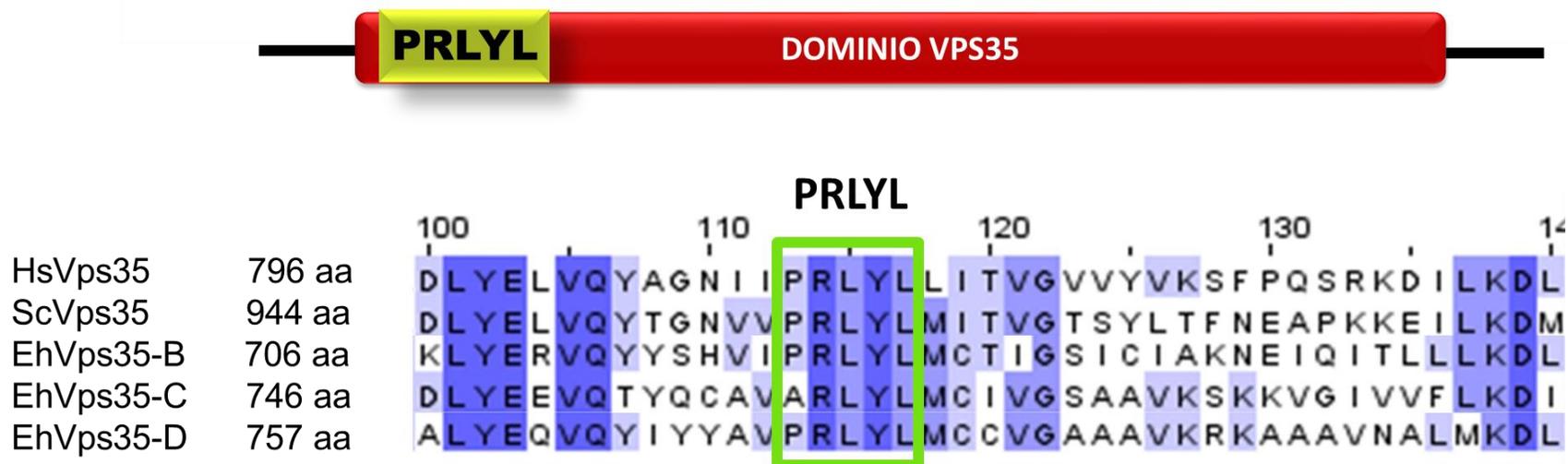


**Figura 7: Ubicación del dominio Vps35 en EhVps35-B, EhVps35-C, EhVps35-D, HsVps35 y ScVps35.**

El dominio Vps35 corresponde a estructuralmente a la región denominada  $\alpha$  solenoide compuesta por  $\alpha$ -hélice y loops, que además es la región en las que las proteínas Vps35 interaccionan con el receptor de membrana que se recicla por el complejo proteico retrómero y el resto de las proteínas que integran este complejo. Las proteínas modelo HsVps35 y ScVps35 (color amarillo) tienen el dominio Vps35, el cual abarca casi la totalidad de la proteína, salvo 7 y 15 aminoácidos hacia el N-terminal, 43 y 115 aminoácidos hacia el C-terminal respectivamente. Este dominio identificado en las proteínas EhVps35 de *E. histolytica* por extensión es parecida a HsVps35 y ScVps35.

### 7.1.3 Búsqueda del motivo PRLYL característico de las proteínas Vps35 en EhVps35 de *E. histolytica*

Debido a que en EhVps35-B, EhVps35-C y EhVps35-D se predijo el dominio Vps35, se buscó la segunda característica común en todas las proteínas Vps35, el cual es el motivo PRLYL, ubicado hacia el inicio de la secuencia de aminoácidos que está totalmente conservado en mamíferos, levaduras, plantas y nematodos, debido a que es necesario para la unión de Vps35 a Vps26. La búsqueda del motivo PRLYL es importante porque la presencia de este implica que la proteína es funcional, para lo cual se realizó un alineamiento en Clustal Omega 1.2.4 introduciendo las secuencias de aminoácidos HsVps35, ScVps35, EhVps35-B, EhVps35-C y EhVps35-D. Las secuencias HsVps35 y ScVps35 fueron usadas ya que en estas secuencias se conoce la presencia y ubicación del este motivo, tomando en cuenta estos datos se buscó en la misma región donde se ubica este motivo PRLYL. Adicional se hizo una búsqueda manual en el programa para identificar de forma rápida usando el programa GeneRunner para descartar que el motivo PRLYL no fuera identificada en el alineamiento por una ubicación en otra parte de la secuencia que no corresponda al inicio o extremo N-terminal de la proteína (primeros 200 aa aproximadamente). Resultado de estos dos métodos se identificó al motivo PRLYL totalmente conservado y ubicado hacia el extremo N-terminal de la secuencia en EhVps35-B y EhVps35-D, en EhVps35-B se ubica entre los aminoácidos 106 al 110 y en EhVps35-D entre el aminoácido 108 y 118 (Figura 7). En EhVps35-C se identificó parcialmente al motivo PRLYL ya que hay un cambio del aminoácido inicial, prolina cambia por otro aminoácido hidrofóbico (alanina) (Figura 7).



**Figura 8: Ubicación del motivo PRLYL en EhVps35-B, EhVps35-C, EhVps35-D, HsVps35 y ScVps35.**

El motivo PRLYL (color verde) se ubica hacia el N-terminal de las proteínas Vps35 funcionales para la interacción con la proteína Vps26, como se muestra en las proteínas Vps35 modelo (HsVps35 y ScVps35). Las secuencias de EhVps35 con el motivo PRLYL totalmente conservado fueron EhVps35-B y EhVps35-D como se ha visto en todas las proteínas Vps35 funcionales, en cambio en EhVps35-C el aminoácido prolina se encuentra modificado por una alanina.

#### 7.1.4 Alineamiento estructural del cristal de HsVps35 con las predicciones de la estructura terciaria de las proteínas EhVps35 de *E. histolytica*

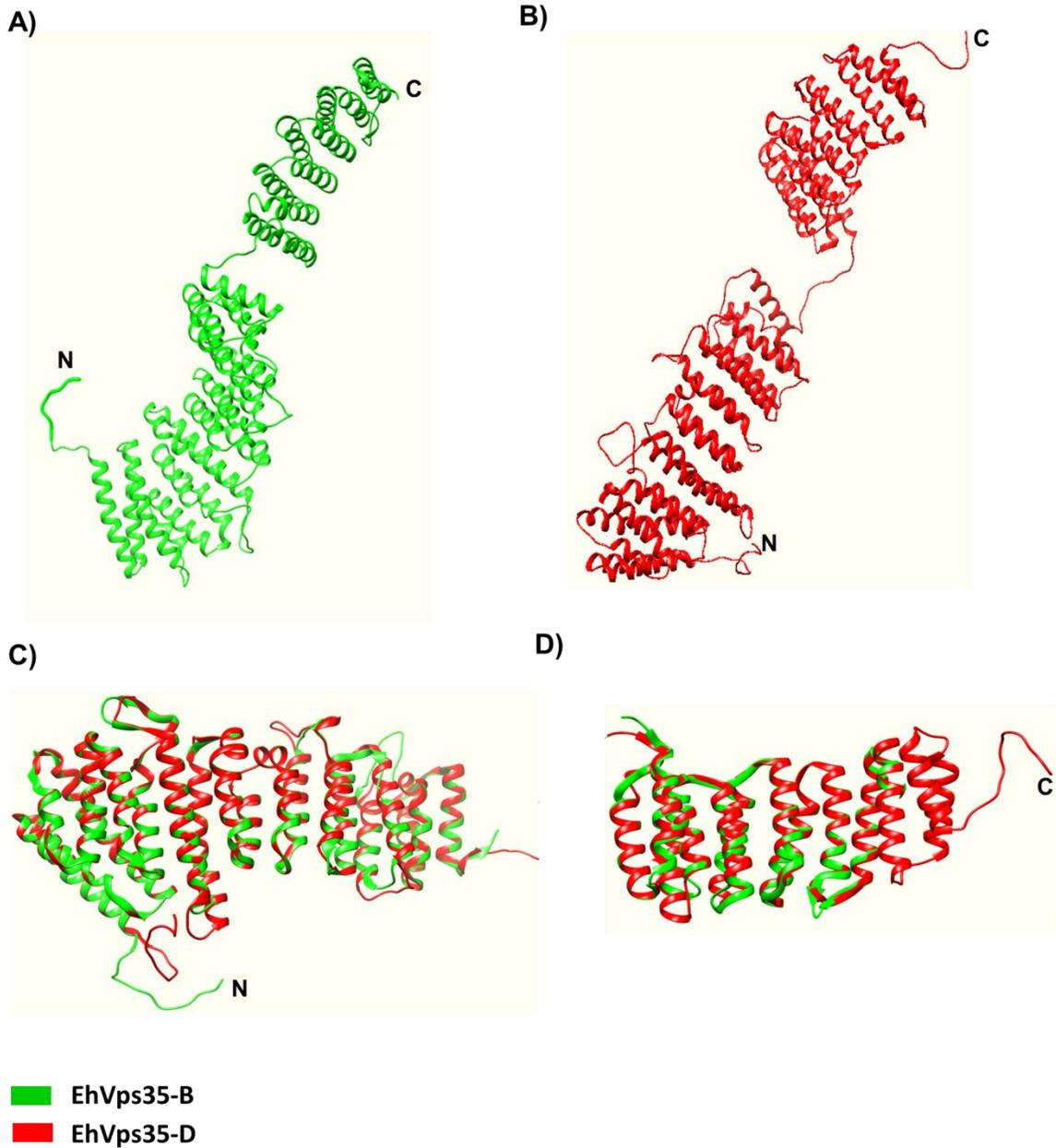
Una vez confirmado a nivel de secuencia en EhVps35-B y EhVps35-D la presencia de un dominio Vps35 y un motivo PRLYL que las predicen como funcionales Vps35, es importante realizar la predicción de la estructura terciaria de las proteínas ya que estas son un indicativo de su posible función celular.

La predicción de la estructura terciaria se realizó introduciendo las secuencias de EhVps35-B o EhVps35-D en I-TASSER y RaptorX, después debido a que los modelos predichos eran diferentes fueron sometidos a una validación en los programas ERRAT, Verify3D, ProSA-web y Rampage, los cuales mediante modelos matemáticos analizan que tan estable es la predicción del plegamiento de la proteína predicho, resultado de lo que se eligieron los modelos predichos por el programa RaptorX. El modelo de la estructura terciaria de ambas proteínas se compuso de estructuras  $\alpha$ -hélice separadas por loops (región intrínsecamente desestructurada) con un gran loop en el centro de la estructura (Figura 10, A y B).

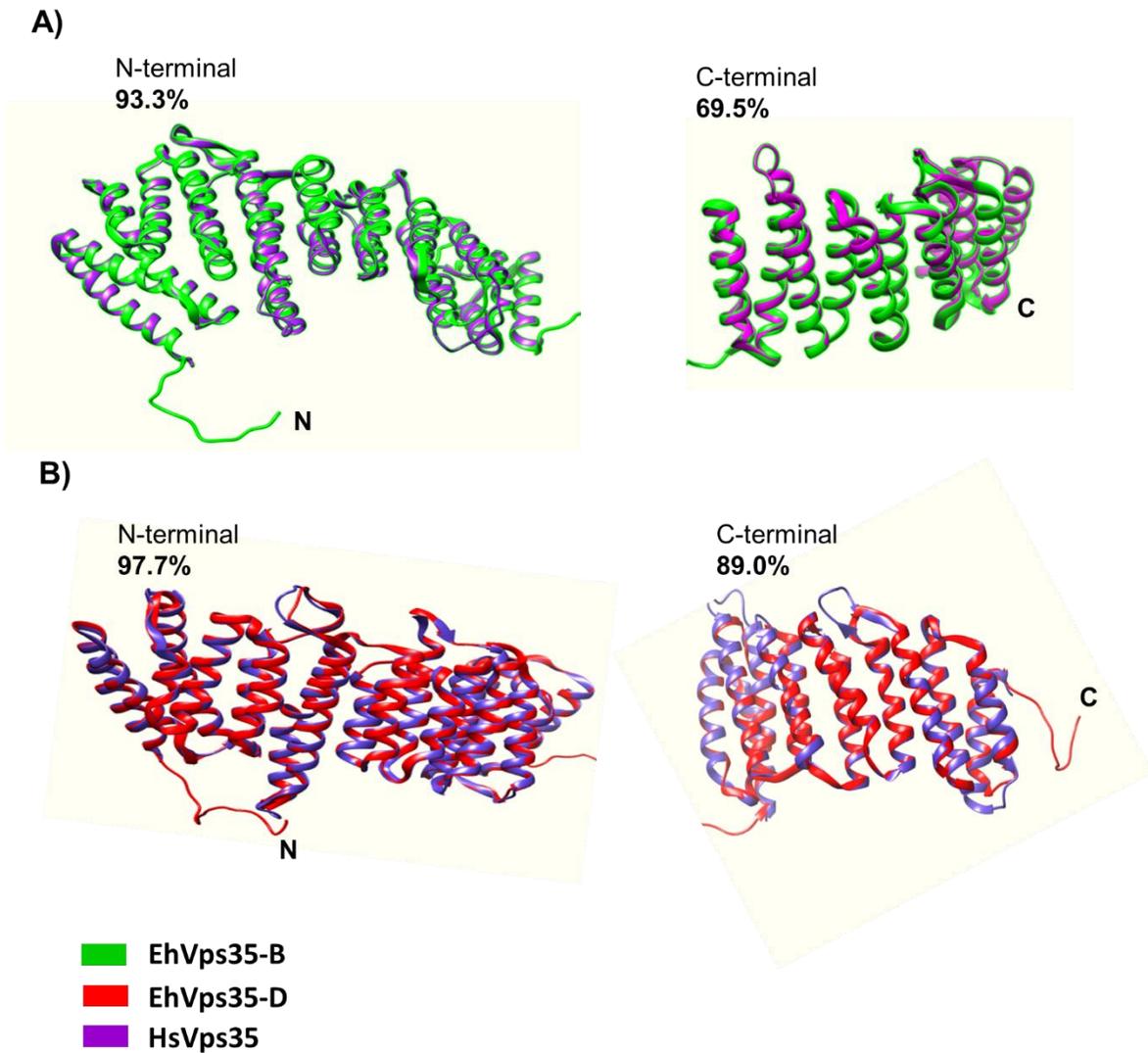
Los modelos de la estructura terciaria de EhVps35-B o EhVps35-D fueron comparados mediante un alineamiento estructural en RaptorX Structure Alignment, porque el porcentaje de identidad estructural que dará de forma cuantitativa el parecido entre ellas. El alineamiento estructural fue hecho en dos partes denominados N-terminal y C-terminal, debido al loop central que hace que únicamente se empalme la mitad de la proteína dando como resultado porcentajes de identidad estructural menores al 50 %. Al comparar el plegamiento del N-terminal de ambas secuencias el porcentaje de identidad estructural fue de 94.4%, dato similar en la comparación del C-terminal al obtener 94.8 % de identidad estructural (Figura 10, C y D).

Posteriormente, para elegir una de las proteínas EhVps35 (EhVps35-B o EhVps35-D) se prosiguió a la búsqueda de proteínas Vps35 de las que se hubiera determinado experimentalmente el plegamiento con el que se realizó un

alineamiento estructural en RaptorX Structure Alignment Server que daría como resultado un porcentaje de identidad estructural que indicaría si la estructura terciaria de las EhVps35 sería funcional para interacciones que dependen de una conformación estructural. Ya que hasta la fecha se ha reportado únicamente el cristal de la proteína HsVps35, la cual está en dos partes región N-terminal (5F0K) y C-terminal (2R17) debido a que tienen una región central compuesta por una región intrínsecamente desestructurada (loop). El alineamiento estructural de la estructura terciaria de EhVps35-B, EhVps35-D con HsVps35 (5F0K de la región N-terminal y 2R17 de la región C-terminal), de lo que se obtuvo un porcentaje de identidad estructural de 93.3 % hacia el fragmento N-terminal y de 69.5% hacia el fragmento C-terminal comparando a EhVps35-B con HsVps35 (Figura 11, A); mientras que comparando a EhVps35-D y HsVps35 se tuvieron valores de identidad estructural de 97.7 % hacia el fragmento N-terminal y de 89 % hacia el fragmento C-terminal (Figura 11, B). Debido al mayor porcentaje de identidad estructural EhVps35-D con los cristales de HsVps35 y tener totalmente conservado el motivo PRLYL, se eligió esta secuencia para los posteriores análisis *in silico*: determinación de las interacciones de la proteína EhVps35-D con la membrana, predicción de las interacciones de la proteína EhVps35 con otras proteínas, el diseño de los *primers* para determinar los niveles de mRNA del gen *Ehvps35-D*, diseño de los *primers* para amplificar el fragmento *Ehvps35*(1-1428 pb) del gen *Ehvps35* que será usado para la clonación del fragmento EhVps35(1-476 aa) de la proteína EhVps35; en el diseño de un péptido utilizados para la inmunización en ratones para obtener  $\alpha$ -EhVps35 para la detección determinación de los niveles y localización de la proteína EhVps35-D. Por lo que como solo se ocupara a denominada EhVps35-D, en las secciones siguientes se denominara únicamente a esta secuencia como EhVps35 de *E. histolytica*.



**Figura 9 : Estructura terciaria de las proteínas EhVps35-B y EhVps35-D.**  
 A) Estructura terciaria de la proteína EhVps35-B predicha por el programa RaptorX. B) Estructura terciaria de la proteína EhVps35-D predicha por el programa RaptorX. C) Alineamiento estructural de la porción N-terminal de EhVps35-B (verde) con EhVps35-D (rojo). D) Alineamiento estructural de la porción C-terminal de EhVps35-B (verde) con EhVps35-D (rojo).



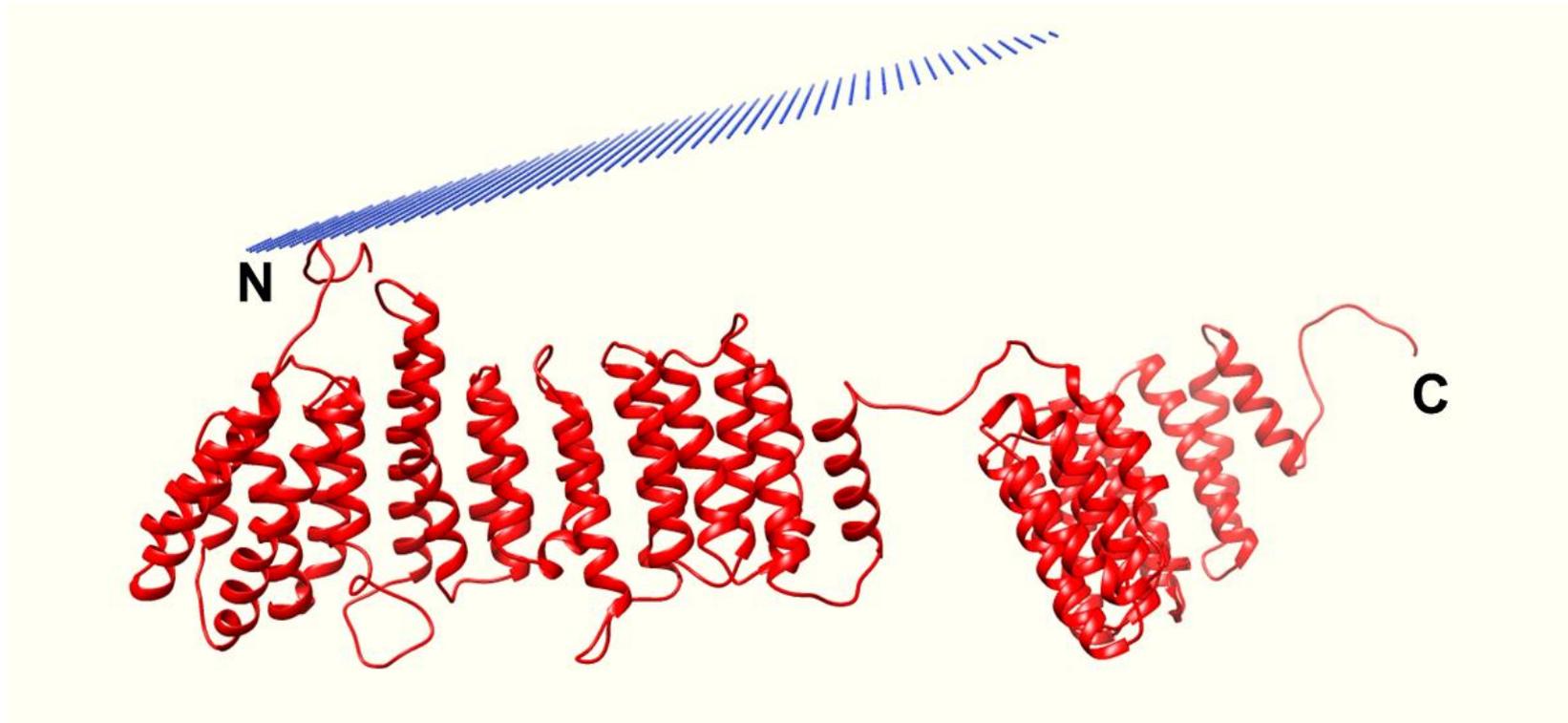
**Figura 10: Alineamiento estructural de EhVps35-B y EhVps35-D con HsVps35.**

A) Alineamiento estructural de los fragmentos N-terminal y C-terminal de EhVps35-B (verde) y HsVps35 (morado). B) Alineamiento estructural de los fragmentos N-terminal y C-terminal de EhVps35-D (rojo) y HsVps35 (morado).

### 7.1.5 Predicción de la interacción de EhVps35 con membrana

La predicción en la proteína EhVps35 del tipo de interacción con la membrana es importante debido a que esta proteína forma parte del retromero, el cual es anclado a la membrana plasmática por la unión a PI(3)P por las proteínas SNX, las cuales aún no han sido identificadas con una función en el ensamblaje del retromero-like de *E. histolytica*. Además, según el modelo de la estructura terciaria de EhVps35, esta proteína tiene un plegamiento compuesto por estructuras  $\alpha$ -hélice las cuales son típicas de una proteína con dominios transmembranales.

En primer lugar, se realizó una búsqueda de regiones en la secuencia de EhVps35 ricas en aminoácidos hidrofóbicos que conformaran regiones transmembranales en los programas TMAP, TMHMM 2.0, CCTOP y HMMTOP, los cuales identificaron entre dos y cinco regiones catalogadas como transmembranales con un valor de probabilidad según la longitud de la secuencia y el tipo de aminoácidos que las componen promedio de 0.04450, lo cual descarta la existencia de regiones transmembranales. Además, se realizó un modelo en 3D de las interacciones entre la proteína EhVps35 y la membrana, para confirmar la ausencia de regiones transmembranales utilizando el programa OPM, dicho programa se basa en una base de datos de representaciones 3D de membranas en interacción con péptidos, así como de proteínas transmembranales y periféricas. Resultado del análisis en OPM se identificó a la proteína EhVps35 como una proteína periférica, de acuerdo a su poca capacidad de penetración de membrana calculada para el modelaje (Figura 11).



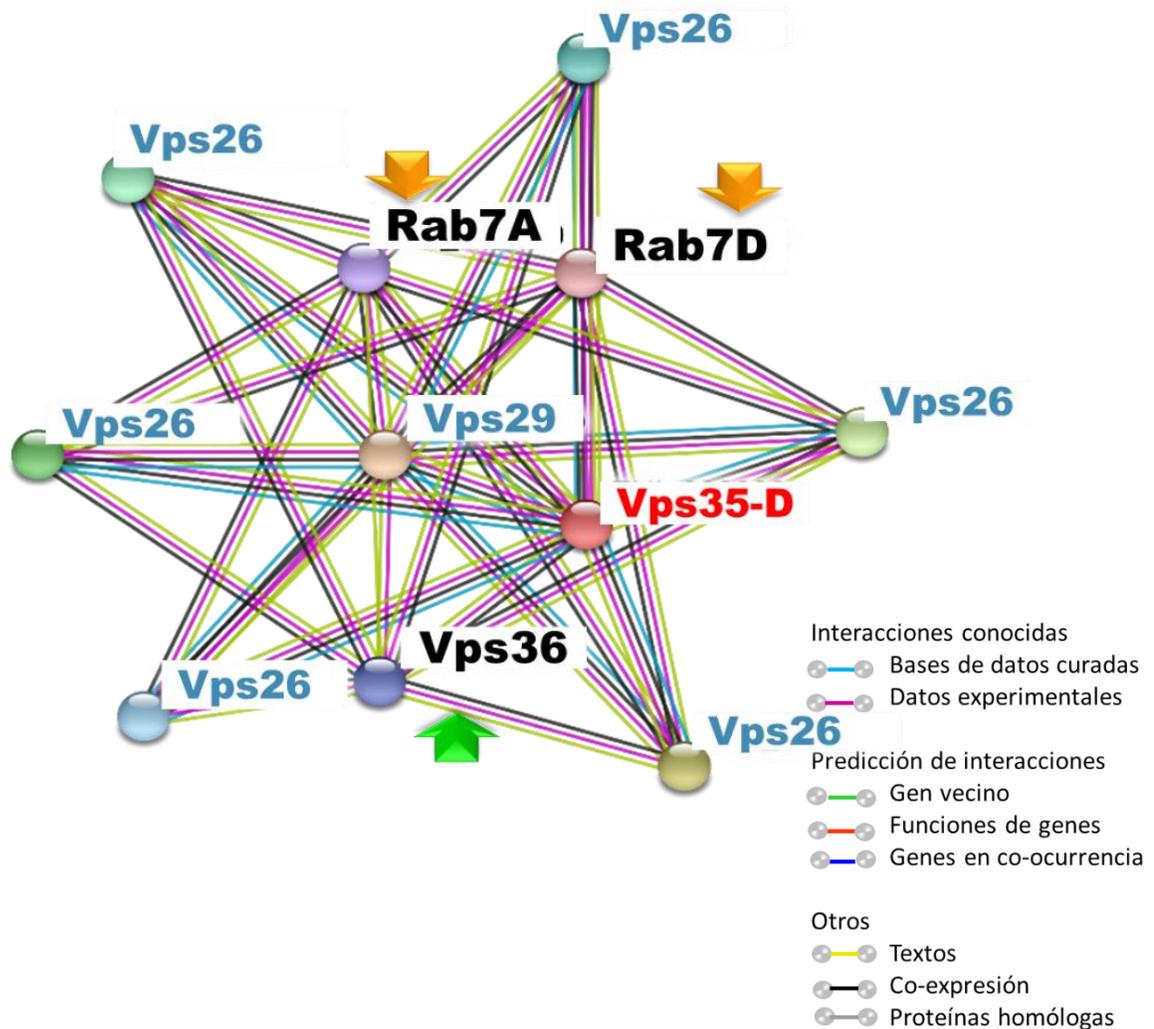
**Figura 11: Modelo de la interacción de la proteína EhVps35 con la membrana plasmática.**

La proteína EhVps35 tienen una interacción débil en su hacia su porción N-terminal de la proteína EhVps35 (rojo) con las membranas (azul), debido a la ausencia de regiones transmembranales es esta proteína.

### 7.1.6 Predicción de las interacciones de EhVps35

Debido la proteína EhVps35 tiene una interacción periférica con la membrana plasmática, presenta el dominio Vps35 y el motivo PRLYL, pero no se ha demostrado experimentalmente su función en *E. histolytica* sé que quiere hacer un modelo de las interacciones de esta proteína con otras para inferir el tipo de procesos en los que estaría participando. Dichas interacciones por los análisis in silico anteriores se esperaba que tuviera una interacción con las otras proteínas que integran el retromero-*like* de *E. histolytica* y particularmente con las proteínas Vps26 y Rab7 implicadas en el reciclaje de cistein proteasas.

El modelo predictivo de las interacciones de EhVps35 se realizó introduciendo la secuencia completa de aminoácidos de dicha proteína en el programa STRING 10.3 que predice interacciones proteína-proteína conocidas y previstas, basadas asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales) derivadas de predicciones computacionales procedentes de datos experimentales, coexpresión de genes, datos publicados e interpretaciones del contexto genómico. El modelo de las interacciones de la proteína EhVps35 mostró una interacción con las proteínas EhVps26 y EhVps29, ambas del retromero-*like* de *E. histolytica*. Además, hay relación con dos GTPasas pequeñas, Rab7A y Rab7D ambas con una localización espacial en fagosomas de *E. histolytica* (Figura 11, flecha naranja), así como una predicción de interacción con la proteína EhVps36 del complejo ESCRT-II (Figura 11, flecha verde).



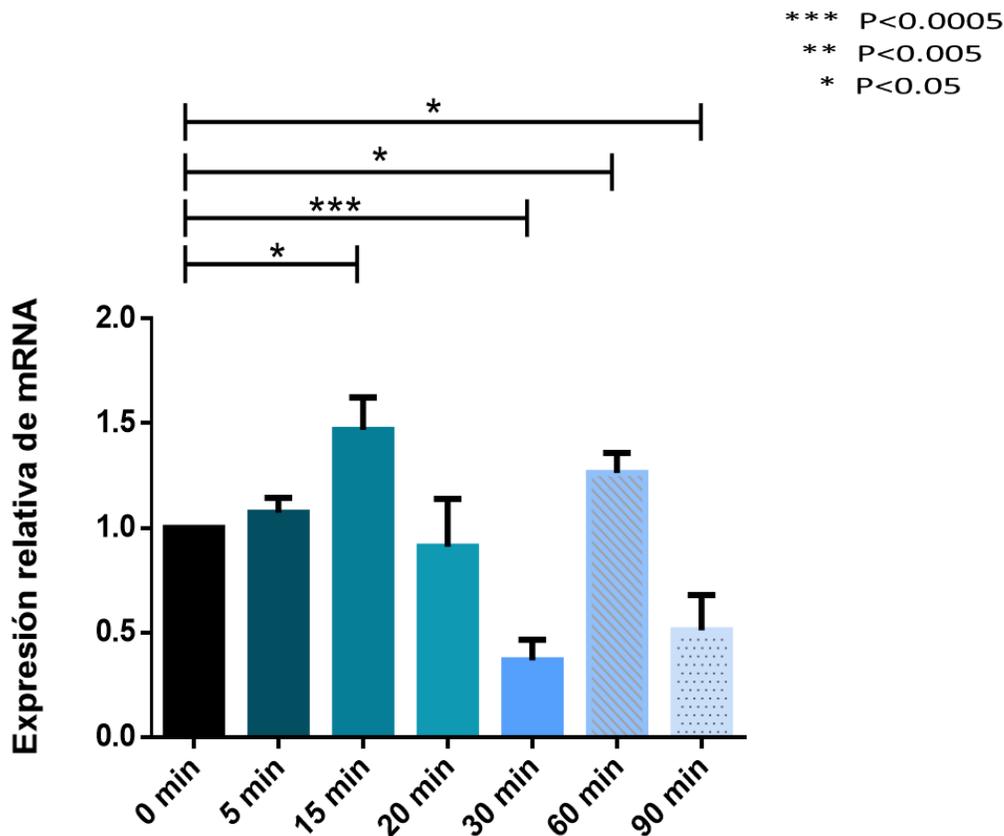
**Figura 12: Predicción de las interacciones de EhVps35 de *E. histolytica*.** Por el análisis *in silico* usando el programa STRING, la proteína EhVps35 podría tener interacción con otras proteínas del retrómero (Vps26 y Vps29) y con Rab7A, ambas relaciones ya identificadas en *E. histolytica* en trabajos previos, así como con Rab7D. Finalmente podría tener una interacción con la proteína EhVps36, la cual es parte del complejo ESCRT-II.

### 7.3 Determinación del nivel de expresión del gen *Ehvps35* en *E. histolytica*.

---

Debido a que un proceso de endocitosis media la transducción de señales por medio del control de la cantidad de receptores de señalización y sus ligandos en la superficie celular, además mediante la internalización de diferentes sustancias que produce dentro de la célula señalizaciones que influyen en la transcripción de genes se analizó los niveles de mRNA del gen *Ehvps35* durante una cinética de eritrofagocitosis. Para lo que se realizaron ensayos de RT-qPCR con muestras de extractos de RNA de *E. histolytica* procedentes de una para determinar cinética de eritrofagocitosis, ya que este ensayo permite la amplificación de una región específica detectada en tiempo real por el equipo, interpretada con un valor de Ct (*Threshold cycle* o ciclo umbral para considerarse diferente del control negativo de la reacción), utilizado como referencia para normalizar los valores de Ct obtenidos de la amplificación del gen *Ehvps35* en cinética de eritrofagocitosis con respecto a la condición basal a la que se le dio el valor de uno. Adicionalmente previo a la normalización anterior, se normalizo cada calor de Ct de la amplificación del gen *Ehvps35* con el valor obtenido de Ct por la amplificación del gen control por su expresión basal estable (S2 40Sr). Finalmente, los valores normalizados fueron analizados en el programa GraphPad Prism 6 con una prueba T de Student, según el cual se considerados cambios significativos con valores de P menores o iguales a 0.05 (mayor significancia entre menor sea el valor de P).

El gen *Ehvps35* durante la determinación de su transcripción por RT-qPCR tuvo variaciones significativas respecto a la condición basal (0 min) a los 15 min, 30, 60 min y 90 min de eritrofagocitosis (Grafica 1). Además, hay diferencias significativas comparando 15 min y 20 min. Por lo que los niveles de mRNA del gen *Ehvps35* en estas condiciones tuvieron un comportamiento cíclico, aparentemente aumentando a los 15 minutos y disminuyendo hacia los 30 min, para después tener un incremento hacia los 60 min y disminuir a los 90 min. Estos resultados sugieren un papel del gen *Ehvps35* durante el proceso de fagocitosis en *E. histolytica* ya que esto podría inducir un aumento en la traducción de la proteína EhVps35.



**Figura 13: Expresión relativa del gen *Ehvps35* durante la eritrofagocitosis de *E. histolytica*.**

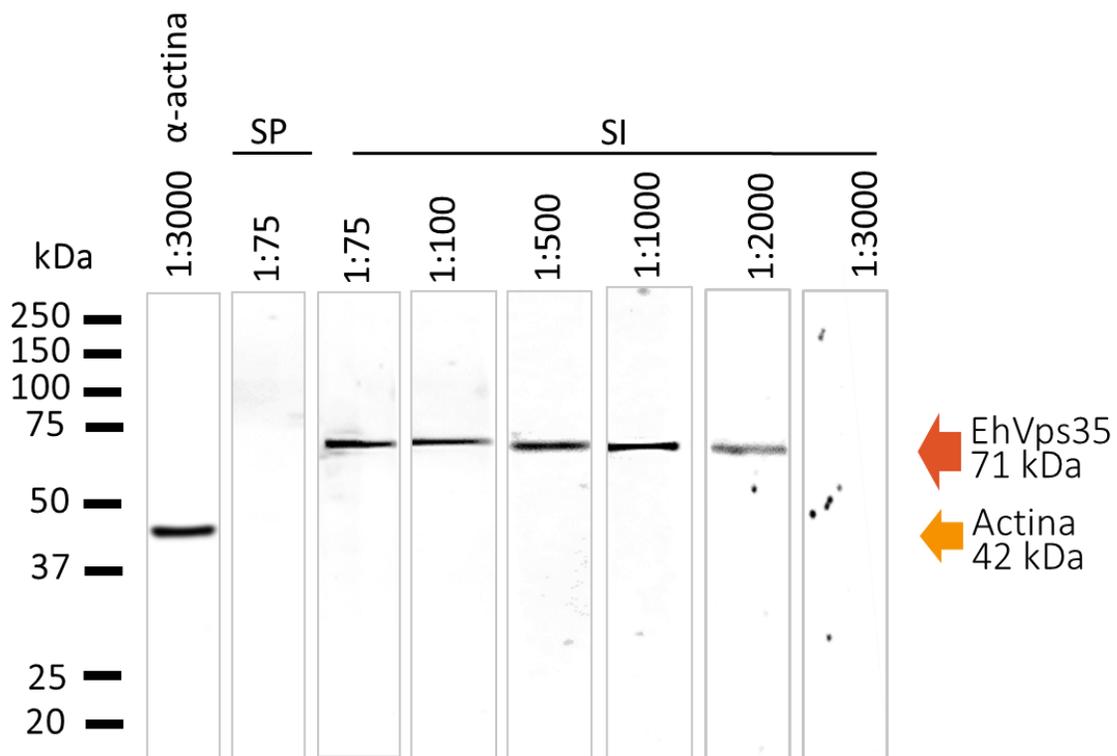
Valores relativos de la expresión del gen *Ehvps35* producto de la normalización de los valores de Ct de la amplificación del gen control *2S 40Sr* y el gen problema *Ehvps35* por ensayos de RT-qPCR de tres cinéticas de eritrofagocitosis con sus respectivas réplicas técnicas. La condición basal de la cinética de eritrofagocitosis es la condición de cero minutos por lo que tiene el valor de expresión relativa de mRNA fue analizado por un ensayo de T de Student según el cual los valores de P menores o iguales a 0.05 son significativamente diferentes con respecto a la condición basal a los 15, 30, 60 y 90 min.

## 7.5 Obtención, análisis de la especificidad y titulación del suero inmune contra la proteína EhVps35

---

Debido a que en este trabajo se encontró una influencia en los niveles de transcripción del gen Ehvps35 producto de la eritrofagocitosis en *E. histolytica*, se continuo con el análisis de los niveles y localización de la misma, para lo que se requirió la producción del  $\alpha$ -EhVps35 para la detección de la proteína EhVps35. Dicho anticuerpo fue producido mediante la inmunización de ratones BALB/c del péptido ESEIMNAALNNKDLSK diseñado en los programas ABCpred y BCEpred, Las muestras de sangre obtenidas del sangrado en blanco de ratones inmunizados se obtuvo suero que fue utilizado para realizar ensayo de western blot usando extracto proteico de *E. histolytica* en condición basal, adicionalmente se tomo una muestra de sangre previo a la primera inoculación del péptido y el suero obtenido es considerado el suero preinmune, por lo que se esperó que fuera negativo el reconocimiento de la proteína EhVps35. Esto con el fin de demostrar la respuesta especifica producida por la inoculación del péptido.

Resultado del western blot ocupando el suero preinmune (control negativo) a la dilución máxima usada 1:75 no se observó ningún reconocimiento. En cambio, al usar el suero inmune ( $\alpha$ -EhVps35) usando las diluciones 1:75, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 y 1:3000 se observó un reconocimiento de una única banda de 71 kDa menos en la dilución máxima (1:3000) por lo que en los ensayos de western blot siguientes se utilizó la dilución a 1:2000 (Figura 14). Adicionalmente se ocupó  $\alpha$ -actina como un control positivo con la que se obtuvo el reconocimiento de una banda de 42 kDa como se esperaba y un control negativo el suero obtenidos previo de ratones a la inoculación del péptido, con el que como era esperado no se reconoció ninguna banda.



**Figura 14: Reconocimiento del  $\alpha$ -EhVps35 en extractos de proteína total de *E. histolytica*.**

Western blot realizado con extractos proteicos totales de *E. histolytica* en condición basal en interacción con el suero de ratones inmunizados (SI) con un péptido de la proteína EhVps35 según lo cual se identificó a una banda de 71 kDa usando el SI a las diluciones 1:17, 1:100, 1:500, 1:1000 y 1:2000. Además, control negativo de esta interacción se utilizó suero de los mismos ratones previo a la inoculación del péptido (SP) a la máxima dilución usada para el SI (1:75) con la que no se observó ningún reconocimiento y el control positivos fue  $\alpha$ -actina con lo que se reconoció una banda de 42 kDa uso a una dilución 1:3000.

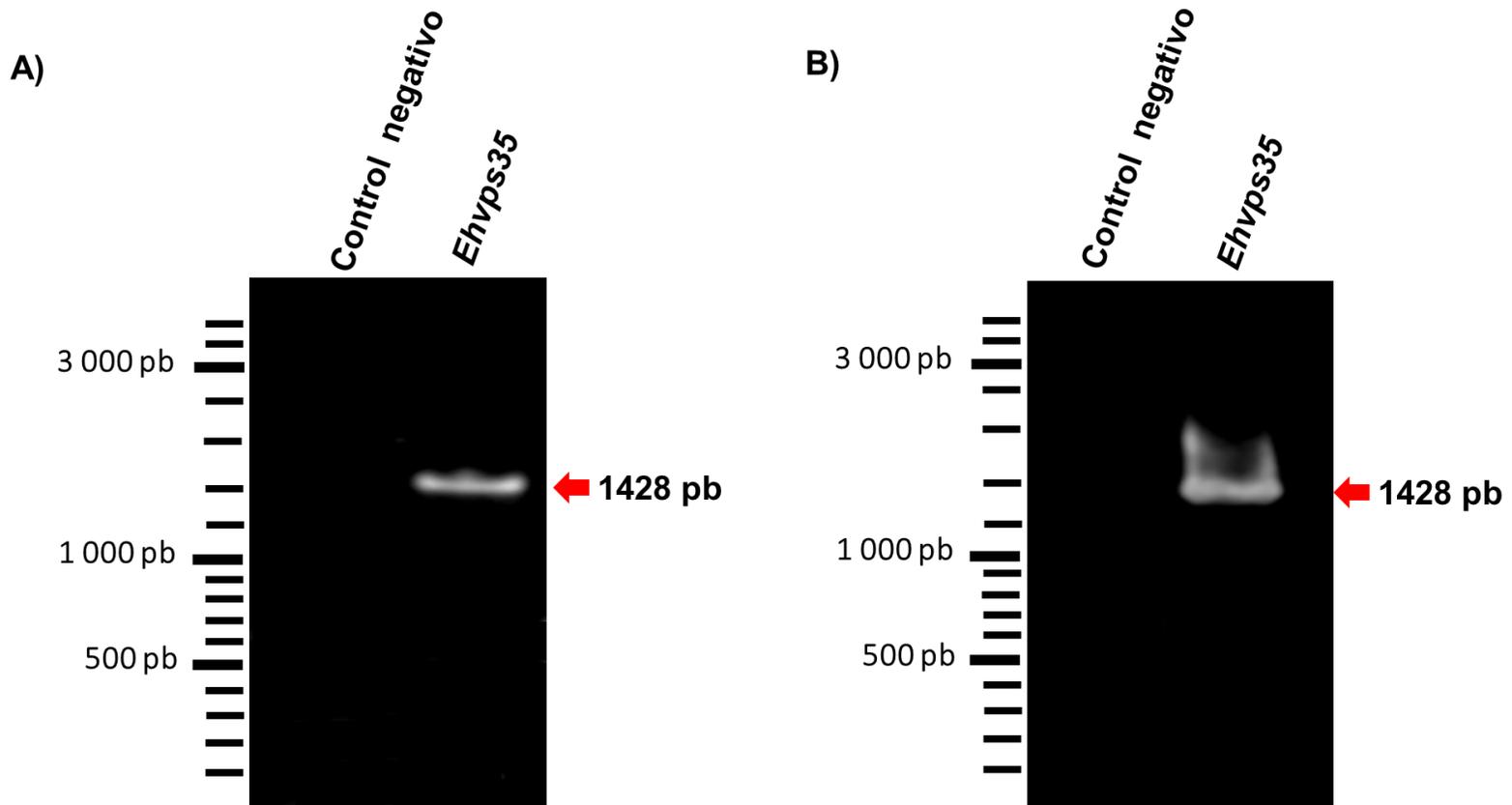
## 7.4 Producción de la proteína recombinante EhVps35

---

### 7.4.1 Amplificación del gen *Ehvps35*

La clonación del fragmento EhVps35<sub>(1476 aa)</sub> de la proteína EhVps35 fue realizada para usarla con control adicional de la especificidad del  $\alpha$ -EhVps35 obtenido de la inmunización de ratones con un péptido de la proteína EhVps35.

La clonación del fragmento EhVps35<sub>(1476 aa)</sub> inicio con la amplificación se diseñaron *primers* específicos para la amplificación de los primeros 1428 pb del gen *Ehvps35* (fragmento *Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub>), a estos *primers* se les agregaron las secuencias necesarias para que los productos pudieran ser reconocidos por las enzimas de restricción *KpnI* y *BamHI* (Tabla 3). En primer lugar, el fragmento *Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub> fue amplificado mediante un PCR de punto final, que verificó la obtención de un amplificado de 1428 pb usando cDNA de *E. histolytica* y al usar el control negativo (agua libre de nucleasas) no se encontró un amplificado (Figura 15, A). Una vez estandarizadas las condiciones de los primers diseñados para la amplificación fragmento *Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub> en las que se obtiene un único amplificado se produjo una segunda amplificación de dicha región usando una enzima de alta fidelidad, importante para evitar la introducción de mutaciones durante la amplificación del fragmento *Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub> y al realizar el ensayo se obtuvo un amplificado de único y del tamaño esperado (Figura 15, B). El amplificado obtenido fue purificado del gel de agarosa que permitió la visualización del mismo para realizar la inserción del fragmento *Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub> en el vector de transito pJET1.2/blunt.



**Figura 15: Amplificación del gen *Ehvps35*(1-1428 pb).**

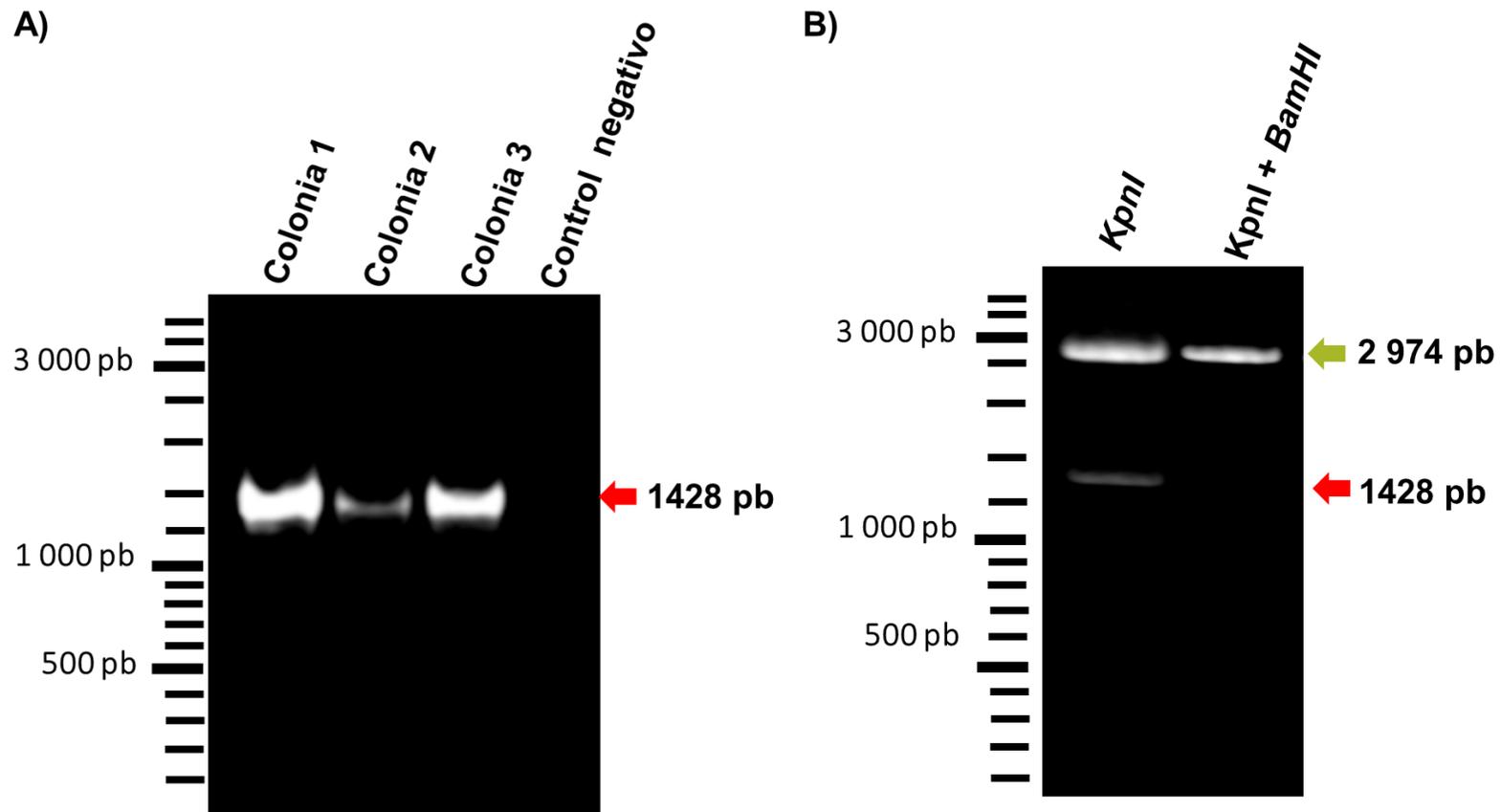
A) Producto de la amplificación del fragmento *Ehvps35*(1-1428 pb) del gen *Ehvps35* analizado mediante un PCR de punto final usando una enzima polimerasa convencional en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

B) Producto de la amplificación fragmento *Ehvps35*(1-1428 pb) del gen *Ehvps35* usando un PCR de punto final y una polimerasa de alta fidelidad, analizado en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

#### 7.4.2 Ligación del fragmento *Ehvps35*(1-1428 pb) al vector de transición y digestión de esta construcción

Los productos purificados y obtenidos de la amplificados del fragmento *Ehvps35*(1-1428 pb) del gen *Ehvps35* fueron insertados en el vector de clonación pJET1.2/blunt, dicha construcción será introducida en *E. coli* DH5 $\alpha$ , con el fin de obtener un cultivo de dichas bacterias transformadas para poder purificar una cantidad importante de plásmido que pueda ocuparse en la digestión de dicha construcción para aislar el inserto (*Ehvps35*(1-1428 pb)) del plásmido (pJET1.2/blunt,). El plásmido de transición pJET1.2/blunt, fue elegido debido a que permite una selección rápida debido a la presencia de un gel letal que es interrumpido por él inserto, por lo que las bacterias sin el inserto de interés mueren.

Las bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas fueron crecidas en una caja de Petri, de donde se aislaron y se verificó por un ensayo de PCR-*colony*, que usando los *primers* diseñados para la amplificación del fragmento *Ehvps35*(1-1428 pb), ensayo con el que se utilizó como molde una muestra de tres clonas de las que se obtuvo un amplificado de 1428 pb como era esperado (Figura 16, A). Debido a que la colonia 1 tiene un amplificado más prominente y esto podría estar relacionado con un mayor nivel de expresión de nuestro gen de interés, se elegido a la colonia 1 para ser propagada y posteriormente procesada para la purificación de la construcción pJET1.2/ *Ehvps35*(1-1428 pb) de la que se digestión realizo un enyaso de digestión usando las enzimas *KpnI* y *BamHI*, ya que el amplificado del fragmento *Ehvps35*(1-1428 pb) contiene la secuencia de nucleótidos reconocida por dichas enzimas. Resultado del ensayo de digestión se libero de un fragmento de 1428 pb, el cual corresponde al tamaño del fragmento *Ehvps35*(1-1428 pb) y un segundo fragmento de alrededor de 2974 pb el cual corresponde al vector pJET1.2/blunt (Fig. 16, B). Sin embargo, al usar únicamente la enzima *KpnI* se produjo la linealización de la construcción pJET1.2/blunt se obtuvo una banda correspondiente al tamaño del plasmático que sirvió como control positivo del ensayo de digestión del la construcción pJET1.2/ *Ehvps35*(1-1428 pb).



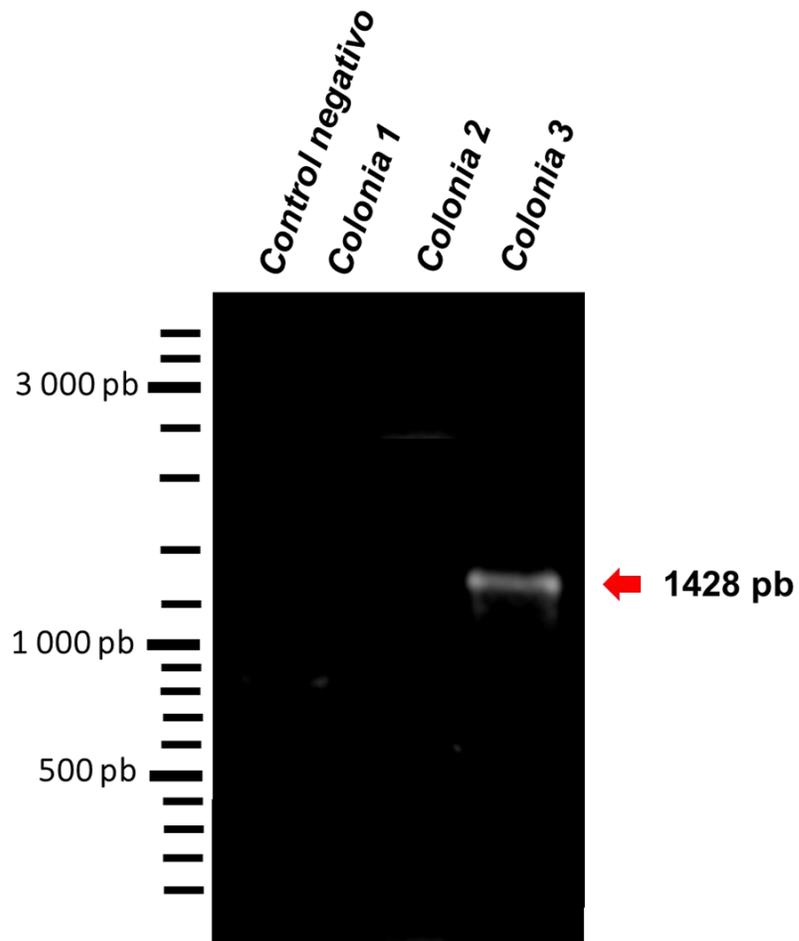
**Figura 16: Selección de la clona transformada con el vector de subclonación.**

A) Amplificación del gen *Ehvps35* de tres colonias de *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  transformadas con la construcción pJET1.2/*Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub>. B) Digestión de la construcción purificada de la colonia 1, realizada usando las enzimas *KpnI* y *BamHI* para la liberación del inserto (flecha roja) y solo la enzima *KpnI* para la linealización del vector de subclonación pColdI (flecha verde).

### 7.4.3 Ligación del fragmento *Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub> al vector de expresión

Finalmente, para ya que el inserto (*Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub>) se separó del plásmido de transición (pJET1.2/blunt) producto del ensayo de digestión anterior (Figura 17, B) y dicho inserto se purificó con el fin de ser insertado en el vector de expresión que cuenta con un promotor para permitir la producción del fragmento que incorpora los 476 aminoácidos que componen el inicio de la secuencia de aminoácidos de la proteína EhVps35 (*Ehvps35*<sub>(476 aa)</sub>). El plásmido de expresión fue usado ya que contiene un promotor para la transcripción y una región que es el sitio de entrada interno al ribosoma (IRES) que son importantes para que la secuencia del inserto sea expresada y se obtenga la proteína recombinante.

Los productos del ensayo de restricción o digestión anterior fueron ligados al vector de expresión pColdI para formar la construcción pColdI/*Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub> que fue usada para transformar bacterias *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  para la expansión del plásmido y nuevamente se eligió a una colonia con el inserto mediante ensayos de PCR-*colony*. Según lo cual se eligió a la colonia 3, debido a la observación del amplificado correspondiente al *Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub>, según lo cual la colonia 3 (Figura 17). Dicha colonia fue expandida para realizar la purificación de la construcción pColdI/*Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub> y se usó para transformar a bacterias *E. coli* de la cepa BL21, en las cuales se realizó la inducción de las proteínas recombinantes.

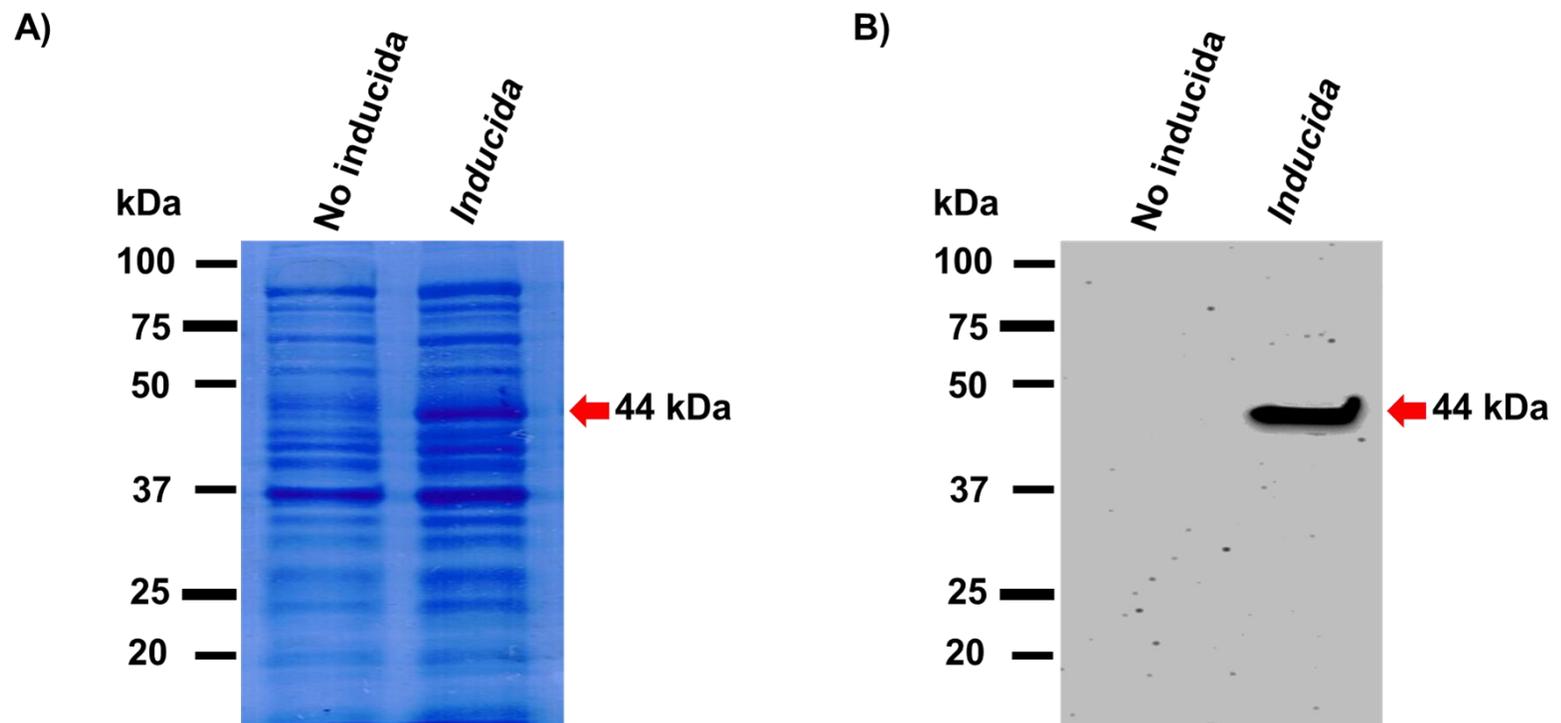


**Figura 17: Selección de clonas de *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  transformadas con el vector de clonación.**

Productos de la amplificación del fragmento *Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub> usando tres colonias transformadas con la construcción pColdI/*Ehvps35*<sub>(1-1428 pb)</sub> analizadas en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Control negativo es agua libre de nucleasas.

#### 7.4.4 Inducción del fragmento de EhVps35(1-476 aa) en bacterias transformadas con la construcción pColdI/ EhVps35(1-476 aa)

Bacterias *E. coli* de la cepa BL21 transformadas con la construcción pColdI/*Ehvps35*(1-1428 pb) fueron cultivadas hasta tener una densidad óptica de entre 0.6 y 0.8, para que se les agregara IPTG para tener una concentración de 0.1 mM para iniciar la inducción de la producción del fragmento EhVps35(1-476 aa) que representa la porción N-terminal de la proteína EhVps35. Después de 16 horas de inducción a 16 °C se realizó el procesamiento de dichas bacterias para obtener extractos proteicos totales, los cuales fueron visualizados en un gel de poliacrilamida al 12% teñidos con azul de Coomassie (Fig. 19 A) que mostró la presencia de una banda diferencial con respecto a extractos proteicos de bacterias no inducidas, correspondiente a 44 kDa. Usando los mismos extractos proteicos en una inmunodetección, se reconoció una banda de 44 kDa con anticuerpos  $\alpha$ -EhVps35 (Figura 19, B), la cual es menor a la esperada, ya que la proteína recombinante por análisis *in silico* debería tener un peso de 56 kDa.



**Figura 18: Inducción de la proteína recombinante EhVps35 en bacterias *E. coli* de la cepa BL21**

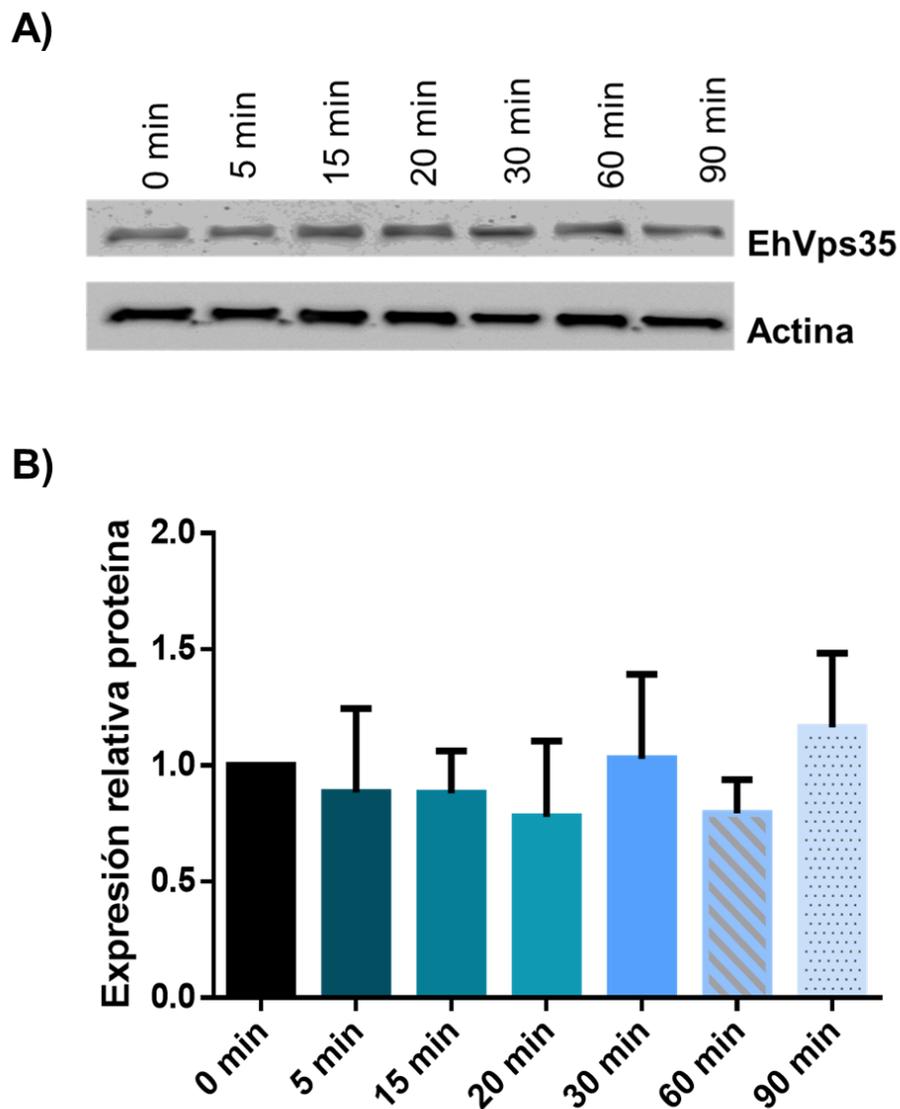
A) Extractos proteicos-totales de bacterias transformadas con la construcción pCold/*Ehvps35*(1-1428 pb) no inducidas e inducidas la producción de la proteína EhVps35 visualizados en un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. B) Inmunodetección de la proteína recombinante EhVps35 a partir de extractos proteicos totales de bacterias transformadas con la construcción pCold/*Ehvps35*(1-1428 pb) no inducidas e inducidas para la producción de la proteína EhVps35, utilizando  $\alpha$ -EhVps35 a una dilución 1:2000.

## 7.6 Determinación de los niveles de la proteína EhVps35 durante una cinética de eritrofagocitosis de *E. histolytica*

---

Una vez que se determinó la dilución a usar del  $\alpha$ -EhVps35 obtenido por inmunización de ratones y se determinó que el reconocimiento del mismo es específico para la proteína EhVps35 de *E. histolytica* se utilizó para la detección de la proteína EhVps35 por ensayos de Western blot, esto partiendo de que trofozoítos de una cinética de eritrofagocitosis tuvieron una variación de los niveles de transcripción del gen *Ehvps35* por ensayos de RT-qPCR, por lo que se decidió analizar si también había variaciones a nivel traduccional de dicho mRNA. Para lo cual se realizaron extractos de proteína total de trofozoítos de *E. histolytica* sometidos a un ensayo de eritrofagocitosis usando los tiempos 5, 15, 20, 30, 60 y 90, los cuales fueron usados para realizar un ensayo de Western blot con  $\alpha$ -EhVps35 para la detección de la proteína EhVps35. La imagen del reconocimiento fue analizada en el programa ImageJ para realizar un análisis densitométrico que fue normalizado con el reconocimiento observado en la condición basal (0 min) y antes de esto cada muestra fue normalizada con respecto al reconocimiento de la proteína actina (control positivo).

La detección de la proteína EhVps35 durante los tiempos de eritrofagocitosis examinados (0 min, 5 min, 15 min, 20 min, 30 min, 60 min y 90 min) tuvo un reconocimiento aparentemente homogéneo en todas las condiciones analizadas (Figura 19, A). Los resultados al ser analizados en el programa ImageJ se obtuvieron valores calculados a partir del número de píxeles en la banda detectada, dicho número fue utilizado por el realizar en prueba de T de Student en el programa GraphPad Prism 6 según lo cual no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las condiciones de eritrofagocitosis analizadas (Figura 18, B).



**Figura 19: Expresión relativa de la proteína EhVps35 durante una cinética de eritrofagocitosis de *E. histolytica*.**

A) Inmunodetección de la proteína EhVps35 y la proteína control (actina) durante una cinética de eritrofagocitosis. B) Análisis densitométrico de la detección de la proteína EhVps35, normalizado con los valores de la proteína control (actina) y los valores de la proteína EhVps35 en la condición basal.

## 7.8 Ubicación subcelular de la proteína EhVps35 durante una cinética de eritrofagocitosis de *E. histolytica*.

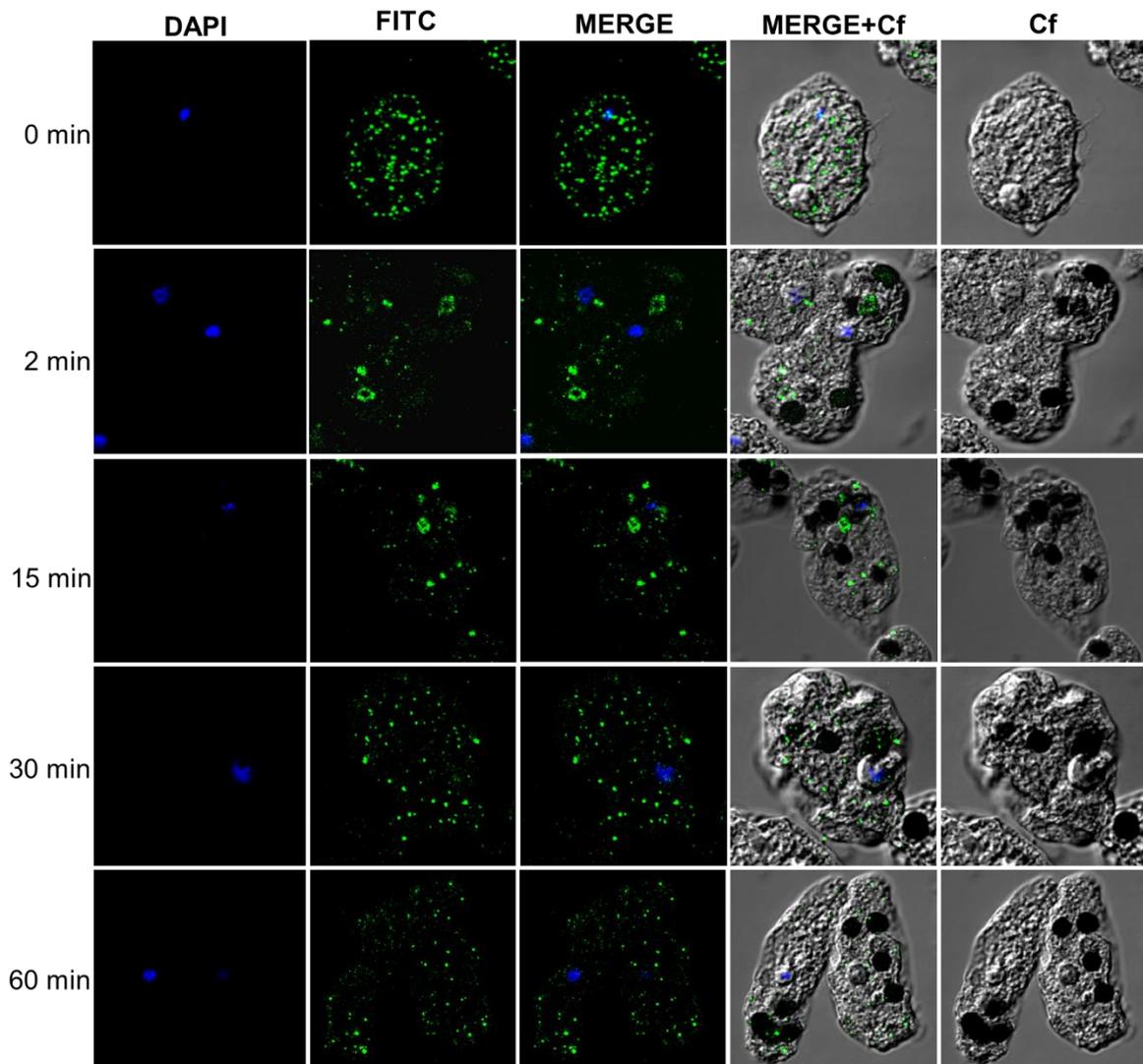
---

Debido a que un proceso de endocitosis media la transducción de señales por medio del control de la cantidad de receptores de señalización y sus ligandos en la superficie celular, además mediante la internalización de diferentes sustancias que produce dentro de la célula señalizaciones que influyen en la localización de proteínas que tienen una función en la formación del endosoma, el proceso de maduración de los endosomas, entre otros procesos. Por esta razón se decidió analizar la localización de la proteína EhVps35 durante una cinética de eritrofagocitosis de *E. histolytica*. Para este ensayo se utilizaron trofozoítos adheridos a un cubreobjetos en el cual pusieron en interacción con eritrocitos en una relación 1:25 (un trofozoíto por cada 25 eritrocitos) por los tiempos 2, 15, 30 y 60 minutos. Una vez terminado el tiempo de interacción los eritrocitos fueron hemolizados con una solución hipotónica (agua estéril con medio TYI en una proporción 1:1) y como un control negativo de eritrofagocitosis los trofozoítos sin interacción con eritrocitos al que se le denominó 0 min de eritrofagocitosis o condición basal. Además, los trofozoítos fueron fijados y permeabilizados para permitir la entrada del  $\alpha$ -EhVps35 (anticuerpo primario), debido a que se esperaba que esta proteína se encuentre en el citoplasma de la célula. Dicho anticuerpo primario fue reconocido por el anticuerpo secundario  $\alpha$ -IgG de ratón acoplado a FITC, por lo que en las imágenes obtenidas del microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700 Imager la proteína EhVps35 se ve representada por un color verde (Imagen 20). Adicionalmente se tiñeron los núcleos de las células con DAPI, lo cual otorga una representación por el color azul de dicha estructura membranosa (Imagen 20).

Las imágenes obtenidas fueron analizadas en múltiples campos y cortes, para elegido una sola célula que representara lo visto en campo amplio, resultado de lo que los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* en condición basal tienen una localización de la proteína EhVps35 se localiza distribuye en todo el citoplasma en cúmulos durante la condición basal de trofozoítos (Figura 19). En trofozoítos que

fueron parte del ensayo de eritrofagocitosis antes mencionado se vio localización deferencial a la condición basal de los mismos, ya que en general estos se encontraron en cúmulos hacia los eritrocitos fagocitados y en estructuras vesiculares.

En trofozoítos con 2 minutos de eritrofagocitosis se observó una localización de la proteína EhVps35 en cúmulos más evidentes y localizados alrededor de los eritrocitos fagocitados y formando estructuras vesiculares en el citoplasma (Figura 19). Después de 15 min de eritrofagocitosis la proteína EhVps35 se ubicó de forma más evidente en las estructuras vesiculares formadas en el citoplasma y en los eritrocitos fagocitados (Figura 19). A los 30 minutos se observaron cúmulos disipados en el citoplasma y en los eritrocitos fagocitados de la proteína EhVps35 (Figura 19). Finalmente, a los 60 minutos de eritrofagocitosis desaparece casi totalmente la marca de la proteína EhVps35 en los eritrocitos fagocitados y los cúmulos se localiza similares a la ubicación observada en la condición basal (Figura 19).



**Figura 20: Inmunolocalización de la proteína EhVps35 durante una cinética de eritrofagocitosis de *E. histolytica*.**

Trofozoítos permeabilizados con Triton-X100 fueron incubadas con eritrocitos en una proporción 1:25 por 0, 2, 15, 30 y 60 min; se utilizó  $\alpha$ -EhVps35 (1:200) como anticuerpo primario, que fue detectado por  $\alpha$ -IgG de ratón (1:100) acoplado a FITC (color verde). Se utilizó DAPI (1:2000) para marcar los núcleos (color azul). Para examinar las muestras se utilizó un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700 Imager y el análisis se hizo con el *software* proporcionado por el fabricante (ZEN 2009 Light Edition de Zeiss). Ct: contraste de fases. *MERGE*: mezcla de la fluorescencia del núcleo y la proteína EhVps35

## 8. DISCUSIÓN

La endocitosis definida como la invaginación de la membrana plasmática que produce una vesícula intracelular permitiendo internalizar partículas o fluidos del entorno extracelular, además de membrana plasmática con diversos receptores por lo que este proceso tiene un papel central en la señalización celular y la dinámica de la membrana (Fürthauer y Smythe, 2014). Particularmente la fagocitosis, un tipo de endocitosis es uno de los principales mecanismos de virulencia de *E. histolytica*, ya que la fagocitosis permite la introducción de diferentes tipos de células de su huésped, bacterias y otras partículas, así como fragmentos de su propia membrana lipídica (Orozco *et al.*, 1983). La vesícula formada por el proceso de fagocitosis pasa por un proceso de maduración que implica el paso de fagosomas tempranos, cuerpos multivesiculares (MVBs), fagosomas tardíos y fagolisosomas que varían en su composición proteica, lipídica y pH interno (Flannagan *et al.*, 2012). Dicho proceso de maduración involucra la participación de moléculas y proteínas, para administraran el contenido del fagosoma hacia lisosomas para su degradación o bien se recuperan proteínas de membrana integral y macromoléculas asociadas (Yeung y Grinstein, 2007). El complejo proteico retromero juega un papel en el reciclamiento de receptores de membrana en los fagosomas, fenómeno en el que se enfoca este trabajo, al analizar las variaciones a nivel transcripcional, traduccional y de localización de la proteína EhVps35 en *E. histolytica* durante la fagocitosis de eritrocitos que implica el reclutamiento de esta maquinaria como lo reportó Nakada-Tsukui y colaboradores (2005).

En *E. histolytica* según Koumandou *et al.* (2011) en el genoma de este parasito existen cinco genes codificantes para la proteína Vps35, datos que concuerdan con el análisis *in silico* realizado en este trabajo. La presencia de más de una copia de los genes codificantes en proteínas del retromero es común en los cinco representantes de los grupos que clasifican a los eucariontes (SAR, Archaeplastida, Excavata, Amebozoa y Opisthokonta) (Koumandou *et al.* 2011; Kim *et al.*, 2008; Kerr *et al.*, 2005). Particularmente la presencia de múltiples genes son especie

específicos y por lo tanto relativamente recientes, particularmente existen múltiples homólogos de Vps35 en *Nematostella vectensis*, *E. histolytica* (Amoebozoa), *Arabidopsis thaliana* (Archaeplastida), *Populus trichocarpa* (Archaeplastida), *Emiliania huxleyi* y *Trichomonas vaginalis* (Excavata) (Koumandou *et al.* 2011). La pregunta que surge ante más de un gen codificante para la misma proteína, ¿para qué tener más de una secuencia igual?, únicamente fue abordada en la planta *Arabidopsis thaliana*. Esta planta cuenta con tres homólogos a Vps35, denominadas Vps35a, Vps35b y Vps35c; cada uno por funciones diferenciales en el reciclaje de diferentes blancos que a su vez tienen inclusive afectaciones a nivel fenotípico (Munch *et al.*, 2015; Noszynski *et al.*, 2013; Yamazaki *et al.*, 2008). Por lo tanto, sería importante abordar esta pregunta en los cuatro genes homólogos a Vps35 en *E. histolytica* consideradas por el análisis *in silico* como potencialmente funcionales formando parte del complejo proteico retrómero, que cuentan con el dominio Vps35 y similar estructura terciaria (superior 90% entre las isoformas EhVps35 A, B, C y D). Adicionalmente la presentan parcial o totalmente el motivo PRLYL es un factor importante para considerar funcional a la proteína Vps35, esto debido a que el motivo PRLYL ubicado hacia el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de Vps35 está altamente conservado entre levaduras, plantas, protozoarios, nematodos y mamíferos (Restrepo *et al.*, 2007; Miras *et al.*, 2013). Este motivo es fundamental para la unión entre Vps35 y Vps26, específicamente los residuos Arg (R) y Leu (U) al estar mutados delata la función del retrómero (Norwood *et al.*, 2011; Restrepo *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). La búsqueda del motivo PRLYL en cuatro secuencias de Vps35 en *E. histolytica* (EhVps35-A, EhVps35-B, EhVps35-C y EhVps35-D) tienen conservados los dos aminoácidos descritos como fundamentales para la unión de Vps35 con Vps26.

La predicción de las interacciones de EhVps35-A, EhVps35-B, EhVps35-C y EhVps35-D tienen predicciones similares de interacción al incluir a Rab7A, Vps36, así como múltiples secuencias de Vps26 y Vps29. Sin embargo, existe una discrepancia importante en la interacción con la segunda Rab7, de tipo D con EhVps35-D, que en el caso de EhVps35-B, EhVps35-C y EhVps35-D es Rab7F. La

interacción con una isoforma de Rab7 es importante debido a que en *E. histolytica* aun no está caracterizado del todo el papel de las proteínas SNX, por lo que se propone a GTPasas pequeñas del tipo Rab7A como suplentes de las proteínas SNX (Nakada-Tsukui *et al.*, 2005; Bonifacino y Hurley, 2008). La proteína Rab7A en estado activo (GTP-Rab7A) interactúa con el extremo C-terminal de la proteína Vps26 del retrómero y participa en el transporte de hidrolasas a lisosomas, regula la formación y maduración de las vacuolas preagosomales (PPV) e interacciona con el extremo carboxilo terminal de Vps26 por lo que podría estar relacionada con el transporte retrógrado (transporte de la lectina Gal/GalNac) (Nakada-Tsukui *et al.*, 2010; Nakada-Tsukui *et al.*, 2005; Bosch y Siderovski, 2013; Welter y Temesvari, 2009; Saito-Nakano *et al.*, 2007). La interacción de Vps35 con diferentes isoformas de Rab7 en *E. histolytica* podría darles una función o participación diferente en procesos celulares, ya que esta proteína cuenta con 9 isoformas (Rab7 A, B, C, D, E, F, G, H e I ), de las cuales solo EhRab7A y EhRab7B tienen un homólogo en mamíferos y se ha estudiado su ubicación, por lo que, la implicación de la predicción de una interacción con Rab7D o Rab7F aun no se desconoce (Saito-Nakano *et al.*, 2007).

La predicción de la interacción de EhVps35-B, EhVps35-C y EhVps35-D con EhVps36, una proteína identificada como parte del ESCRT-II (Díaz-Hernández, 2017; López-Reyes *et al.*, 2010). El análisis *in silico* de las interacciones del complejo ESCRT-II (EhVps22, EhVps25 y EhVps36) de *E. histolytica* realizado por Díaz-Hernández (2017) concuerda el modelo propuesto por el análisis realizado en este trabajo. Sin embargo, la interacción entre el retrómero y la maquinaria proteica ESCRT aun no ha sido demostrada, pero los resultados observados en el ensayo de microscopia confocal para determinar la localización de EhVps35 durante un proceso de fagocitosis realizados en este trabajo, muestra una distribución en cúmulos dispersos por el citoplasma que tienden a moverse regionalmente hacia fagosomas de forma similar a la distribución observada por EhVps36 reportada por Díaz-Hernández (2017).

La distribución de la proteína EhVps35 en trofozoítos de *E. histolytica* de condición basal están distribuidos en cúmulos dispersos en el citoplasma, datos similares a los observados en trofozoítos del parasito intestinal *Giardia lamblia*, sin embargo, en *E. histolytica* la proteína EhVps35 no mostro una regionalización preferente hacia la membrana plasmática (Miras *et al.*, 2013).

La inmunodetección de EhVps35 por Western blot tanto de extractos proteicos totales de *E. histolytica* como de bacterias *E. coli* inducidas para la expresión del fragmento EhVps35<sub>(1-476 aa)</sub> en ambos casos se identificó una banda con una masa molecular menor a la esperada por 16 kDa y 12 kDa respectivamente. Esta discrepancia entre la masa molecular esperada y la observada coincide con la inmunodetección de la proteína Vps35 en otros organismos (Haft *et al.*, 2000; Miras *et al.*, 2013). La migración aberrante de EhVps35 tanto en su fragmento EhVps35<sub>(1-476 aa)</sub> clonado como en la proteína completa, se puede deber al plegamiento de esta proteína ( $\alpha$ -helice y loops) similar al plegamiento de una proteína de membrana a pesar de no poseer estructuras transmembranales según el análisis *in silico*, ya que su plegamiento le confiere la capacidad de interactuar con una cantidad diferencial del detergente SDS que le confiere la carga negativa a las proteínas para que migren durante la electroforesis, sin embargo, proteínas de membrana interactúan con cantidades superiores o inferiores de este detergente teniendo como consecuencia una migración aberrante que les da un mayor o menor peso molecular (Rath *et al.*, 2009).

Los hallazgos apostados por este trabajo concuerdan con el trabajo de Nakada-Tsukui y colaboradores (2005) donde el proceso de fagocitosis modifica la localización de otra la proteína del retromero (EhVps26). Es así que la fagocitosis no solo modifico la localización de EhVps35, sino también los niveles de transcripción del gen que la codifica, aunque no así los niveles de la proteína. Datos similares se han descrito en proteínas que componen la maquinaria ESCRT implicada en la formación de MVB en *E. histolytica* (Avalos-Padilla *et al.*, 2015; Avalos-Padilla *et al.*, 2018; Bañuelos *et al.*, 2005; Bañuelos *et al.*, 2012; Díaz-

Hernandez, 2017; Galindo-Olea, 2016), lo cual sugiere al igual que las evidencias del retromero en otros organismos, que el complejo proteico retrómero se encuentra conservada en sus funciones a lo largo de la línea eucarionte y se encuentra modificando su localización y niveles de expresión significativamente por el evento de eritrofagocitosis en *E. histolytica*.

## 9. CONCLUSIONES

- Se corroboró la existencia de cinco secuencias con homología a las proteínas Vps35 de humano y levadura, en *E. histolytica*. En las cuales, se identificó el dominio Vps35, característico de sus homólogos de humano y levadura. Sin embargo, solo dos isoformas de la proteína EhVps35 (EhVps35-B y EhVps35-D) poseen el motivo PRLYL, necesario en otros sistemas para la interacción con Vps26 y la conformación del retrómero.
- La predicción de la estructura terciaria de EhVps35-B y EhVps35-D sugiere una conformación similar a la proteína HsVps35, siendo EhVps35-D, la que comparte la mayor identidad con HsVps35.
- Se determinaron *in silico*, interacciones potenciales para EhVps35 con Rab7A, Rab7D, EhVps36, así como con las proteínas del complejo tipo retrómero (EhVps26 y EhVps29).
- Durante la eritrofagocitosis se modifican significativamente los niveles de RNA mensajero de *Ehvps35*.
- Se identificó a la proteína EhVps35 en extractos proteicos totales de *E. histolytica*, con un peso molecular de 71 kDa, menor al estimado. Los resultados sugieren que las variaciones del peso molecular en esta proteína pudieran deberse a características o degradación hacia su extremo amino.
- La relocalización de la proteína EhVps35 desde el citoplasma hacia fagosomas y lo que parecen ser vesículas, sugiere la participación de esta proteína en el mecanismo de virulencia, fagocitos.

## 10. PERSPECTIVAS

- Determinar los genes Ehvps35-B, Ehvps35-C y Ehvps35-D son transcripcionalmente y traduccionalmente activos.
- Observar por microscopia electrónica trofozoítos de *E. histolytica* después de una cinética de eritrofagocitosis para observar de cerca la localización de EhVps35 en fagosomas y la formación de estructuras tubulares características del reciclamiento mediado por el complejo proteico retromero
- Definir si la causa de la discrepancia entre los niveles de RNA del gen *Ehvps35* y la proteína EhVps35, mediante el análisis de la vida media de ambos.
- Realizar la inmunolocalización de la proteína EhVps35 durante un ensayo de pulso y caza en una cinética de eritrofagocitosis para darle seguimiento a la maduración de un fagosoma.
- Probar la asociación del retromero y la maquinaria proteica ESCRT (la proteína EhVps35 y la proteína EhVps36 del complejo ESCRT-II) predica por el análisis *in silico*. Mediante inmunoprecipitación e inmunofluorescencia.

## 11. BIBLIOGRAFIA

- Adl S. M., Simpson A. G., Lane C. E., Lukeš J., Bass D., Bowser S. S., Brown M. W., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., Heiss A., Hoppenrath M., Lara E., Le Gall L., Lynn D. H., McManus H., Mitchell E. A., Mozley-Stanridge S. E., Parfrey L. W., Pawlowski J., Rueckert S., Shadwick L., Schoch C. L., Smirnov A. y Spiegel F. W. (2012) The revised classification of eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 59(5): 429-493.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K. y Walter P. (2015) *Biología molecular de la célula: Tráfico de membrana intracelular*. Omega. 699-757.
- Avalos-Padilla Y., Betanzos A., Javier-Reyna R., García-Rivera G., Chávez-Munguía B., Lagunes-Guillén A., Ortega J. y Orozco E. (2015) EhVps32 Is a Vacuole-Associated Protein Involved in Pinocytosis and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *PLOS Pathogens*.11(7): e1005079.
- Avalos-Padilla Y., Knorr R. L., Javier-Reyna R., García-Rivera G., Lipowsky R., Dimova R. y Orozco E. (2018) The Conserved ESCRT-II Machinery Participates in the Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Cell Infect Microbiol*. 8:53.
- Babst M., Katzmann D. J., Estepa-Sabal E. J., Meerloo T. y Emr S. D. (2002) ESCRT-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Developmental Cell*.3(2): 271-282.
- Bañuelos C., García-Rivera G., López-Reyes I. y Orozco E. (2005) Functional characterization of EhADH112: an *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein. *Experimental Parasitology*. 110(3): 292-297.
- Bañuelos C., Garcia-Rivera G., López-Reyes I., Mendoza L., Gónzalez-Robles A., Herranz S., Vincent O. y Orozco E. (2012) EhADH112 is a Bro1 domain-containing protein involved in the *Entamoeba histolytica* multivesicular bodies pathway. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 12(657942): 1-15.
- Bilodeau P. S., Winistofer S. C., Kearney W. R., Robertson A. D. y Piper R. C. (2003) Vps27-Hse1 and ESCRT-1 complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome. *The Journal of Cell Biology*. 163(2): 237-243.
- Bonifacino J. S. y Hurley J. H. (2008) Retromer. *Current Opinion in Cell Biology*. 20: 427-436.
- Bosch D. E., & Siderovski D. P. (2013). G protein signaling in the parasite *Entamoeba histolytica*. *Experimental & Molecular Medicine*. 45(3): e15.
- Bujny M. V., Popoff V., Johannes L. y Cullen P. J. (2007) The retromer component sorting nexin-1 is required for efficient retrograde transport of Shiga toxin from

- early endosome to the trans Golgi network. *Journal of Cell Science*. 120(12): 2010-2021.
- Chelsea M. y William A. P. (2014) Regulation of Virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annual Review of Microbiology*. 68: 493-520.
- Christ L., Raiborg C., Wenzel E. M., Campsteijn C. y Stenmark H. (2017) Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery. *Trends in Biochemical Sciences*. 42(1): 42-56.
- Corliss J. O. (1994) An interim utilitarian ("user-friendly") hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozoologica*. 33: 1-51.
- Das S., Yu S., Sakamori R., Strypulkowski E. y Gao N. (2012) Wntless in Wnt secretion: molecular, celular and genetic aspects. *Frontiers in Biology*. 7(6):587-593.
- Diamond L. S., Harlow D. R. y Cunnick C. C. (1978) A new médium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*. 72(4): 431-432
- Díaz-Hernández M. C. (2017) Las proteínas del complejo ESCRT-II: identificación y participación durante la eritrofagocitosis en *Entamoeba histolytica*. (Tesis de maestría) Cinvestav, México.
- Faust D. M. y Guillen N. (2012) Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes and Infection*. 14(15): 1428-1441.
- Fiji K., Shimada T., Takahashi H., Tamura K., Koumoto Y., Utsumi S., Nishizawa K., Maruyama N. y Hara-Nishimura I. (2007) Arabidopsis vacuolar sorting mitants (green fluorescent sed) can be dentified efficiently by secretion of vacuole-targeted Green fluorescent protein in their sedes. *The Plant Cell*. 19(2): 597-609.
- Fürthauer M. y Smythe E. (2014) Systems Dynamics in Endocytosis. *Traffic Report*. 15(3): 338-346.
- García-Rivera G., Rodríguez M. A., Ocádiz R., Martínez-López, Arroyo R., González-Robles A y Orozco E. (1999) *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa Surface protein. 33(3): 556-568.
- Gill D. J., Hsiangling T., Sun J., Perisic O., Veprintsev D. B., Emr S. D. y Williams R. L. (2007) Structural insight into the ESCRT-I/ESCRT-II link and its role in MVB trafficking. *The EMBO Journal*. 26(2): 600-612.
- Groppelli E., Len A. C., Granger L. A. y Jolly C. (2014) Retromer Regulares HIV-1 Envelope Glycoprotein Trafficking and Incorporation into Virions. *PLOS Pathogens*.10(10): e1004518.
- Haft C. R., Sierra M. de la L., Bafford R., Lesniak M. A., Barra V. A. y Taylor S. I. (2000) Human Orthologs of Yeast Vacuolar Protein Sorting Proteins Vps26, 29 y 35: Assembly into Multimeric Complex. *Molecular Biology of the Cell*. 11(12): 4105-4116.

- Hurley J. H. (2008) ESCRT complexes and the biogénesis of multivesicular bodies. *Current Opinion in Cell Biology*. 20(1): 4-11.
- Jia—Jia L. (2016) Retromer-Mediated Protein Sorting and Vesicular Trafficking. *Journal of Genetics and Genomics*. 43(4): 165-177.
- Katzmann D. J., Babst M. y 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(2): 145-155.
- Kerr M. C., Bennetts J. S., Simpson F., Thomas E. C., Flegg C., Gleeson P. A., Wicking C. y Teasdale R. D. (2005) A novel mammalian retromer component, Vps26B. *Traffic*. 6(11): 991-1001.
- Kim E., Lee J. W., Baek D. C., Lee S. R., Kim M. S., Kim S. H., Imakawa K. y Chang K. T. (2008) Identification of novel retromer complexes in the mouse testis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 375(1): 16-21.
- Koumandou, V. L., Klute, M. J., Herman, E. K., Nunez-Miguel, R., Dacks, J. B., & Field, M. C. (2011). Evolutionary reconstruction of the retromer complex and its function in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science*, 124(9), 1496–1509.
- Loftus B., Loftus B., Anderson I., Davies R., Alsmark U. C., Samuelson J., Amedeo P., Roncaglia P., Berriman M., Hirt R. P., Mann B. J., Nozaki T., Suh B., Pop M., Duchene M., Ackers J., Tannich E., Leippe M., Hofer M., Bruchhaus I., Willhoeft U., Bhattacharya A., Chillingworth T., Churcher C., Hance Z., Harris B., Harris D., Jagels K., Moule S., Mungall K., Ormond D., Squares R., Whitehead S., Quail M. A., Rabbinowitsch E., Norbertczak H., Price C., Wang Z., Guillén N., Gilchrist C., Stroup S. E., Bhattacharya S., Lohia A., Foster P. G., Sicheritz-Ponten T., Weber C., Singh U., Mukherjee C., El-Sayed N. M., Petri W. A. Jr., Clark C. G., Embley T. M., Barrell B., Fraser C.M., Hall N. (2005) The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*. 433(7028): 865-868.
- López-Reyes I., García-Rivera G., Bañuelos C., Herranz S., Vincent O., López-Camarillo C., Marchat L. A. y Orozco E. (2010) Detection of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport in *Entamoeba histolytica* and Characterization of the EhVps4 Protein. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010 (890674): 1-15.
- Luhtala N. y Odorizzi G. (2004) Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *The Journal of Cell Biology*. 166(5): 717-729.
- Miras S. L., Merino M. C., Gottig N., Rópolo A. S. y Touz M. C. (2013) The giardial VPS35 retromer subunit is necessary for multimeric complex assembly and interaction with the vacuolar protein sorting receptor. *Biochimica et Biophysical Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. 1883(12): 2628-2638.

- Munch D., Teh O-K., Malinovsky F. G., Luis Q., Vetukuri R. R., El Kasmi F., Brodersen P., Hara-Nishimura I., Dangl J. L., Petersen M., Mundy J. y Hofius D. (2015) Retromer Contributes to Immunity-Associated Cell Death in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 27(2):463-479.
- Nagata N., Shimbo T., Akiyama J., Nakashima R., Nishimura S., Yada T., Watanabe K., Oka S., Uemura N. (2012) Risk Factors for Intestinal Invasive Amebiasis in Japan, 2003-2009. *Emerging Infectious Diseases*. 18 (5): 717-724.
- Nakada-Tsukui K. y Nozaki T. (2016) Immune Response of Amebiasis and Immune Evasion by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Immunology*. 7: 175.
- Nakada-Tsukui K., Saito-Nakano Y., Ali V. y 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(11): 5294-5303.
- Nakada-Tsukui K., Saito-Nakano Y., Husain A. y Nozaki T. (2010) Conservation and function of Rab small GTPases in *Entamoeba*: Annotation of *E. invadens* Rab and its use for the understanding of *Entamoeba* biology. *Experimental Parasitology*. 126(3): 337-347.
- Norwood S. J., Shaw D. J., Cowieson N. P., Owen D. J., Teasdale R. D. y Collins B. M. (2010) Assembly and Solution Structure of the Core Retromer Protein Complex. *Traffic*. 12(1): 56-71.
- Noszynski T., Feraru M. I., Hirsh S., De Rycke R., Niculaes C., Boerjan W., Van Leene J., De Jaeger G., Vanneste S. y Friml J. (2013) Retromer subunits Vps35 and Vps29 mediate prevacuolar compartment (PVC) function in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*. 6(6): 1849-1862.
- Okada M. y Nozaki T. (2006) New Insights into Molecular Mechanisms of Phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by Proteomic Analysis. *Archives of Medical Research*. 37(2): 244-251.
- Orozco M. E., Martinez-Paloma A. y Guarneros G. (1980) Virulence and Surface properties of various exanic strains of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest Med*. 11(1): 153-157.
- Orozco, E., Guarneros, G., Martinez-Palomo, A. and Sanchez, T. (1983) *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *Journal of Experimental Medicine*. 158(5): 1511-1521.
- Pim D., Broniarczyk J., Bergant M., Playford M. P. y Banks L. (2015) A Novel PDZ Domain Interaction Mediates the Binding between Human Papillomavirus 16 L2 and Sorting Nexin 27 and Modulates Virion Trafficking. *Journal of Virology*. 89(20): 10145-10155.
- Popa A., Zhang W., Harrison M. S., Goodner K., Kazakov T., Goodwin E. c., Lipovsky A., Burd C. G. y DiMaio D. (2015) Direct Binding of Retromer to Human Papillomavirus Type 16 Minor Capsid Protein L2 Mediates Endosome Exit during Viral Infection. *PLOS Pathogens*. 11(2): e1004699.

- Pornillos O., Alam S. L., Rebecca R. L., Myszka D. G., Davis D. R. y Sundquist W. I. (2001) Structure and functional interaction of the Tsg101 UEV domain. *The EMBO Journal*. 21(10): 2397-2406.
- Prakash V. y Bhimji S. (2017) Abscesp, amebiano del hígado. StatPearls (Internet) Acceso: 4 de julio del 2017 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430832/>
- Raiborg C. y Stenmark H. (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*. 458: 445-452.
- Raiborg C., Bremnes B., Mehlum A., Gillooly D. J., D'Arrigo A., Stang E. y Stenmark H. (2001) FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *Journal of Cell Science*. 114(12): 2255-2263.
- Rath A., Glibowicka M., Nadeau V. G., Chen G. y Deber C. M. (2009) Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(6): 1760-1765.
- Restrepo R., Zhao X., Peter H., Zhang B., Arvan P. y Nothwehr S. F. (2007). Structural Features of Vps35p Involved in Interaction with Other Subunits of the Retromer Complex. *Traffic*, 8(12), 1841–1853.
- Saito-Nakano Y., Mitra B. N., Nakada-Tsukui K., Sato D. y Nozaki T. (2007) Two Rab7 isoforms, EhRab7A and EhRab7B, play distinct roles in biogenesis of lysosomes and phagosomes in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology*. 9(7): 1796-1808
- Saito-Nakano Y., Yasuda T., Nakada-Tsukui K., Leippe M. y Nozaki T. (2004) Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biological Chemistry*. 279(47): 49497-49507.
- Sateriale A. y Huston C. D. (2011). A Sequential Model of Host Cell Killing and Phagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *Journal of Parasitology Research*. 2011: 926706
- Seaman M. N. (2012) The retromer complex-endosomal protein recycling and beyond. *Journal of Cell Science*. 125(20): 4693-4702.
- Serrano-Luna J., Piña-Vázquez C., Reyes-López M., Ortiz-Estrada G. y de la Garza M. (2013) Proteases from *Entamoeba* spp. and Pathogenic Free-Living Amoebae as Virulence Factors. *Journal of Tropical Medicine*. 2013(890603): 1-32.
- Shimada T., Koumoto Y., Li L., Yamazaki M., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (2006) AtVPS29, a putative component of retromer complex, is required for the efficient sorting of seed storage proteins. *Plants and Cell Physiology*. 47(9): 1187-1194.
- Sorkin A. y Von Zastrow M. (2002) Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nature Reviews. Molecular cell biology*. 3(8): 600-614.

- Stanley S. L. (2003) Amoebiasis. *The Lancet*. 361(9362): 1025-1034.
- Teis D., Seksena S. y Emr S. D. (2008) Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Developmental Cell*. 15(4): 578-589.
- Trousdale C. y Kim K. (2015) Retromer: Structure, function, and roles in mammalian disease. *European Journal of Cell Biology*. 94(11): 513-521.
- Vassilleva E. V. y Nusrat A. (2008) Vesicular Trafficking: Molecular Tools and Targets. *Methods in Molecular Biology*. 440: 3-14.
- Wang H. J., Hsu Y. W., Guo C. L., Jane W. N., Wang H., Jiang L., & Jauh G.Y. (2017). VPS36-Dependent Multivesicular Bodies Are Critical for Plasmamembrane Protein Turnover and Vacuolar Biogenesis. *Plant Physiology*, 173(1), 566–581.
- Watanabe N., Nozaki T. y Nakada-Tsukui K. (Abril de 2018) Functional analysis of PI3P effector candidate SNX in *Entamoeba histolytica*. En C. Ximenez, M. Shibayama y J. Serrano (Organizadores). XIX International Seminar on Amebiasis 2018. Congreso llevado a cabo en Puebla de los Ángeles, México.
- Welter, BH, y Temesvari, LA (2009). La sobreexpresión de una forma mutante de EhRabA, una GTPasa Rab única de *Entamoeba histolytica*, altera el retículo endoplasmático de morfología y localización de la Gal / GalNAc adherencia lectina. *Célula eucariota*. 8 (7), 1014-1026.
- Winter V. y Hauser M. T. (2006) Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *Trends in Plant Science*. 11(3): 115-123.
- Ximénez C., Morán P., Ramos F. y Ramiro M. (2007) Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Medicina Interna de México*. 23(5): 398-407.
- Ximénez C., Morán P., Rojas L., Valadez A. y Gómez A. (2009) Reassessment of the epidemiology of amebiasis. State of the art. *Infection, Genetics and Evolution*. 9(6): 1023-1032.
- Yamazaki. M., Shimada T., Takahashi H., Tamura K., Kondo M., Nishimura M y Hara-Nishimura I. (2008) Arabidopsis Vps35, a retromer component, is required for vacuolar protein sorting and involved in plant growth and leaf senescence. *Plant and Cell Physiology*. 49(2): 142-156.
- Zhao X., Nothwehr S., Lara-Lemus R., Zhang B. Y., Peter H. y Arvan P. (2007) Dominant-Negative Behavior of Mammalian Vps35 in Yeast Requires a Conserved PRLYL Motif involved in Retromer Assembly. *Traffic*. 8(12):1829-1840.
- Zhao X., Nothwehr S., Lara-Lemus R., Zhang B. Y., Peter H. y Arvan P. (2007) Dominant-Negative Behavior of Mammalian Vps35 in Yeast Requires a Conserved PRLYL Motif Involved in Retromer Assembly. *Traffic*. 8(12): 1829-1840.