

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

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

“Análisis de la interacción del complejo EhCPADH de *E. histolytica* con las uniones adherentes y los desmosomas”

Tesis que presenta

Q.B.P. ELIZABETH HERNANDEZ NAVA

**Para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Infectómica y
Patogénesis Molecular**

Directoras de tesis:

Dra. Abigail Betanzos Fernández

Dra. María Esther Orozco Orozco

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), en el laboratorio 2 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN bajo la dirección de la Dra. Abigail Betanzos Fernández y la Dra. Ma. Esther Orozco Orozco.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Esther Orozco** por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por la confianza depositada en mí para realizar este proyecto, por los consejos y las enseñanzas.

A la **Dra. Abigail Betanzos** por darme la confianza de trabajar con usted, por los consejos, el apoyo y la disponibilidad brindados a lo largo de todo el proyecto.

Al **Dr. Porfirio Nava** por el apoyo, las sugerencias y el material brindado para la realización de este trabajo.

A la **Dra. Rosa María del Ángel** por las sugerencias y observaciones para el proyecto.

Al **Dr. Mario Alberto Rodríguez** por las observaciones acertadas hacia el proyecto.

A la **Dra. Guillermina García** y al **Q.B.P. Tomas Sánchez** por el apoyo, la disponibilidad y la enseñanza.

Al **Q.B.P. Alfredo Toledo** por el apoyo, las observaciones y las enseñanzas.

A **Alejandrina Reyes** por el apoyo técnico para la realización de este trabajo.

A **Roció Guerrero** por el apoyo secretarial que desempeña.

A mis compañeros del laboratorio 2: al M. en C. Jonatán Pais, a la M. en C. Jeni Bolaños, a la M. en C. Jessica Borbolla, a la Dra. Rosario Javier, a la M. en C. Patricia Cuellar, a la M. en C. Yunuen Avalos, al M. en C. Ravi Kumar, a la M. en C. Wendy Fonseca y a la M. en C. Maricela Montaña.

Gracias a todos por la enseñanza que me deja cada uno de ustedes, pero sobre todo gracias por su amistad.

Eli Hdez

DEDICATORIAS

A DIOS

Por permitirme formar parte de este gran universo

A MI FAMILIA

Toño y **Robe** por apoyarme en este gran sueño, porque con ustedes supe que nunca vuelve aquello que se pierde, que la marea sube y luego baja, que no hay que confundir valor y precio y que un manjar puede ser cualquier bocado. Gracias por esos buenos consejos que me hicieron llegar hasta donde estoy, pero sobre todo gracias por el amor que me tienen, los amo.

Toño y **Carlitos** gracias por su apoyo, confianza y consejos pero sobre todo gracias por contagiarme de alegría en momentos difíciles, mis cómplices, mis hermanos, mis amigos, los amo.

A BELEN

Porque fuiste y sigues siendo mi inspiración, gracias por ser una de las primeras personas que confiaron en mí y por tus enseñanzas que nunca olvidaré. Te amo.

ALFREDO

Gracias por la fe que no tengo y que tú me regalas y con eso hacer que me sienta capaz de transformar cualquier mundo o cualquier universo, gracias por tus consejos, por tus enseñanzas, regaños, tu paciencia, pero sobre todo gracias por formar parte de mi vida.

A MIS AMIGOS

Jeni, Naomi, Geovanni, Jonatán, Jessy, Nurith, Mane, Clemencia, que de alguna manera estuvieron conmigo, a lo largo de este trabajo. Los quiero.

Eli Hdez

ÍNDICE**PÁGINAS**

ABREVIATURAS	1
I. ABSTRACT	2
II. RESUMEN	3
III. INTRODUCCIÓN	4
1. EPIDEMIOLOGÍA	4
2. AMIBIASIS	5
3. CICLO DE VIDA	5
4. MORFOLOGIA DEL PARASITO	7
5. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD	9
6. COMPLEJO EhCPADH	10
7. MECANISMOS DE ENTRADA DE LOS PATÓGENOS HACIA EL EPITELIO	13
8. ALTERACION DE LA UE POR <i>E. histolytica</i>	15
9. COMPLEJO DE UNIÓN INTERCELULAR (CUI)	19
UNIONES ESTRECHAS	19
UNIONES ADHERENTES	21
DESMOSOMAS	24
UNIONES COMUNICANTES	26
IV. JUSTIFICACIÓN	27
V. HIPOTESIS	28
VI. OBJETIVOS	28
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	29
VIII. RESULTADOS	35
IX. DISCUSIÓN	74
X. CONCLUSIONES	80

XI. PERSPECTIVAS	81
XII. REFERENCIAS	82

ABREVIATURAS

AHA	Absceso Hepático Amibiano
CK18	Citoqueratina 18
CUI	Complejo de unión intercelular
Dsp	Desmplaquina
E-cad	E-cadherina
EhADH	Adhesina 112 de <i>Entamoeba histolytica</i>
EhCP	Cistein proteasa 112 de <i>Entamoeba histolytica</i>
ET	Extracto total
ET	Extractos totales
FITC	Isotiocianato de fluoresceina
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer de fosfatos
PGE2	Prostaglandina E2
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonio
PS	Productos de secreción
PS	Productos de secreción
RET	Resistencia eléctrica transepitelial
TC	Trofozoíto completo
TC	Trofozito completo
TRITC	Isotiocianato de tetrametil rodamina
UA	Unión adherente
UE	Unión estrecha

I. ABSTRACT

For several years we have studied the initial interaction of *Entamoeba histolytica* with epithelium, however little is known about the molecular events that mediate this process. It has been proposed that some molecules of this parasite could use intercellular junctions as a gateway for its invasion into the epithelium. In our group, demonstrated that at early contact (2 min) between the trophozoites and epithelial cells, tight junctions (TJ) are altered, their function and components. In this damage participates amoebic complex EhCPADH. This complex consists of the adhesin EhADH and the cysteine protease EhCP, and it is involved in several pathogenic events. However, the effect of *E. histolytica* in adherens junctions (AJ) and desmosomes is still unknown. Therefore, in this project, we used specific markers of both, desmosomes (Dsp and CK18) and AJ (E-cadherin and β -catenin), to analyze the effect of *E. histolytica* in MDCK cells. We observed that live trophozoites (TC) and protein lysates (TE) are able to degrade proteins presents in AJ and desmosomes, in a time dependent manner. By immunofluorescence assays, we observed that EhCPADH is located at AJ and desmosomes since early times of interaction (mostly at 10 min). Moreover, EhCPADH associated with β -catenin, CK18 and Dsp. Surprisingly, the molecules secreted into the medium by the trophozoites, where EhCPADH is present, were unable to affect these junctions, although those preserve their proteolytic activity. Our results suggest that EhCPADH penetrates into the epithelium through the paracellular route, initially altering TJ and, subsequently affecting the AJ and desmosomes.

II. RESUMEN

Por varios años se ha estudiado la interacción inicial de *Entamoeba histolytica* con el epitelio, sin embargo, poco se sabe de los eventos moleculares que median este proceso. Se ha propuesto que algunas moléculas de este parásito podrían utilizar a las uniones intercelulares como vía de entrada para su invasión hacia el epitelio. En nuestro laboratorio se ha demostrado que en etapas tempranas del contacto (2 min) entre los trofozoítos y las células epiteliales, se ven alteradas las uniones estrechas, su función y sus componentes. En este daño participa el complejo amibiano EhCPADH. Este complejo está formado por la adhesina EhADH y la cisteína proteasa EhCP, las cuáles participan en varios eventos patogénicos de esta amiba. Sin embargo, se desconoce el efecto de *E. histolytica* en las uniones adherentes (UA) y en los desmosomas del epitelio. Por lo tanto, en este proyecto utilizamos marcadores específicos tanto de los desmosomas (Dsp y CK18), como de las UA (E-cadherina y β -catenina) y, observamos que los trofozoítos vivos (TC) y sus lisados proteicos (ET), fueron capaces de degradar a las proteínas de estas estructuras, de células epiteliales MDCK de una manera dependiente de tiempo. A través de ensayos de inmunofluorescencia, observamos que el complejo EhCPADH se localizó en este tipo de uniones intercelulares, desde tiempos tempranos de interacción (principalmente a los 10 min). Además el complejo EhCPADH se asoció con los componentes de estas uniones epiteliales, en particular con β -catenina, CK18 y Dsp. Sorprendentemente, los productos secretados al medio por los trofozoítos, entre los cuales se encuentra EhCPADH, no fueron capaces de afectar estas uniones intercelulares, a pesar de que conservan su actividad proteolítica. Nuestros resultados por eso sugieren que EhCPADH penetra al epitelio a través de la ruta paracelular, alterando en primer lugar a la unión estrecha y posteriormente a la UA y a los desmosomas.

III. INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica es una amiba patógena causante de la amibiasis en humanos (Martínez-Palomo A, 1986). La amibiasis desde el siglo XVIII fue reconocida como una de las enfermedades más graves y epidémicas. Hlava (1887), Councilman y Lafleur (1891) demostraron con pruebas clínicas y anatomopatológicas, que la amiba es el agente causal de un tipo específico de disentería y del absceso hepático amibiano (AHA).

Posteriormente, en 1903 el zoólogo alemán Fritz Schaudinn, diferenció entre *Endamoeba histolytica* y *Endamoeba coli*. Schaudinn decidió llamar a la amiba *histolytica* por ser productora de lisis tisular y, fué hasta 1928 que la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica dictaminó que *Entamoeba* fuese sinónimo de *Endamoeba*, por lo que finalmente se le llamó *Entamoeba histolytica* (Panilla *et al.*, 2008).

1. EPIDEMIOLOGÍA

E. histolytica es un parásito cosmopolita, aunque es más frecuente en países en vías de desarrollo y también puede ser encontrado en viajeros que visitaron zonas endémicas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), hay aproximadamente 500 millones de infectados, de los cuales 50 millones desarrollan disentería amibiana, colitis y AHA, resultando en 100 millones de muertes al año y siendo la tercera causa de muerte por enfermedad parasitaria (WHO, 1998). La amibiasis está relacionada con condiciones de higiene inadecuadas, pobreza, desnutrición y hacinamiento. Las regiones tropicales, con climas cálidos y templados son los más afectadas con dicha parasitosis (Alavi, 2007). En México, la amibiasis es una enfermedad endémica y es considerada un grave problema de salud pública, ya que se encuentra entre las primeras diez causas de mortalidad infantil por problemas gastrointestinales (Conde *et al.*, 1992).

2. AMIBIASIS

Además de invadir la mucosa intestinal, *E. histolytica* es capaz de infectar otros órganos (Espinosa *et al.*, 2000). Según el órgano afectado, la amibiasis puede ser intestinal o extraintestinal.

Existen cuatro formas clínicas de amibiasis intestinal: 1) disentería, 2) colitis amibiana, 3) apendicitis amibiana y 4) el ameboma de colon. La disentería representa el 90% de los casos de la amibiasis intestinal invasiva. Los pacientes con disentería tienen de tres a cinco evacuaciones mucosanguinolientas por día, con cólicos moderados. La colitis amibiana se presenta con diarrea mucosanguinolenta, dolor abdominal, fiebre e irritación perianal. La apendicitis amebiana se presenta con reacción inflamatoria y necrosis en el apéndice ileocecal (Martínez-Palomo, 1986). Finalmente, el ameboma de colon resulta de la formación de gránulos en el tejido colónico (Petri *et al.*, 2003).

Por otra parte, la forma extraintestinal de la amibiasis más común es el AHA. Esta forma resulta de la migración de los trofozoítos del colon al hígado, a través de la circulación portal (Espinosa *et al.*, 2000). Los síntomas que se presentan son: fiebre, dolor abdominal, náuseas, vómito, diarrea y estreñimiento; además un signo típico es la hepatomegalia, con hipersensibilidad localizada en el hígado (Petri *et al.*, 2003). El AHA es diez veces más común en adultos que en niños y tres veces más frecuente en hombres que en mujeres (Espinosa *et al.*, 2000).

3. CICLO DE VIDA

La infección se inicia por la ingestión de agua o de alimentos contaminados con quistes de *E. histolytica*. El desenquistamiento ocurre en el lumen del intestino, donde se forman los trofozoítos móviles y potencialmente invasores. Estos pueden seguir cualquiera de las siguientes vías: i) quedarse en el intestino sin producir

daño aparente; ii) invadir la mucosa intestinal y producir síntomas, desde leves hasta disentería; iii) invadir otros órganos por contigüidad o a través de la circulación; iv) salir al ambiente con las heces, para morir inmediatamente debido a su poca resistencia a las condiciones atmosféricas; o bien v) enquistarse en el colon para ser excretados con las heces y repetir el ciclo (Fig. 1) (Espinosa *et al.*, 2000).

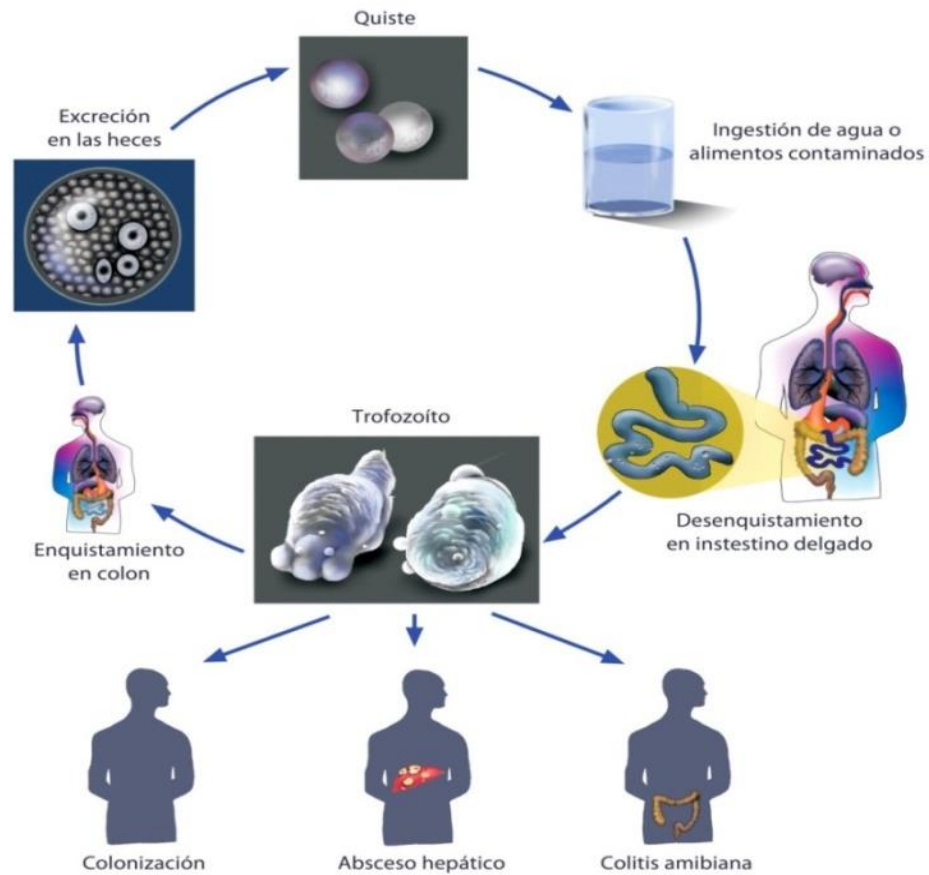


Figura 1. Ciclo biológico de *E. histolytica* (Tomada de Aprendizaje de la Parasitología. Pérez-Tamayo; 2006).

4. MORFOLOGÍA DE *E. histolytica*

Trofozoíto: presenta formas muy distintas y mide entre 10-60 μm de diámetro (Fig. 2). Estas variaciones tan amplias en forma y tamaño dependen, entre otros factores, del grado de actividad del parásito. El citoplasma de los trofozoítos amibianos presenta dos áreas relativamente bien definidas: una porción externa hialina, transparente, sin gránulos, que recibe el nombre de ectoplasma y, una porción interna granular denominada endoplasma, que contiene diversas inclusiones como vacuolas fagocíticas. Adicionalmente los métodos de coloración han evidenciado su núcleo esférico, el cual representa aproximadamente un cuarto de la talla del trofozoíto. El núcleo contiene un cariosoma compacto y pequeño, localizado casi en el centro y su cromatina se halla dispuesta en la periferia, junto a la superficie interna de la membrana nuclear de manera finamente granular (Espinoza *et al*, 2000; Llop *et al.*, 2001; Faust *et al.*, 2012).

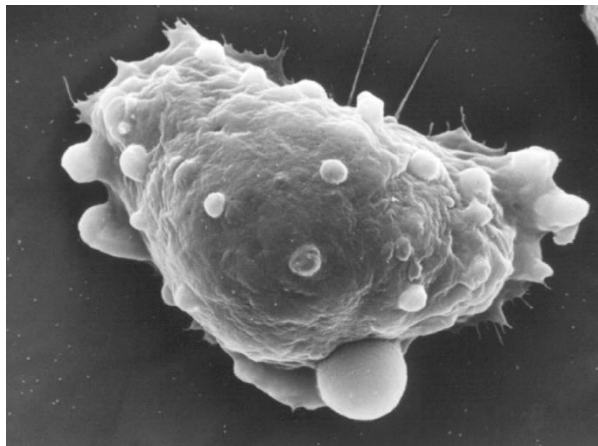


Figura 2. Trofozoíto de *E. histolytica* observado mediante microscopía electrónica de barrido (Tomada de Llop *et al.*, 2001).

Prequiste: esta es una célula inmóvil de forma ovalada o redonda, de 10-20 μm de diámetro, aún sin cubierta quística y con algunas inclusiones citoplasmáticas (Fig. 3). En relación con el trofozoíto, aparecen dos nuevas estructuras en el citoplasma del prequiste: una vacuola de glucógeno, regularmente grande y de

bordes difusos, que aporta los requerimientos energéticos para la maduración del quiste y; unos cuerpos refringentes, de forma cilíndrica y de tipo cristalino, que reciben el nombre de cuerpos cromatoides. El núcleo muestra un tamaño superior y su cariosoma ya no es tan compacto (Llop *et al.*, 2001; Panilla *et al.*; 2008).

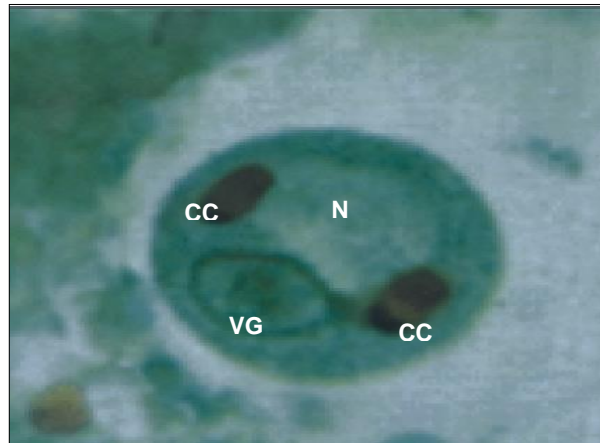


Figura 3. Prequiste de *E. histolytica*. Tinción tricrómica de los prequistes, donde se distingue una vacuola de glucógeno grande (VG) y un poco coloreada, dos cuerpos cromatoides (CC) y un núcleo relativamente grande (N), donde el cariosoma se encuentra difuso (Tomada de Llop *et al.*, 2001).

Quiste: su obtención no ha sido posible mediante cultivo *in vitro*; por este motivo, la información que se tiene sobre esta estructura es escasa, en comparación con la existente para los trofozoítos. En general, tanto los quistes como los prequistes que los preceden, son células inmóviles, de forma ovalada o redonda y miden entre 10-16 μm de diámetro (Fig. 4). El quiste tiene una cubierta quitinosa, es tetranucleado y posee un cariosoma central. Los quistes a diferencia de los trofozoítos, tienen tamaño y formas relativamente uniformes. En los quistes, apenas se pueden observar inclusiones citoplasmáticas; la vacuola de glucógeno, remanente de la etapa anterior, se observa en los quistes inmaduros y prácticamente no existe en los quistes maduros. Se conservan los cuerpos cromatoides, surgidos en la fase anterior y, dependiendo del grado de maduración

del quiste, éste contiene de uno a cuatro núcleos, con las características ya descritas para el trofozoíto (Faust *et al.*, 2012).

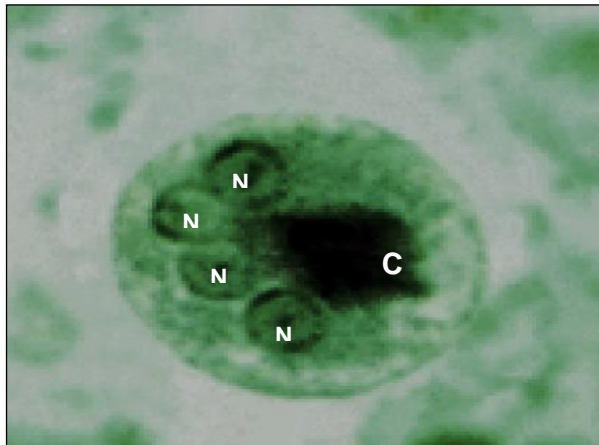


Figura 4. Quiste de *E. histolytica*. Tinción tricrómica de los quistes, donde se muestran los cuatro núcleos (N) característicos de los quistes maduros de estas especies y un cuerpo cromatoidal (CC) grande (Tomada de Llop *et al.*, 2001).

5. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

La adhesión, fagocitosis y actividad proteolítica son eventos clave en la destrucción de la célula blanco por *E. histolytica* (Ravdin *et al.*, 1980).

Adhesión. El primer paso de la invasión intestinal por los trofozoítos es el contacto y la adherencia a las células del hospedero. Esto involucra moléculas de superficie del parásito llamadas adhesinas y sus receptores presentes en las células blanco. Se han reportado varias proteínas de *E. histolytica* involucradas en el contacto con las células blanco, entre ellas se encuentran: la lectina Gal/GalNac de 260 kDa (Petri *et al.*, 1995), el complejo EhCPADH de 124 kDa (Garcia-Rivera *et al.*, 1999), la proteína de superficie celular de 220 kDa (Rosales-Encina *et al.*, 1987) y la proteína rica en serina (SREHP) de 52 kDa (Stanley *et al.*, 1990).

Citólisis dependiente de contacto. Cuando *E. histolytica* establece contacto con las células blanco, ocurre la citólisis. Dicho mecanismo está mediado principalmente por dos proteínas, las cisteínas proteasas (CP) y los péptidos formadores de poros, llamados ameboporos. Las CP son proteínas que se

secretan al medio y que son, críticas para la invasión del tejido por su capacidad para degradar proteínas de la célula blanco y componentes de la matriz extracelular como: colágena, elastina, fibrinógeno y laminina (Ravdin *et al.*, 1982). En tanto que los ameboporos están compuestos por una pequeña proteína que forma canales iónicos entre los fosfolípidos de la membrana celular del huésped. Diversos estudios *in vitro* han demostrado la actividad citotóxica de estos ameboporos en diferentes líneas celulares humanas y bacterias. Además, se ha señalado que los microfilamentos y el flujo transmembranal de calcio, son necesarios para que los trofozoítos puedan lisar la célula huésped (Ramos *et al.*, 2005).

Fagocitosis: puede ser de dos tipos, 1) no específica, donde el contacto inicial es mediado por fuerzas electrostáticas y por medio del cual los trofozoítos ingieren partículas como almidón, látex, hierro etc; 2) o altamente específica en donde intervienen moléculas de superficie llamadas adhesinas, que participan en el reconocimiento de la célula blanco (Martinez-Palomo, 1986). La fagocitosis va acompañada por la formación de un fagolisosoma, dirigido por GTPasas y proteínas Rab, que actúan como moduladores en la regulación de la fusión vesicular con las membranas de la célula blanco (Ravdin *et al.*, 1980; Faust *et al.*, 2012). La típica ingestión de glóbulos rojos es llamada eritrofagocitosis. La especificidad de este mecanismo se ha comprobado en diversas ocasiones, con trofozoítos que fagocitan eritrocitos de diferentes especies (Ravdin *et al.*, 1980).

6. COMPLEJO EhCPADH

La participación de diversas moléculas en la patogenicidad de *E. histolytica*, condujo a la caracterización de nuevas moléculas involucradas en este proceso. Arroyo y Orozco en 1987 utilizaron como herramienta anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas de adhesión y los probaron en clonas patogénicas y en clonas deficientes en adhesión, lo que les permitió detectar una molécula a la que originalmente denominaron adhesina de 112 kDa (Arroyo *et al.*, 1987).

Posteriormente, Rodríguez y colaboradores en 1989 generaron anticuerpos en conejo y ratón capaces de detectar a la molécula de 112 kDa y, adicionalmente a dos proteínas de 50 y 70 kDa. Mediante ensayos de purificación se determinó que la adhesina de 112 kDa es degradada, para dar lugar a proteínas de 50-56 kDa y 70-72 kDa (Rodríguez *et al*, 1989).

Estudios posteriores, realizados por García-Rivera y colaboradores en 1999, utilizando ensayos de inmunofluorescencia y microscopia electrónica, demostraron que la molécula de 112 kDa, se localiza en la membrana plasmática de los trofozoitos y en vesículas internas. Además, estos autores demostraron su participación en los eventos de adhesión, eritrofagocitosis y citólisis celular. De manera importante también documentaron que la adhesina de 112 kDa, en realidad es un complejo proteico de 124 kDa, codificado por 2 genes adyacentes separados por 188 pb, los cuales se asocian una vez sintetizados como péptidos (García-Rivera *et al.*, 1999). Por lo tanto, este complejo fue nombrado como EhCPADH, ya que está formado por una cisteína proteasa (CP) y una adhesina (ADH). Estudios recientes donde se inmunizaron hámsteres con el DNA que codifica para cada uno de sus componentes o con sus proteínas recombinantes, encontraron una respuesta inmune en contra de estas proteínas. Sugiriendo que ambas proteínas son buenos candidatos para el desarrollo de vacunas contra la amibiasis (Martínez-López *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2009).

Adhesina 112. El gen de la adhesina está constituido por 2061 pb y codifica para una proteína de 687 aa. Esta adhesina contiene tres segmentos transmembranales (aa 114-130, 176-195 y 224-247), cuatro posibles sitios de glicosilación (aa 352, 369, 562 y 600) y un dominio de adhesión celular (aa 444-601), localizado en el extremo carboxilo terminal. Este último dominio es reconocido por los anticuerpos monoclonales, los cuales inhiben la adherencia de los trofozoitos a las células blanco (Fig. 5) (García-Rivera *et al.*, 1999).

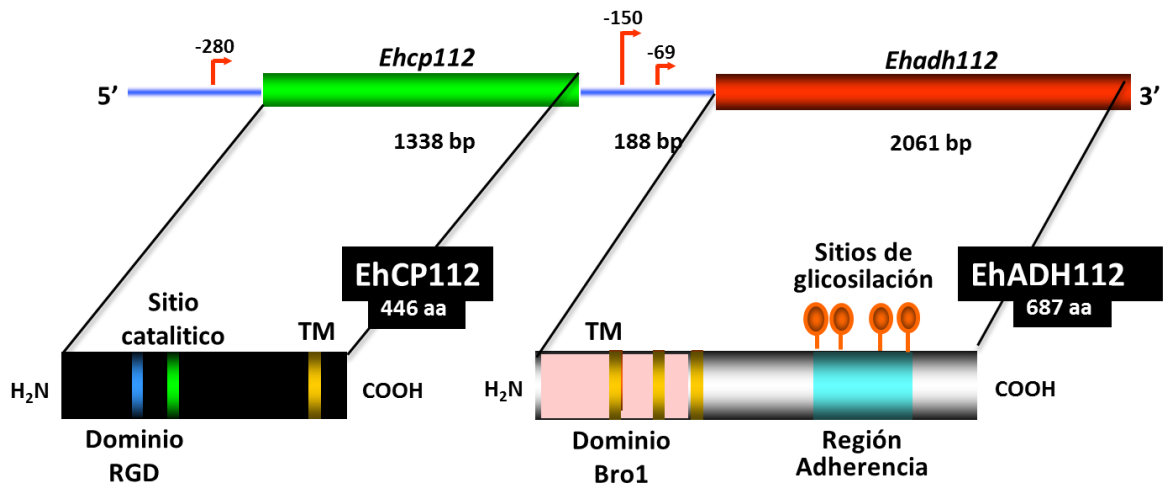


Figura 5. Esquema del complejo EhCPADH. Se muestran los genes que codifican a este complejo y la estructura de las proteínas EhCP y EhADH, con sus respectivos dominios proteicos (García-Rivera *et al.*, 1999; Rodríguez., 2000; Bañuelos *et al.*, 2012).

Análisis bioinformáticos revelaron que la proteína EhADH contiene un dominio Bro1 en su extremo amino terminal y una estructura similar a los miembros de la familia ALIX. Esta familia es altamente conservada en la escala evolutiva y sus miembros participan en diversos procesos, entre ellos: la adhesión celular mediada por integrinas, el remodelamiento del citoesqueleto y la clasificación de proteínas endosomales. Además la EhADH presenta sitios de fosforilación, que junto con el dominio Bro1 sugieren que esta proteína podría jugar un papel importante en la transducción de señales (Bañuelos *et al.*, 2005).

Adicionalmente, se ha reportado en el genoma de *E. histolytica* otras proteínas semejantes a la EhADH, las cuales se denominaron EhADH-like y también poseen el dominio Bro1. Sin embargo, aún no se ha caracterizado su función. Cabe destacar que los anticuerpos específicos contra la proteína EhADH no cruzan con las proteínas EhADH-like (Bañuelos *et al.*, 2005).

Cisteína proteasa 112: El gen de la proteasa está constituido por 1338 pb y codifica para una proteína de 446 aa. Esta enzima es del tipo de las papaínas y contiene un dominio transmembranal en los residuos 395-416 aa, un motivo ERNIN, característico de los propéptidos de las catepsinas tipo H o L y, una secuencia RGD, la cual ayuda en la interacción con las integrinas celulares (Fig. 5) (García-Rivera *et al.*, 1999). La forma madura muestra una gran actividad proteolítica, incluso autoproteolítica y es capaz de degradar gelatina, colágena tipo 1, fibronectina y hemoglobina, además de destruir monocapas de células epiteliales MDCK. Trofozoítos mutantes, deficientes en virulencia, expresan pobremente a la EhCP y cuando se les transfecta a los trofozoítos, incrementan su virulencia, lo cual apoya la participación de esta molécula en la patogenicidad del parásito (García-Rivera *et al.*, 1999).

7. MECANISMOS DE ENTRADA DE LOS PATOGENOS HACIA EL EPITELIO.

Los epitelios son estructuras altamente organizadas que protegen a los tejidos contra patógenos microbianos. Sin embargo, los patógenos han desarrollado estrategias para interactuar con los epitelios (Cossart *et al.*, 2012); en particular con la primera estructura intercelular denominada unión estrecha (UE). Hasta el momento se conocen 2 mecanismos de alteración de la UE (Fig. 6). En el primero, bacterias como *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) y enteropatogénica (EPEC), *Salmonella*, *Helicobacter pylori* y *Shigella flexneri* utilizan un aparato de liberación semejante a una jeringa llamado sistema de secreción tipo 3 ó tipo 4 (T3SS ó T4SS) para secretar proteínas efectoras (EspF, EspG y Map de *E.coli*; SopB, SopE, SopE2 y SipA de *Salmonella*; y CagA y VacA de *H. pylori*), directamente desde el citosol del parásito hacia el citoplasma de las células hospederas. Una vez en el citoplasma, la señal llega a la UE, provocando: 1) incremento en la permeabilidad paracelular; 2) disociación en la membrana celular de proteínas de la UE como ocludina, ZO-1 y claudinas; 3) alteración de los filamentos que conforman a la UE; y 4) disminución de la expresión de ZO-1 y de la ocludina fosforilada (Guttman *et al.*, 2009).

El otro mecanismo que provoca alteraciones en la UE se da cuando los patógenos utilizan alguna proteína de la UE como receptor. Tal es el caso de la bacteria *Clostridium perfringens*, que a través de una potente enterotoxina se une a la segunda asa extracelular de las claudinas 3 y 4. Por su parte, los *Reovirus* mediante su proteína $\sigma 1$, usan como receptor a las moléculas de adhesión de la unión (JAMs); en tanto que el *Rotavirus*, a través de su proteína espicular VP8, altera la localización de la claudina-3, ZO-1 y ocludina, lo que conduce a la desorganización de la UE y bloquea su formación. Los *Adenovirus 2* y *5* mediante su proteína fibra, usan como receptor el dominio 1 de la proteína receptora a los virus *Coxsackie* y *Adenovirus* (CAR), para su internalización y para romper la barrera epitelial durante su escape de la célula. El virus *Coxsackie* también utiliza como receptor a la proteína CAR (Guttman *et al.*, 2009).

Otros patógenos como *Giardia lamblia* afectan el epitelio intestinal, desacoplando a la UE, produciendo una mala absorción y secretando electrolitos, lo que finalmente concluye con una acumulación de fluido luminal (Guttman *et al.*, 2009)

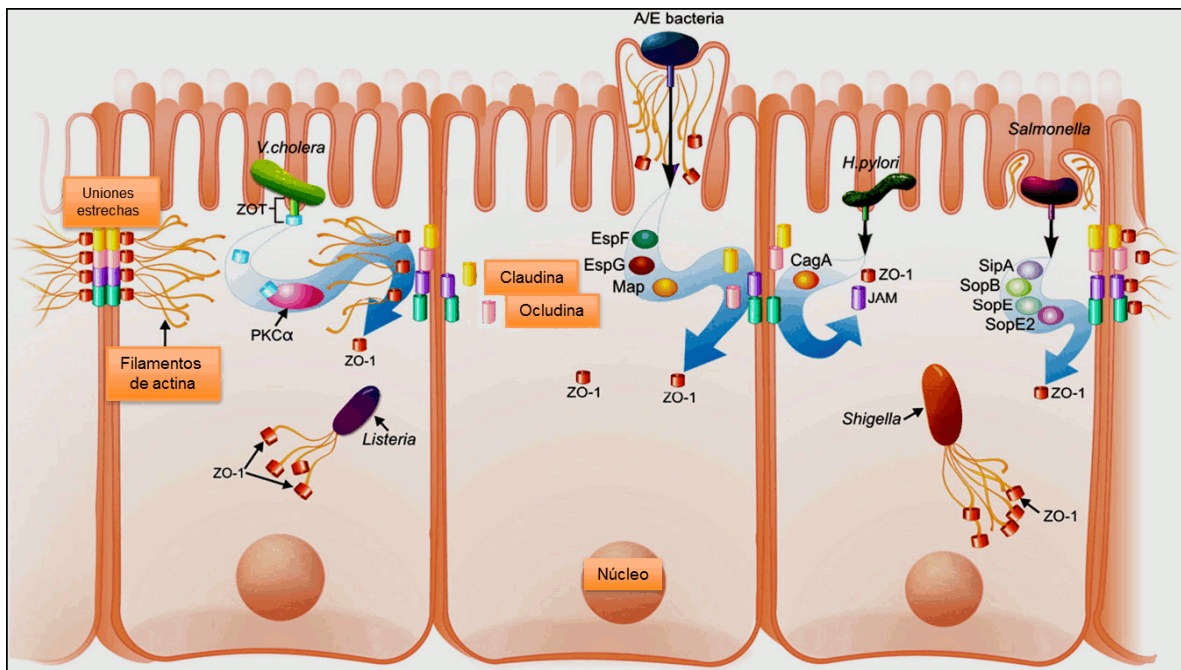


Figura 6. Mecanismos de entrada de diferentes patógenos (Tomada de Guttman *et al.*, 2009).

8. ALTERACION DE LA UE POR *E. histolytica*.

E. histolytica, además de los cambios morfológicos producidos en el epitelio intestinal y que fueron descritos anteriormente, también afecta directamente la función de barrera. Trabajos pioneros donde trofozoítos amibianos fueron co-cultivados con células epiteliales, demostraron una rápida disminución de la RET (Resistencia Eléctrica Transepitelial) (Leroy *et al.*, 2000), que se asoció con un incremento en la permeabilidad paracelular y cambios moleculares en la UE. Se observó degradación de ZO-1, desfosforilación de ZO-2 y disociación entre ZO-1 y ZO-2 (Leroy *et al.*, 2000).

También se ha encontrado que *E. histolytica* produce y secreta una molécula inflamatoria, conocida como prostaglandina E2 (PGE2), la cual es un mediador lipídico asociado con enfermedades diarreicas. Esta molécula disminuye la integridad de la barrera paracelular, de manera dependiente de tiempo. Esto se evidenció con un aumento en la permeabilidad de iones a través de la UE y una disminución de la RET. Además, estudios de microscopía confocal revelaron una alteración significativa en la proteína claudina-4 de la UE (Lejeune *et al.*, 2011).

En otros estudios, donde investigaron el papel de la mucina 2, una proteína importante en la capa de moco epitelial, demostraron que la infección por *E. histolytica* regula diferencialmente a las proteínas de la UE. Estos autores observaron una disminución en la expresión de ocludina y ZO-1, en tanto que la claudina-2 aumentó su expresión. Estas alteraciones condujeron a un incremento en la permeabilidad de la barrera intestinal y a la penetración de *E. histolytica* a través de la vía paracelular (Kissoon-Singh *et al.*, 2013).

En nuestro laboratorio evaluamos la apertura de la barrera epitelial, usando trofozoítos vivos, sus lisados proteicos o las moléculas secretadas al medio, donde se ha descrito la presencia de factores importantes en la virulencia. En cualquiera de las condiciones utilizadas, *E. histolytica* disminuye la RET de las células epiteliales, en comparación con las células sin tratamiento (Betanzos *et al.*, 2013). Esta caída de la barrera epitelial es dependiente del tiempo de interacción

entre la célula epitelial y el parásito (Fig. 7A). En este proceso participa el complejo EhCPADH, ya que cuando se utiliza un anticuerpo específico contra esta proteína, se evita la caída de la RET (Fig. 7B).

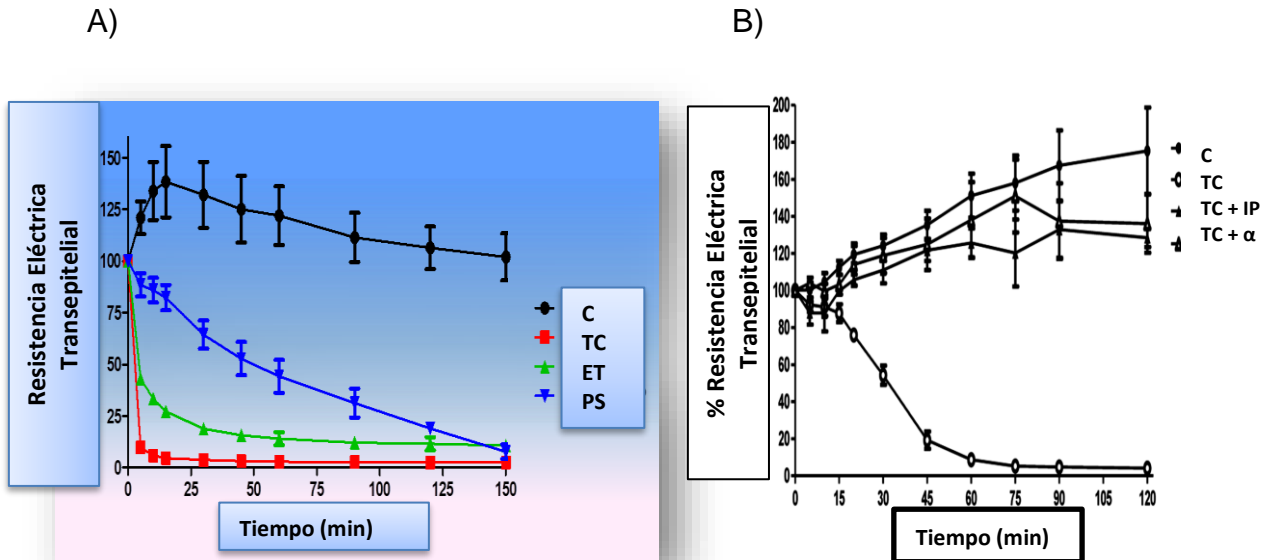


Figura 7. Caída de la barrera epitelial por *E. histolytica*. **A)** Células MDCK fueron incubadas con diferentes condiciones de *E. histolytica*: trofozoito completo (TC), extracto total (ET) y productos de secreción (PS). **B)** Células Caco-2 fueron incubadas con TC, TC + inhibidores de proteasas (IP) y TC+IP+ anticuerpo α -EhCPADH (α). Durante 2.5 h la RET de las células epiteliales fue evaluada. C: MDCK o Caco-2 sin incubación con *E. histolytica*. Los valores de RET fueron normalizados con respecto al valor inicial (Tomado de Betanzos *et al.*, 2013).

EhCPADH se localiza en los bordes de las células epiteliales MDCK tratadas con las diferentes condiciones de *E. histolytica* (Fig. 8). Adicionalmente tanto la adhesina EhADH (Fig. 9), como la proteasa EhCP (Fig.10) co-localizan con la proteína de la UE ocludina, en la membrana plasmática. De manera interesante, la EhCP no solo se ubica en la UE, sino también se localiza a lo largo de la membrana lateral, donde se encuentran otros componentes del complejo de unión intercelular (CUI).

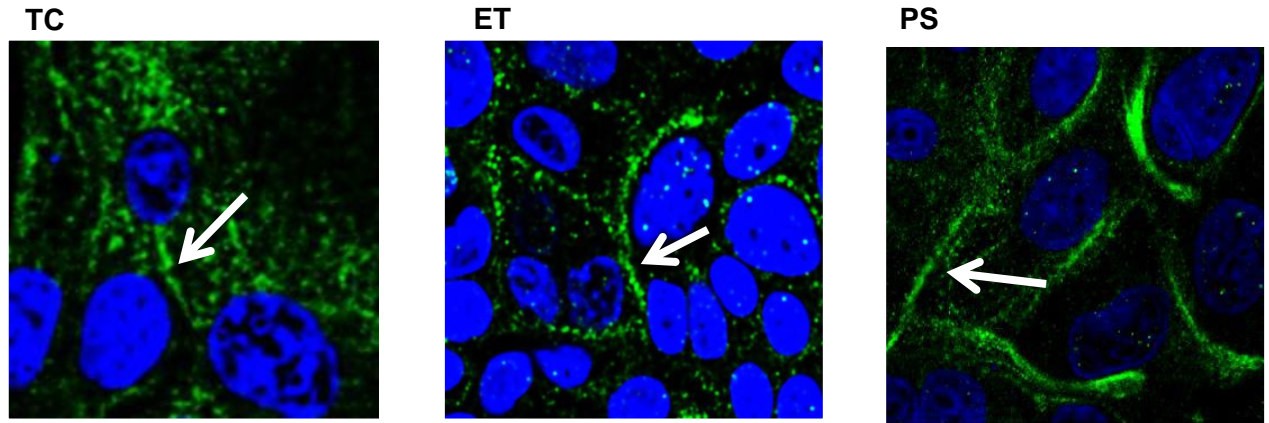


Figura 8. EhCPADH se localiza en los bordes celulares de MDCK incubadas con *E. histolytica*. Células epiteliales fueron incubadas por 2 min con trofozoítos completos (TC), extractos totales (ET) y productos de secreción (PS). Posteriormente se localizó complejo EhCPADH mediante un anticuerpo específico (tinción en verde). Los núcleos en azul fueron teñidos con DAPI. Las flechas indican la localización de la proteína en la membrana celular (Tomada de Betanzos *et al.*, 2013).

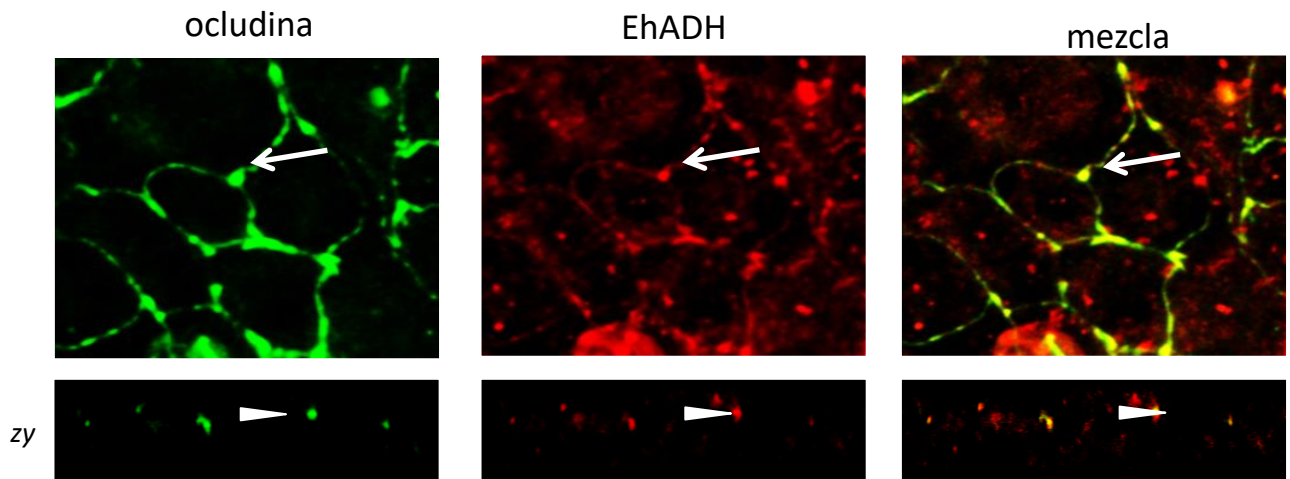


Figura 9. Localización de EhADH en las UE. Células MDCK fueron incubadas por 2 min con extractos de trofozoítos y después de exhaustivos lavados para remover las moléculas ambientales no unidas, se usaron anticuerpos específicos contra las proteínas EhADH (tinción verde) y ocludina (tinción roja). También se muestra la combinación de ambas tinciones (mezcla) y los cortes laterales (plano zy) donde se aprecia la co-localización de las proteínas en la UE (cabezas de flecha). Las flechas indican la localización de las proteínas en la membrana celular (Tomada de Betanzos *et al.*, 2013).

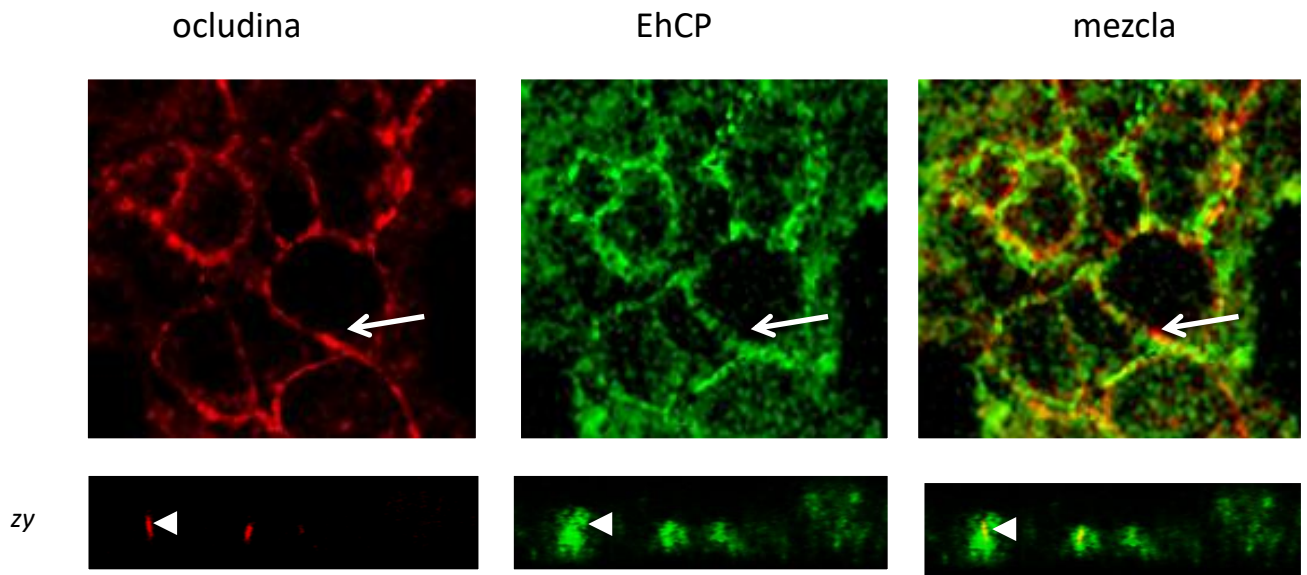


Figura 10. Localización de EhCP en las UE. Células MDCK fueron incubadas por 2 min con extractos de trofozoítos y después de exhaustivos lavados para remover las moléculas amibianas no unidas, se usaron anticuerpos específicos contra las proteínas EhCP (tinción verde) y ocludina (tinción roja). También se muestra la combinación de ambas tinciones (mezcla) y los cortes laterales (plano zy) donde se aprecia la co-localización de las proteínas en la UE (cabeceras de flecha). Las flechas indican la localización de las proteínas en la membrana celular. (Tomada de Betanzos *et al.*,

En este estudio, también se demostró asociación de EhCPADH con las proteínas de la UE, ocludina, claudina 1, ZO-1 y ZO-2. Estos resultados sugieren que a tiempos tempranos, el complejo EhCPADH interacciona principalmente con la UE de las células epiteliales, pero posteriormente cuando la invasión progresa *E. histolytica* puede afectar otras estructuras del CUI.

9. COMPLEJO DE UNION INTERCELULAR (CUI)

Las uniones celulares especializadas se producen en puntos de contacto célula-célula y célula-matriz en todos los tejidos y son relativamente abundantes en los epitelios y endotelios. Las uniones intercelulares, también llamadas CUI, se pueden clasificar en tres grupos funcionales: las uniones ocluyentes, las uniones de anclaje y las uniones comunicantes. Entre las primeras destacan las UE y las uniones adherentes (UA); mientras que las uniones de anclaje incluyen a los desmosomas (Fig. 11).

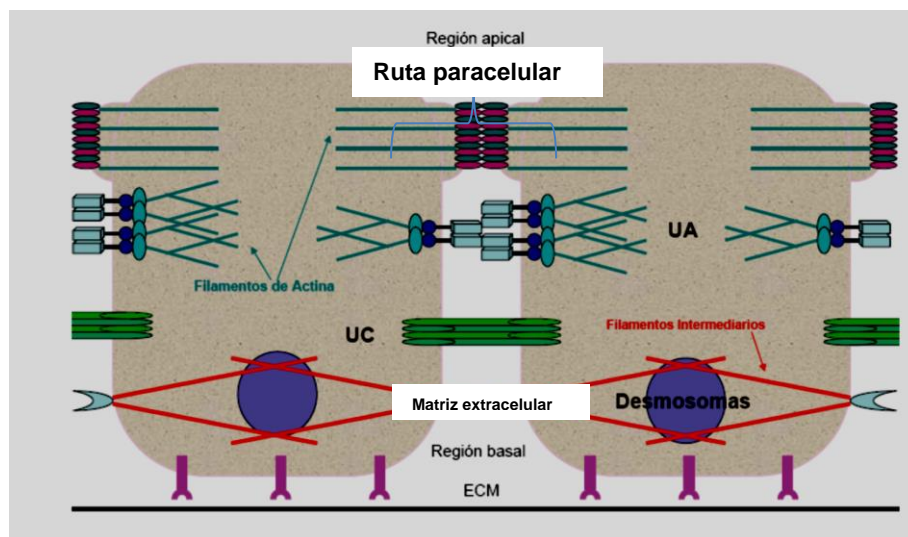


Figura 11. Estructura del CUI (Tomado de Zavala *et al.*, 2010).

Uniones estrechas (UE): se localizan en la parte más apical de la membrana lateral (Cerejido *et al.*, 1981). Son barreras que evitan la difusión de proteínas y lípidos en el plano de la membrana, entre los dominios apical y basolateral; además de servir como compuertas selectivas al paso de iones y moléculas a través de la ruta paracelular (Cerejido *et al.*, 1981).

La organización molecular de las UE está conformada por más de 40 proteínas entre las que se encuentran (Fig. 12):

1) Proteínas transmembranales: como las claudinas, ocludina, tricelulina, las JAMs y las CAR, entre otras. Estas proteínas interactúan con otras proteínas de la misma familia, presentes en la membrana de la célula adyacente, formando canales paracelulares (Zavala *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2012).

2) Proteínas citosólicas: que pueden servir como proteínas estructurales o de anclaje, como las ZOs (por su nombre en latín “zonula occludens”) cingulina, MUPP1 (proteína 1 de múltiples dominios PDZ) y AF-6 (Afadina 6), entre otras. Estas proteínas conectan a las proteínas transmembranales con el citoesqueleto de actina (Zavala *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2012).

3) Proteínas de regulación del tráfico vesicular: por ejemplo, las GTPasas de direccionamiento llamadas Rab, están implicadas en la regulación del anclaje inicial de las vesículas a la membrana de la UE. En tanto que las proteínas SNARE juegan un importante papel en este direccionamiento, ya que aportan la especificidad de reconocimiento y catalizan la fusión de la vesícula con la membrana (Zavala *et al.*, 2010).

4) Proteínas de unión al citoesqueleto de actina: el citoesqueleto de actina es muy importante en la estabilidad de la UE. Sin embargo, las proteínas de unión a actina como la timosina y la profilina, también son relevantes en la UE, ya que contribuyen a la polimerización y despolimerización de la actina, a su estabilidad, su organización en haces o redes, su fragmentación e intervienen en su destrucción (Zavala *et al.*, 2010).

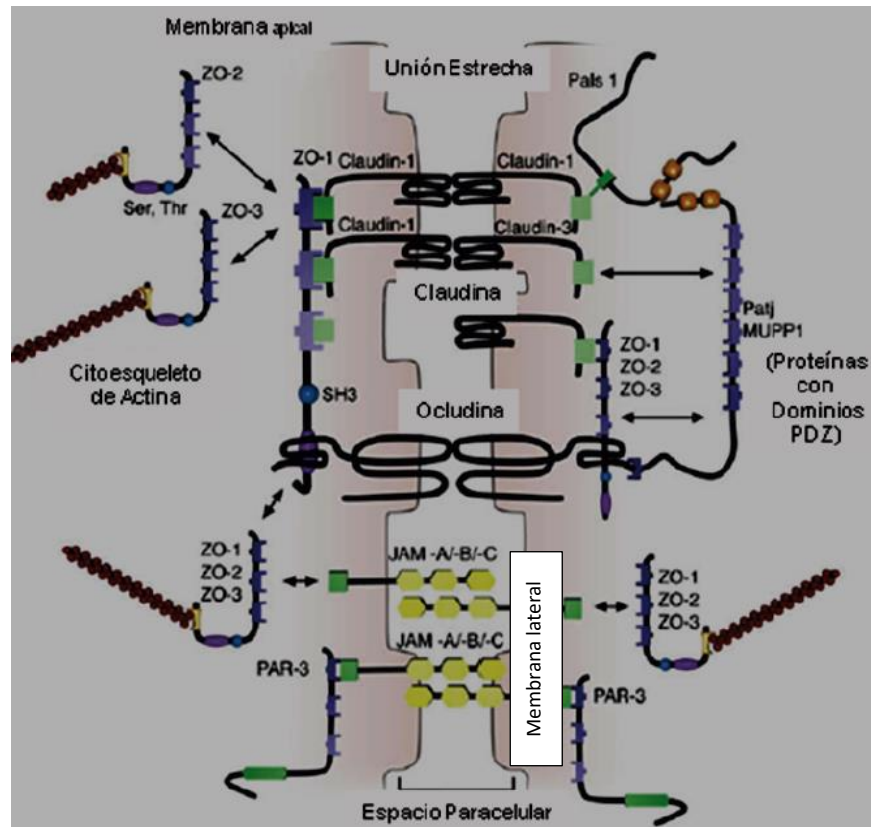


Figura 12. Estructura de la UE y algunas de las proteínas presentes en esta región (Tomado de Zavala *et al.*, 2010).

Uniones adherentes (UA): forman un cinturón adhesivo continuo justo por debajo de la UE, rodeando cada una de las células y a lo largo de la membrana lateral. Este tipo de uniones están constituidas principalmente por glicoproteínas transmembranales de la familia de las cadherinas, cuyo dominio citoplasmático se asocia a proteínas intracelulares como las cateninas, las cuales se unen al citoesqueleto de actina (Fig. 13). A través de su dominio citoplasmático, las E-cadherinas se unen a proteínas citoplásmicas que regulan su endocitosis, reciclamiento, degradación y señalización celular. Además, las cadherinas también pueden regular la transcripción de genes y controlar localmente el citoesqueleto de actina (Hartsock *et al.*, 2007). A través de su dominio extracelular, las cadherinas interactúan con otras cadherinas ubicadas en la célula adyacente.

Las cadherinas son consideradas moléculas de adhesión homofílica, aunque se ha reportado que puede realizar uniones promiscuas con otras proteínas (Niessen *et al.*, 2007).

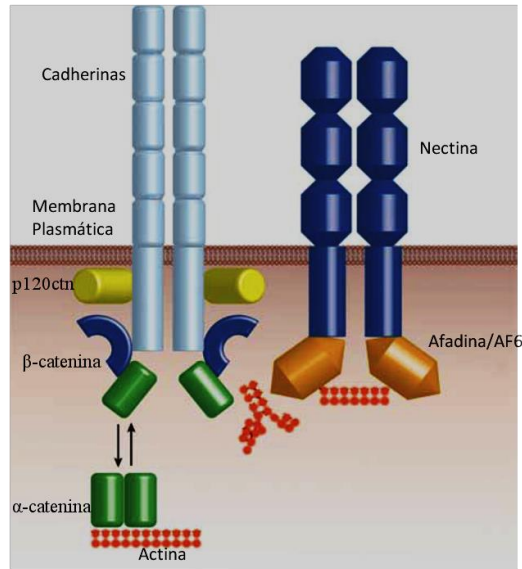


Figura 13. Estructura de la UA (Tomado de Niessen, 2007).

E-cadherina: es una proteína transmembranal de tipo I formada por 833 aa. Esta proteína posee tres regiones (Fig.14): la región extracelular se encuentra formada por cinco dominios (EC1-EC5), de aproximadamente 100 aa cada uno, que participan en la unión intercelular. Estos dominios requieren la presencia del ion calcio para ser funcionales. Además, la unión del calcio a la región extracelular de las cadherinas tiene un efecto de protección contra la degradación por proteasas (Trejo-Cordaba, A, 2008).

Inmediatamente después de la región amino terminal se encuentra la región transmembranal, y en el citoplasma de la célula se ubica la región carboxilo terminal. Esta región conecta a las cadherinas con los filamentos de actina del citoesqueleto a través, de su unión a proteínas de andamiaje (Trejo-Córdova A, 2008).

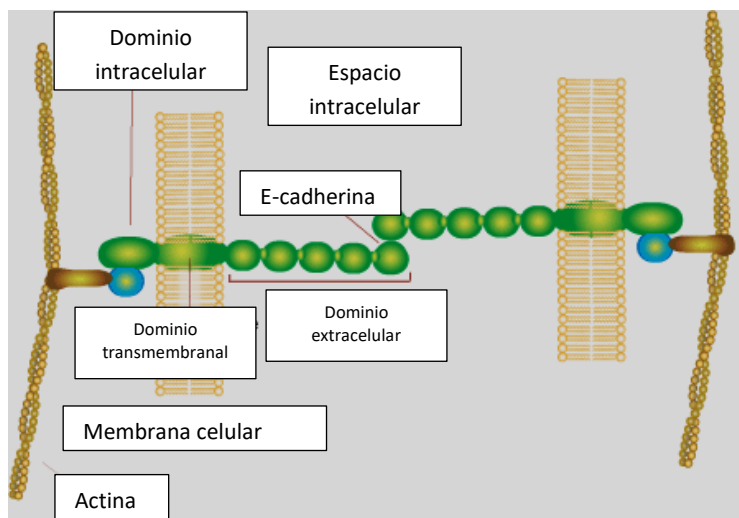


Figura 14. Estructura de la E-cadherina. (Tomado de Trejo Cordaba, 2008).

β -catenina: es una proteína constituida por 781 aa, que forma parte de la superfamilia de proteínas armadillo (ARM). Consiste de tres dominios: el dominio amino terminal, el dominio central y, el dominio carboxilo terminal. El dominio central comprende aproximadamente 42 aa, y forma tres hélices de forma triangular con carga positiva, lo que hace que la β -catenina, solo interaccione con algunas moléculas, como la E-cadherina (Valenta *et al.*, 2012).

La principal localización de la β -catenina es en el citoplasma, formando parte de las UA, donde se encuentra interaccionando con el dominio citoplasmático de las cadherinas (Valenta *et al.*, 2012).

β -catenina tiene un papel adicional en la célula, ya que es un componente clave de la vía WNT. En condiciones normales, en ausencia del ligando para esta vía, β -catenina forma un complejo con AXIN1, AXIN2, APC y GSK3B, los cuales provocan la ubiquitinación y la posterior degradación de β -catenina vía proteosoma. Por el contrario, cuando se encuentra el ligando de la vía WNT, β -catenina puede translocarse al núcleo y unirse a factores de transcripción de la familia Tcf (factor celular T) y así formar el complejo β -catenina/Tcf, el cual activa genes implicados en proliferación y diferenciación como c-Myc, c-jun y ciclina D1 entre otros. Estos genes son responsables de que células tumorales proliferen o

no sean susceptibles a procesos de diferenciación terminal. Esta acción pleiotrópica de β -catenina ha originado que la interferencia selectiva de su actividad transcripcional, sea considerada como blanco para compuestos con actividad antitumoral (Valenta *et al.*, 2012).

Desmosomas: Son uniones de adhesión intercelulares cruciales para los sistemas multicelulares, ya que proporcionan estabilidad mecánica y median señales de traducción entre células. Debido a que pueden resistir el estrés mecánico se encuentran principalmente en el músculo cardíaco y en la piel (Frangakis *et al.*; 2008).

Los desmosomas están constituidos por tres distintas familias de proteínas: cadherinas, plaquinas y las proteínas ARM (Fig. 15). Las cadherinas que los forman son las desmocollinas (Dsc) y las desmogleinas (Dsg), las cuales son proteínas transmembranales. Dentro de la familia de las plaquinas se encuentran la desmoplaquina (Dsp), la cual se une a los filamentos intermedios que a su vez están formados por queratinas o desminas (Fig. 15) (Schmidt *et al.*, 2007). Finalmente dentro de ARM se encuentran la placoglobina (Pg) y la placofilina (Pp) que son moléculas de adhesión a Dsp (Garrod *et al.*; 2010).

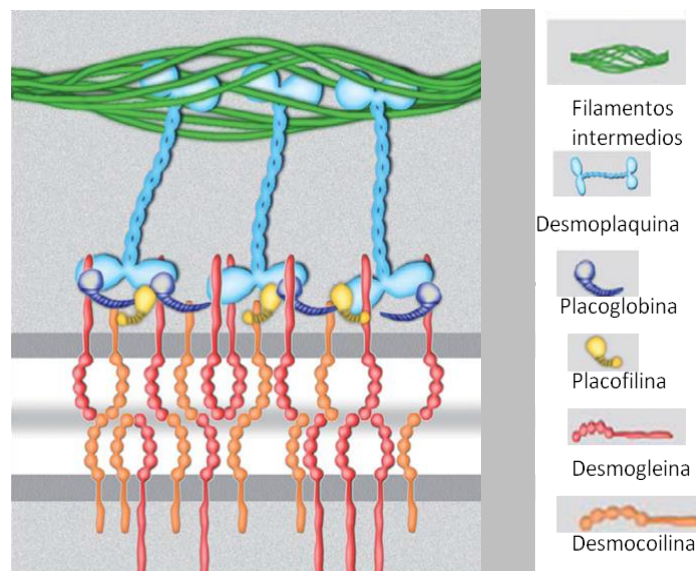


Figura 15. Estructura de los desmosomas (Tomado de Holthöfer *et al.*, 2007).

Desmoplaquina: es una proteína esencial para la adhesión desmosomal ya que sirve de anclaje entre las cadherinas desmosomales y los filamentos intermedios.

Estructuralmente esta proteína se puede dividir en tres regiones: 1) en el extremo amino terminal tiene un dominio plaquina, importante para las interacciones proteína-proteína y que consiste en dos repetidos de espectrina separados por dominios SH3; 2) la región central de la molécula es un dominio Rod, el cual es indispensable para la dimerización de la Dsp y; 3) finalmente, el extremo carboxilo terminal contiene tres repetidos de plaquina denominados A, B y C, la cuales son importantes para la unión a filamentos intermedios (Garrod *et al.*, 2008).

Existen dos isoformas de Dsp (DspI y DspII), su peso molecular es de 250 y 210 kDa respectivamente, las cuales son generadas por procesamiento alternativo y difieren una de la otra solo en el tamaño del dominio Rod (Fig. 16) (Garrod *et al.*, 2008).

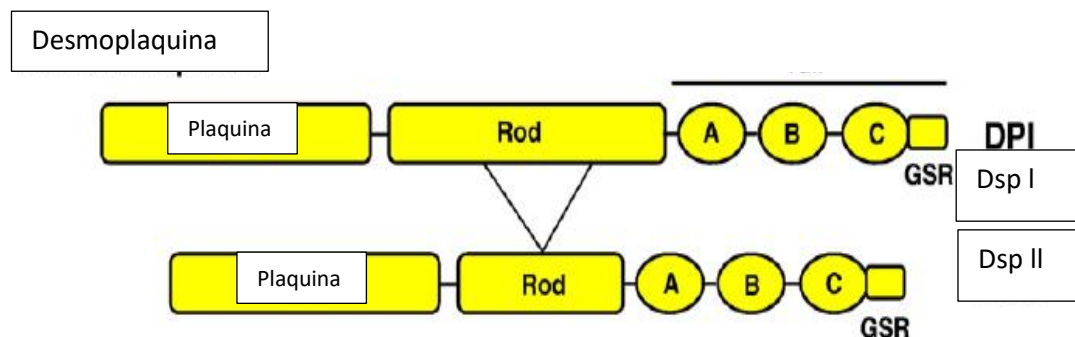


Figura 16. Estructura de la Dsp I y II (Tomado de Holthöfer *et al.*, 2007).

Citoqueratina 18: Los filamentos intermedios consisten en un gran número de proteínas, las cuales están altamente conservadas durante la evolución. Estas

proteínas son conocidas como citoqueratinas y son proteínas estructurales, expresadas de manera diferencial en cada tejido.

La citoqueratina 18 (CK18) forma filamentos intermedios de tipo I, a los cuales se le une la Dsp. Este tipo de citoqueratina se localiza en la membrana plasmática y citoplasmática de la célula y se expresa principalmente en los tejidos epiteliales, como el hígado, el páncreas, el tracto intestinal, etc. (Weng *et al.*, 2012). El peso molecular de esta proteína es de 45 kDa y su estructura se puede dividir en tres regiones: 1) en extremo carboxilo terminal; 2) un dominio central, llamado Rod, formado por los segmentos 1A, 1B, 2A y 2B, los cuales son cruciales para la polimerización; y 3) el extremo amino terminal (Weng *et al.*, 2012).

Además de conferir flexibilidad al interior de la célula, la citoqueratina ayuda a la célula a resistir estrés mecánico y a mantener las estructuras mitocondriales normales. También es importante para la señalización celular, ya que se une con diversas proteínas que participan en señalización (Weng *et al.*, 2012).

Uniones comunicantes (UC): La mayoría de las células en los tejidos animales están en comunicación con sus células vecinas a través de las UC. Cada UC aparece como un hueco en las micrografías electrónicas convencionales o como un parche donde las membranas de las dos células adyacentes están separadas por un espacio uniformemente estrecho de aproximadamente 2-4 nm. El espacio es atravesado por el canal que forman las proteínas transmembranales. Los canales que se forman son llamados conexones y permiten el paso directo de los iones inorgánicos y otras moléculas pequeñas solubles en agua, desde el citoplasma de una célula al citoplasma de la otra, acoplando así las células tanto eléctrica como metabólicamente. La naturaleza de las moléculas que pasan incluye: iones inorgánicos, azúcares, aminoácidos, nucleótidos, vitaminas y segundos mensajeros como Ca^{2+} y AMP; pero no atraviesan macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos (Bruce, 2010).

IV. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad amibiana causada por el parásito *E. histolytica* representa un serio problema de salud pública en países en desarrollo como México. El conocimiento generado sobre su biología y sus mecanismos de patogenicidad, ha servido de manera importante para el desarrollo de estrategias terapéuticas y de diagnóstico. Se sabe que este parásito invade el epitelio intestinal, sin embargo, hasta el momento se desconoce cuáles son los eventos moleculares que ocurren durante la interacción inicial de este parásito con el epitelio. Se ha propuesto que en este proceso participa el complejo EhCPADH y que utiliza las UE como vía de entrada para su invasión hacia el epitelio. Dado que las UA y los desmosomas se encuentran por debajo de la UE cabe especular que estas estructuras también se vean afectadas. Hasta el momento se desconoce si las funciones de las UA y los desmosomas se alteran y si el complejo EhCPADH se asocia con estas estructuras. Los resultados generados con este proyecto nos permitirán conocer posibles receptores epiteliales para este complejo, ubicados en las UA o en los desmosomas.

V. HIPÓTESIS

El complejo EhCPADH se asocia con las UA y los desmosomas, favoreciendo la degradación de sus componentes y facilitando así el proceso invasivo de *E. histolytica* hacia el epitelio.

VI. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la presencia del complejo EhCPADH de *E. histolytica* en las UA y en los desmosomas, así como su asociación con los componentes de estas estructuras epiteliales.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la integridad de las proteínas de la UA y de los desmosomas, en células epiteliales incubadas con *E. histolytica*.
2. Analizar si el complejo EhCPADH se localiza en la UA y/o en los desmosomas, de las células epiteliales incubadas con *E. histolytica*.
3. Identificar las posibles asociaciones de EhCPADH con los componentes de las UA y los desmosomas.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

Cultivo de *E. histolytica*

Trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS de la clona A (Orozco *et al.*, 1983) fueron cultivados axénicamente a 37°C en medio TYI-S-33 y después fueron cosechados en fase de crecimiento logarítmica (Diamond *et al.*, 1978).

Cultivo de células MDCK

Las células MDCK (Madin Darby canine kidney) fueron crecidas en medio DMEM suplementado con 100 i.u./ml de penicilina (In Vitro); 100 mg/ml de estreptomycin (In Vitro), 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 0.08 U/ml de insulina (Eli Lilly), a 37°C y con una atmosfera de 5% de CO₂ (González-Mariscal *et al.*, 1985).

Obtención de extractos proteicos totales (ET)

Los trofozoítos fueron lavados dos veces en PBS a 4°C, posteriormente fueron contados y lisados en ausencia de inhibidores de proteasas. La muestra se congeló en nitrógeno líquido y después se descongeló con vortex-hielo (García-Rivera *et al.*, 1999). Las células MDCK fueron lavadas con PBS y colectadas con un raspador, en presencia del amortiguador de lisis RIPA (Tris-HCl 40mM pH7.6, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, glicerol al 10%, Triton X-100 al 1%, deoxicolato de sodio al 0.5%, SDS al 0.2%, PMSF 1 mM y el cocktail de inhibidores de proteasas "Complete" [Roche]). Después de 20 min de incubación a 4°C, los extractos fueron sonicados tres veces por 30 segundos y centrifugados por 15 min. a 14,000 rpm. Finalmente el sobrenadante fue recuperado. Las proteínas de las muestras fueron cuantificadas por el método de Lowry (Betanzos *et al.*, 2013).

Obtención de los productos de secreción (PS)

Los trofozoítos fueron lavados tres veces con PBS e incubados en PBS a 37°C durante 2 h. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 2,000 rpm por 10 min y el sobrenadante conteniendo los PS fue filtrado a través de una membrana de 0.22 μ m. (Millipore). Para comprobar que las moléculas presentes en el medio pertenecieran a los productos secretados por los trofozoítos y no a restos de trofozoítos muertos, la viabilidad de los trofozoítos fue determinada por el ensayo de azul de tripano, antes y después de la incubación por 2 h (Ocadiz *et al.*, 2005). Los PS utilizados para las interacciones con MDCK, fueron activados con β -mercaptoetanol al 0.02 %.

Interacción entre trofozoítos y células epiteliales

Las monocapas de células epiteliales MDCK fueron incubadas durante diferentes tiempos con trofozoítos en la siguiente proporción: para trofozoíto completo (TC) una proporción 1:1 (1 célula epitelial: por 1 trofozoíto vivo), para ET una proporción 1:2 (1 célula epitelial por el lisado proteico de 2 trofozoítos) y, para PS una proporción 1:10 (1 célula epitelial por los productos secretados por 10 trofozoítos). Después de la interacción, las células epiteliales fueron lavadas 5-10 veces con abundante PBS (Betanzos *et al.*, 2013).

Anticuerpos

Los anticuerpos primarios usados fueron los siguientes: monoclonal de ratón contra EhCPADH ($m\alpha$ -EhCPADH, Arroyo R, Orozco, 1987), policlonal de conejo contra EhCPADH ($p\alpha$ -EhCPADH, Arroyo R, Orozco, 1987) policlonal de conejo contra la Dsp ($p\alpha$ -Dsp; Santa Cruz Biotechnology), monoclonal de anti-E-cadherina ($m\alpha$ -E-cad; Santa Cruz Biotechnology), monoclonal de ratón para la CK18 ($m\alpha$ -CK18; Santa Cruz Biotechnology), monoclonal de ratón contra la β -

catenina (α - β -cat; Santa Cruz Biotechnology) y policlonal de conejo anti-tubulina (α -tub; Santa Cruz Biotechnology).

Como anticuerpos secundarios se usaron anticuerpos acoplados a peroxidasa contra conejo, ratón y rata; así como anticuerpos acoplados a fluorocromos FITC, TRITC y Alexa 568 contra ratón, conejo y rata.

Inmunofluorescencia (IF)

Las células epiteliales fueron crecidas en cubreobjetos y cuando alcanzaron confluencia, se incubaron por 2, 10 y 30 min con TC, ET o PS. Posteriormente, fueron lavadas exhaustivamente con PBS para eliminar los restos ambientales. Las células fueron fijadas y permeabilizadas con etanol al 96 % por 30 min a -20°C ; después fueron bloqueadas con BSA al 0.5% y se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios α -EhCPADH (dilución 1:250), α -Dsp (dilución 1:200), α -ck18 (dilución 1:100), α -E-cad (dilución 1:500), α - β -cat (dilución 1:100), según fuera el caso.

A continuación, las muestras fueron lavadas tres veces con PBS, se colocaron los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a FITC, TRITC o Alexa 568 y se incubaron en oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente. Los núcleos fueron teñidos con DAPI durante 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de tres lavados con PBS, las muestras se montaron en portaobjetos con Vectashield para preservar la fluorescencia. Las preparaciones fueron analizadas por microscopía confocal (Leica TCS_SP5_MO) (Betanzos *et al.*, 2013).

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Células epiteliales MDCK fueron incubadas por diferentes tiempos con ET de *E. histolytica* y después de varios lavados para eliminar las proteínas no adheridas, las células MDCK se empastillaron a 1,500 rpm por 5 min. La pastilla se colocó en el orificio de un anillo plástico de 7 mm de diámetro. Este dispositivo se invirtió sobre un espejo de cobre, pre-enfriado a una temperatura de -197°C y utilizando

un micrótopo Reichert KF 80. La criosustitución se llevó a cabo por 48 h a -80°C en una mezcla de acetona y tetraóxido de osmio al 4%, empleando un sistema Reichert CS automatizado. Después, las muestras se llevaron a temperatura ambiente a razón de $4^{\circ}\text{C}/\text{h}$ y se incluyeron en resina epóxica. Entonces, se realizaron cortes extrafinos que fueron colocados en rejillas de níquel cubiertas con resina de polivinilo (Formvar). Los cortes se incubaron con cloruro de amonio 0.1 M y después de lavados con PBS, se bloquearon con BSA al 1% por 15 min. Las muestras se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos α -EhCPADH y α -Dsp, seguidos por la incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios, acoplados a oro coloidal de 10 y 30 nm, respectivamente. Posteriormente, los cortes se lavaron con agua destilada y se contrastaron con acetato de uranilo y solución de citrato de plomo. Finalmente, las preparaciones se observaron a través de un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011.

Ensayos de Western blot

Las proteínas cuantificadas fueron hervidas durante 5 min con buffer de muestra y posteriormente fueron separadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 6, 8, 10 y 15 %. A continuación, los geles se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas durante 1 h con solución bloqueadora (suero fetal bovino al 2%, albúmina al 1%, tritón X-100 al 0.05%, azida de sodio al 0.02% y leche baja en grasas al 3%). Después, las membranas fueron incubadas toda la noche con los anticuerpos primarios α -Dsp (dilución 1:2,000), α -ck18 (dilución 1:3,000), α -E-cad (dilución 1:5,000), α - β -cat (dilución 1:1,000) o α -tub (dilución 1:3,000) diluidos en solución bloqueadora. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas 5 veces con TBS-T (Tween 20 al 0.05%) durante 10 min y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a peroxidasa, en una dilución de 1:10,000 y diluidos en leche baja en grasa al 5%. Después de lavar 5 veces las membranas con TBS-T, la unión antígeno-anticuerpo fue revelada por quimioluminiscencia utilizando el equipo Microchemist 2.0 ® (Acceso Lab).

Análisis densitométrico

Las bandas proteicas reveladas por quimioluminiscencia se cuantificaron utilizando el programa ImageJ. La abundancia relativa se obtuvo mediante la cuantificación de la banda de interés, entre la medición de la proteína control tubulina. Los datos de cada experimento fueron normalizados utilizando el tiempo cero como 100 %. Los promedios y el error estándar de 3 experimentos independientes se representaron en gráficas de barras.

Ensayos de inmunoprecipitación

Células MDCK fueron incubadas por 30 min con ET, obtenidos en presencia del cocktail de inhibidores de proteasas "Complete". Posteriormente las células fueron lavadas exhaustivamente con PBS y después fueron lisadas con buffer RIPA/HO (1:1 vol/vol; buffer HO: 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EGTA, 1.5 mM MgCl₂, 10% glicerol, 1% Tritón X-100, 1 mM PMSF y el cocktail de inhibidores de proteasas "Complete") durante 15 min a 4°C. La muestra fue clarificada por 3 h con la proteína G-sefarosa (Invitrogen), después se centrifugó a 1,000 rpm y el sobrenadante se incubo toda la noche a 4°C con el anticuerpo p α EhCPADH o con suero preinmune de conejo. Al día siguiente, las muestras fueron mezcladas con la proteína G-Sefarosa por 3 h, y la pastilla se lavó 5 veces con buffer HO centrifugando a 1,000 rpm entre cada lavado. Los inmunoprecipitados fueron hervidos por 5 min con buffer de muestra y se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min. Finalmente, los sobrenadantes fueron analizados por SDS-PAGE y western blot (Betanzos *et al.*, 2013).

Zimogramas

ET (10 y 20 μ g) y PS (10, 20, 30, 40 y 60 μ g) de *E. histolytica*, se analizaron en geles SDS-PAGE al 10% co-polimerizados con gelatina 0.04%. Adicionalmente, se

usaron como control negativo, extractos proteicos de células MDCK (30 µg). Las muestras se corrieron a 80 V, durante 2.5 h y a 4°C para evitar la degradación de las proteasas. Terminada la separación proteica, los geles se lavaron 2 veces con PBS-Tritón al 2.5% por 30 min en cada lavado y se incubaron 16 h con un amortiguador de activación (Tris-HCl 100 mM, pH 7.0) a 37°C. Finalmente, el gel se tiñó con azul de Coomassie al 0.05% (metanol: ácido acético: agua) y se aclaró con solución desteñidora (1:4:5 v/v/v, ácido acético glacial:metanol:agua) (Ocadiz R *et al.*, 2005).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente con la prueba t-student, utilizando el programa Prisma 5 GraphPad. La significancia estadística se tomó como * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$.

VIII. RESULTADOS

***E. histolytica* degrada proteínas de la UA y de los desmosomas**

Anteriormente, se ha descrito que *E. histolytica* interacciona con el epitelio, en la zona de contacto célula-célula (Martínez-palomo, *et al.*, 1985) (Leroy, *et al.*, 2000; Lejeune, *et al.*, 2011). Nuestro grupo demostró que a tiempos tempranos de incubación entre las células epiteliales y los trofozoítos, se afecta principalmente a la UE, su función y sus componentes moleculares. Sin embargo, se desconoce si cuando la invasión progresa a través del epitelio, se afectan otras estructuras del CUI. De manera que iniciamos nuestro estudio evaluando si los componentes de las UA y desmosomas se ven afectados. Para determinar la integridad de las proteínas que constituyen a la UA y a los desmosomas se realizaron ensayos de western blot. Células MDCK fueron incubadas con *E. histolytica*: 1) trofozoítos completos (TC), 2) extractos totales (ET) o 3) productos de secreción (PS), a diferentes tiempos (2, 10 y 30 min). Posteriormente, para eliminar las moléculas ambientales no unidas a las células epiteliales, se realizaron abundantes lavados. A

continuación, las células MDCK se lisaron y las proteínas totales se analizaron en geles SDS-PAGE. Las proteínas de la UA (E-cadherina y β -catenina) y de los desmosomas (Dsp y CK18) fueron inmunodetectadas con anticuerpos específicos para cada proteína.

Degradación de E-cadherina

En condiciones control, cuando las células epiteliales no se incubaron con *E. histolytica* y se inmunodetectó a la proteína E-cadherina, encontramos una banda de 120 kDa, que corresponde al peso molecular esperado para esta proteína (Hartsock, *et al.*, 2008) (Fig. 17, 18 y 19; 0 min). En cambio, cuando las MDCK fueron incubadas con TC, se observó una disminución de esta proteína, dependiente del tiempo de incubación; de hecho a los 30 min ya no se detectó a la E-cadherina (Fig. 17 A). Como control de carga, en estos mismos lisados se inmunodectó a la proteína tubulina. Esta proteína no presentó ningún cambio en los diferentes tiempos de incubación (Fig. 17 A). Al realizar el análisis densitométrico de la banda correspondiente a la E-cadherina, en comparación con la tubulina, se observó una disminución significativa de E-cadherina desde los dos minutos de interacción, siendo mayor a los 30 min (Fig. 17 B).

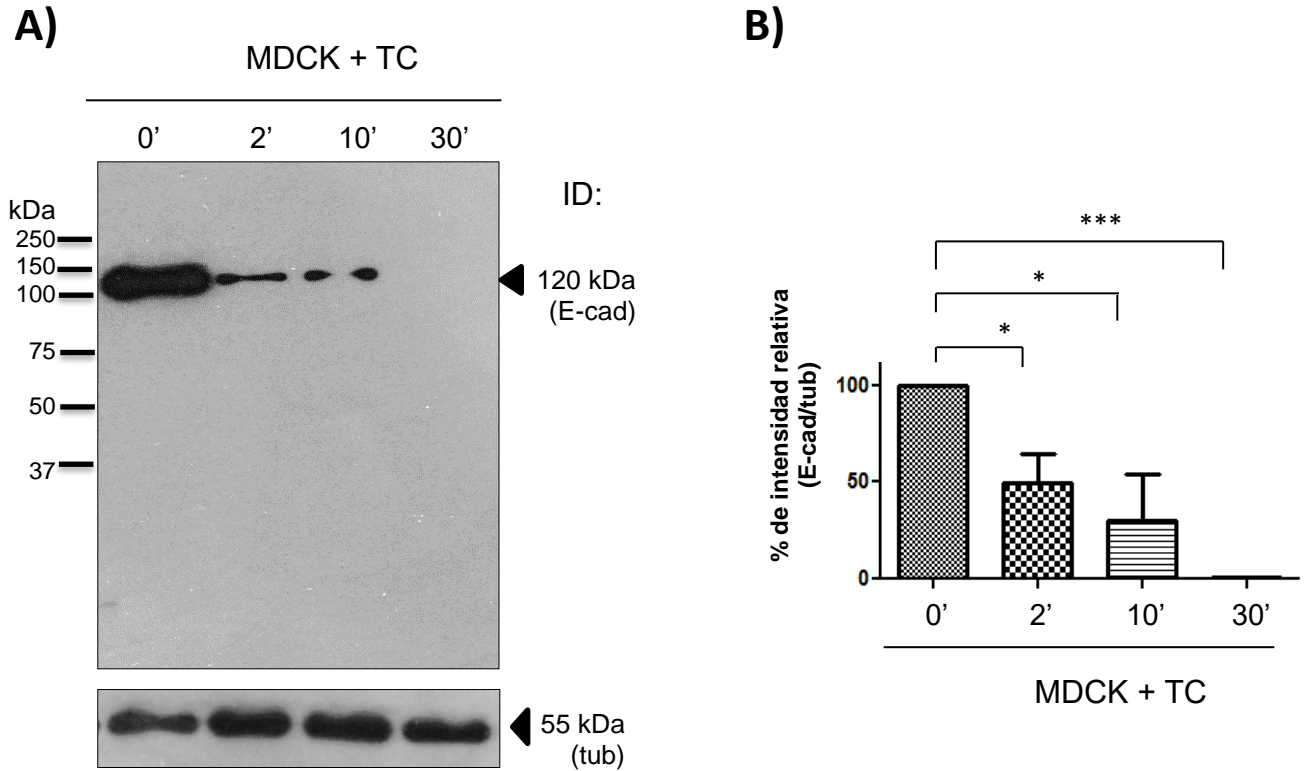


Figura. 17. Los trofozoitos completos de *E. histolytica* degradan a la E-cadherina. A) Células MDCK incubadas con TC a diferentes tiempos fueron lisadas y procesadas para ensayos de western blot. Las proteínas E-cadherina (E-cad) y tubulina (tub) fueron inmunodetectadas (ID) con anticuerpos específicos. **B)** Análisis densitométrico de las bandas de E-cadherina y tubulina, normalizadas con respecto al tiempo 0'. Cada barra representa el promedio y el error estándar de 3 experimentos independientes. * $P \leq 0.05$ y *** $P \leq 0.001$.

Para hacer más accesibles a las proteínas de la amiba, en lugar de usar TC, utilizamos ET y los incubamos con MDCK. Al analizar a la proteína E-cadherina, observamos que disminuye de una manera más rápida y pronunciada, a partir de los 2 min de interacción (Fig. 18 A). Desde los 10 min, ya no se detecta la presencia de esta molécula. El análisis densitométrico confirma esta disminución (Fig. 18 B).

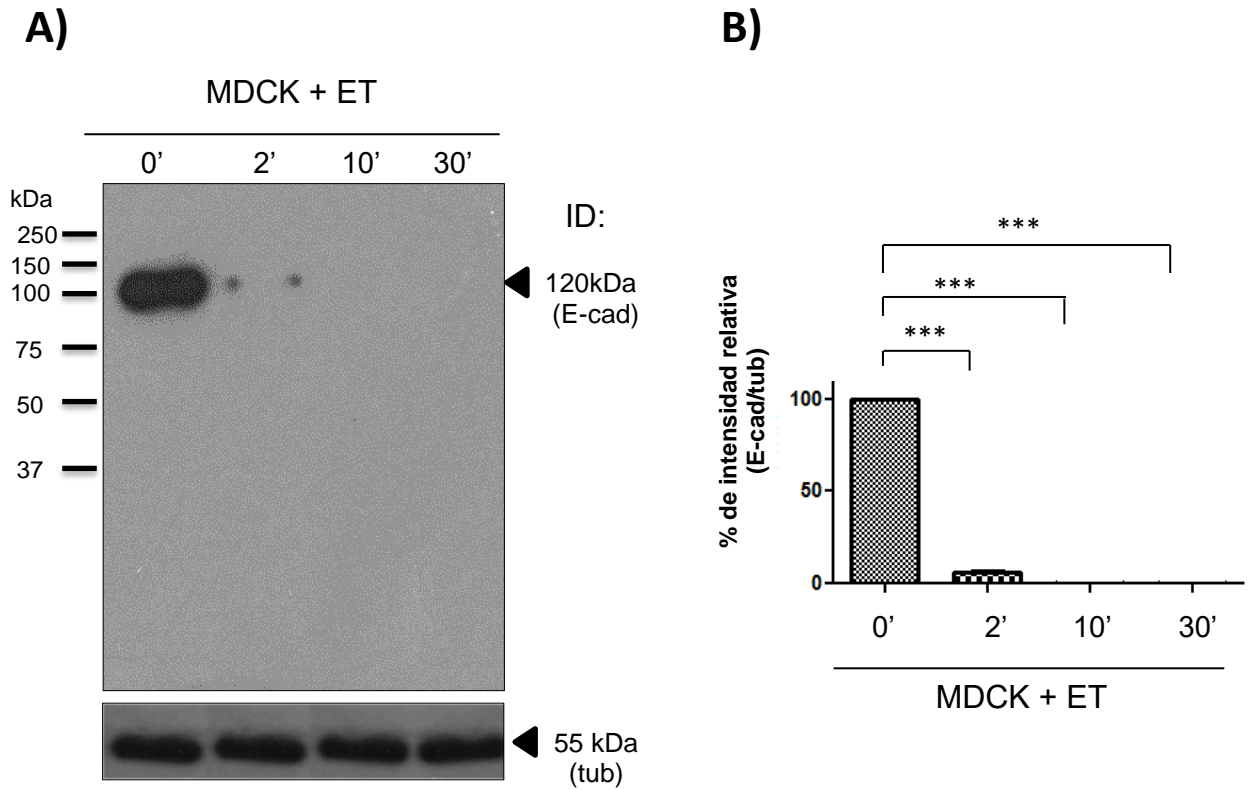


Figura. 18. Los extractos totales de *E. histolytica* degradan a la E-cadherina. A) Células MDCK incubadas con ET a diferentes tiempos fueron lisadas y procesadas para ensayos de western blot. Las proteínas E-cadherina (E-cad) y tubulina (tub) fueron inmunodetectadas (ID) con anticuerpos específicos. **B)** Análisis densitométrico de las bandas de E-cadherina y tubulina, normalizadas con respecto al tiempo 0'. Cada barra representa el promedio y el error estándar de 3 experimentos independientes. * $P \leq 0.05$ y *** $P \leq 0.001$.

Dado que muchas proteínas con actividad proteolítica son secretadas al medio, también utilizamos PS derivados de *E. histolytica* y los pusimos a interactuar con las células epiteliales. Como se puede observar en la figura 19 A, los PS no afectan la cantidad de la E-cadherina, aún a tiempos prolongados de interacción. El análisis densitométrico confirmó que no hay cambios significativos en la E-cadherina (Fig. 19 B).

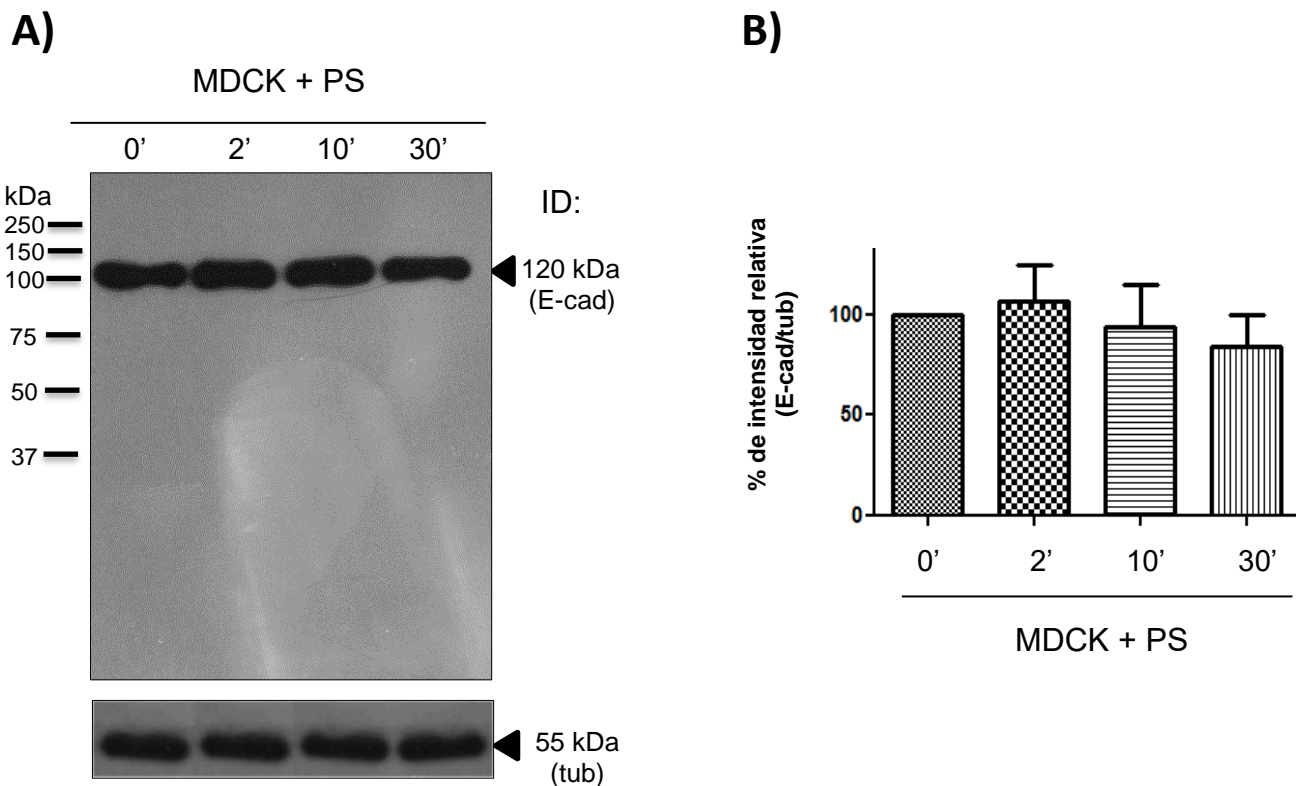


Figura. 19. Los productos secretados de *E. histolytica* no degradan a la E-cadherina. A) Células MDCK incubadas con PS a diferentes tiempos fueron lisadas y procesadas para ensayos de western blot. Las proteínas E-cadherina (E-cad) y tubulina (tub) fueron inmunodetectadas (ID) con anticuerpos específicos. **B)** Análisis densitométrico de las bandas de E-cadherina y tubulina, normalizadas con respecto al tiempo 0'. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes. Después del análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas, entre los diferentes tiempos de interacción.

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que tanto los TC como los ET, pero no los PS, son capaces de degradar a esta proteína, desde tiempos tempranos de interacción (2 min).

Degradación de β -catenina

A continuación analizamos la expresión de la proteína cortical de la UA, β -catenina. En células MDCK controles, que no se incubaron con *E. histolytica*, se observó una banda con un peso de 92 kDa, que corresponde al peso molecular reportado para esta proteína (Hartsock, *et al.*, 2008) (Fig. 20, 21 y 22; 0 min). En contraste, cuando las células MDCK se incubaron con TC, se observa una drástica disminución de la cantidad de esta proteína, desde los dos minutos de interacción y ya no es detectable a partir de los 10 min (Fig. 20 A). Cabe aclarar que el anticuerpo usado en algunas ocasiones también es capaz de reconocer una banda de 120 kDa, que corresponde a otra catenina llamada p120. De manera interesante, esta proteína parece no afectarse por los TC, en la misma medida que la β -catenina; sugiriendo que el efecto de la *E. histolytica* es específico sobre ciertas proteínas de la UA (Fig. 20 A). Posteriormente, se realizó el análisis densitométrico comparando la banda de β -catenina con la de tubulina, observando una disminución significativa de la cantidad de β -catenina desde los dos minutos de interacción (Fig. 20 B).

Del mismo modo, utilizamos ET y los interaccionamos con las células epiteliales. En este caso, la cantidad de β -catenina disminuyó ligeramente a partir de los 2 min, sin embargo, disminuye claramente a los 30 min (Fig. 21 A). El análisis densitométrico de la banda de la β -catenina, respecto a la de tubulina, confirmó la disminución significativa de esta proteína a partir de los 10 min de interacción (Fig. 21 B).

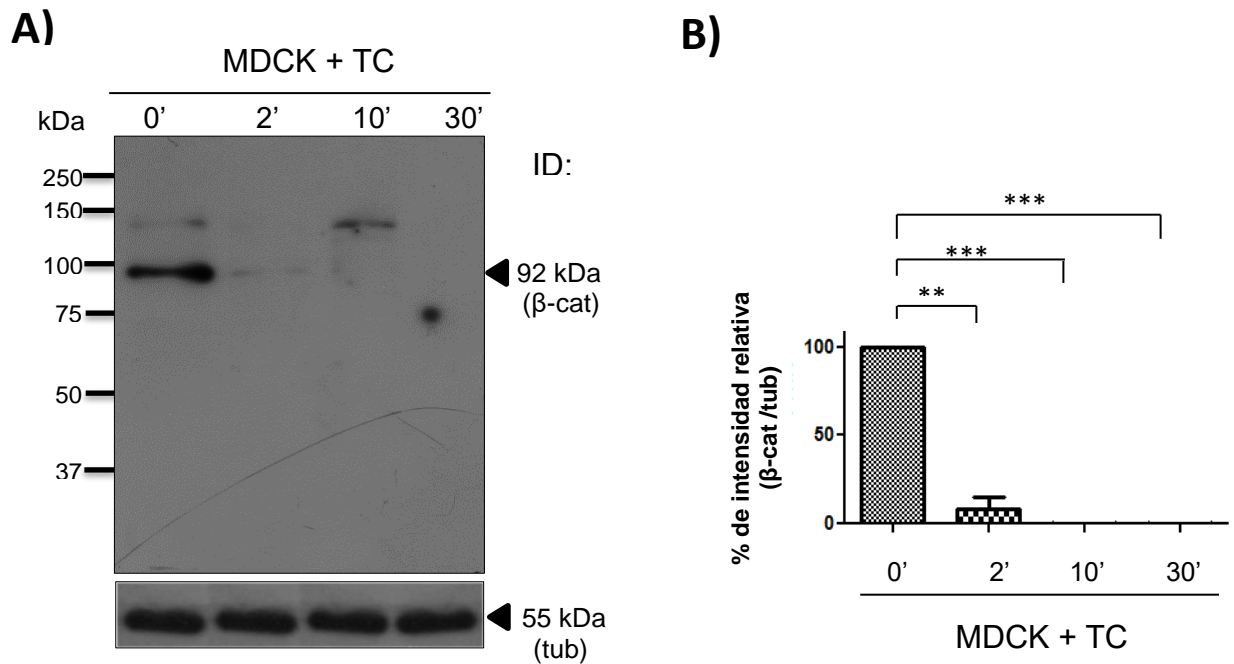


Figura. 20. Los trofozoitos completos de *E. histolytica* degradan a la β-catenina. **A)** Células MDCK incubadas con TC a diferentes tiempos fueron lisadas y procesadas para ensayos de western blot. Las proteínas β-catenina (β-cat) y tubulina (tub) fueron inmunodetectadas (ID) con anticuerpos específicos. **B)** Análisis densitométrico de las bandas de β-catenina y tubulina, normalizadas con respecto al tiempo 0'. Cada barra representa el promedio ± el error estándar de 3 experimentos independientes. ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$.

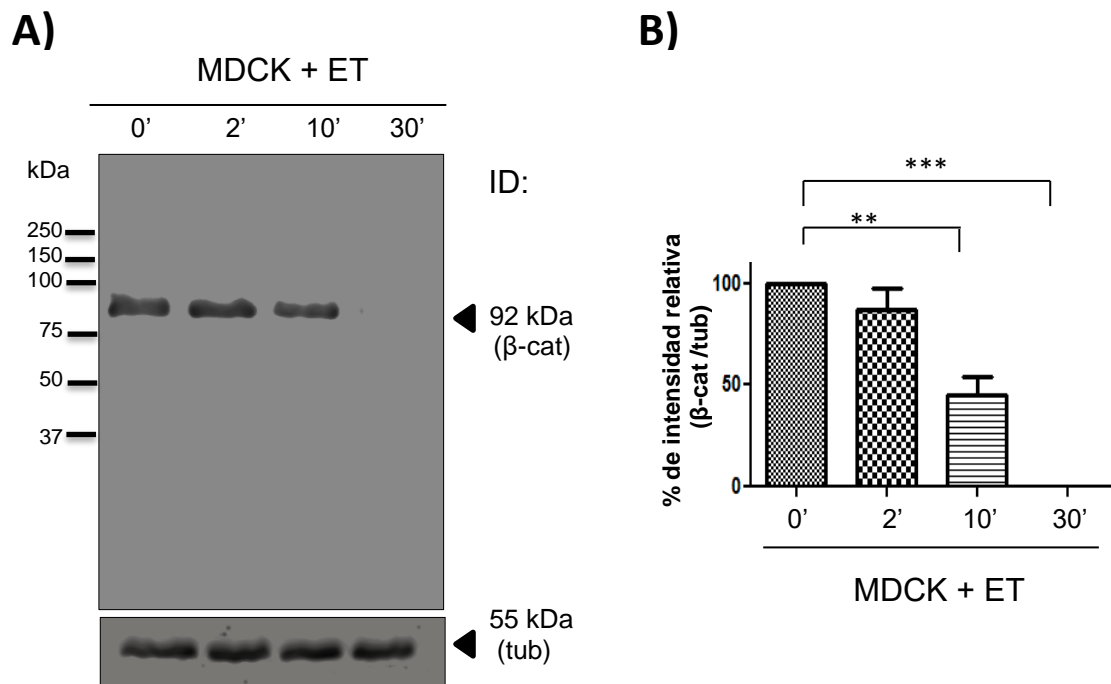


Figura. 21. Los extractos totales de *E. histolytica* degradan a la β-catenina. **A)** Células MDCK incubadas con ET a diferentes tiempos fueron lisadas y procesadas para ensayos de western blot. Las proteínas β-catenina (β-cat) y tubulina (tub) fueron inmunodetectadas (ID) con anticuerpos específicos. **B)** Análisis densitométrico de las bandas de β-catenina y tubulina, normalizadas con respecto al tiempo 0'. Cada barra representa el promedio ± el error estándar de 3 experimentos independientes. ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$.

Utilizando los PS, no se observó degradación de la β -catenina en los ensayos de Western-blot (Fig. 22 A). El análisis densitométrico confirmó que los PS no fueron capaces de afectar la cantidad de esta proteína, al no haber cambios significativos, aún a tiempos prolongados de interacción (Fig. 22 B).

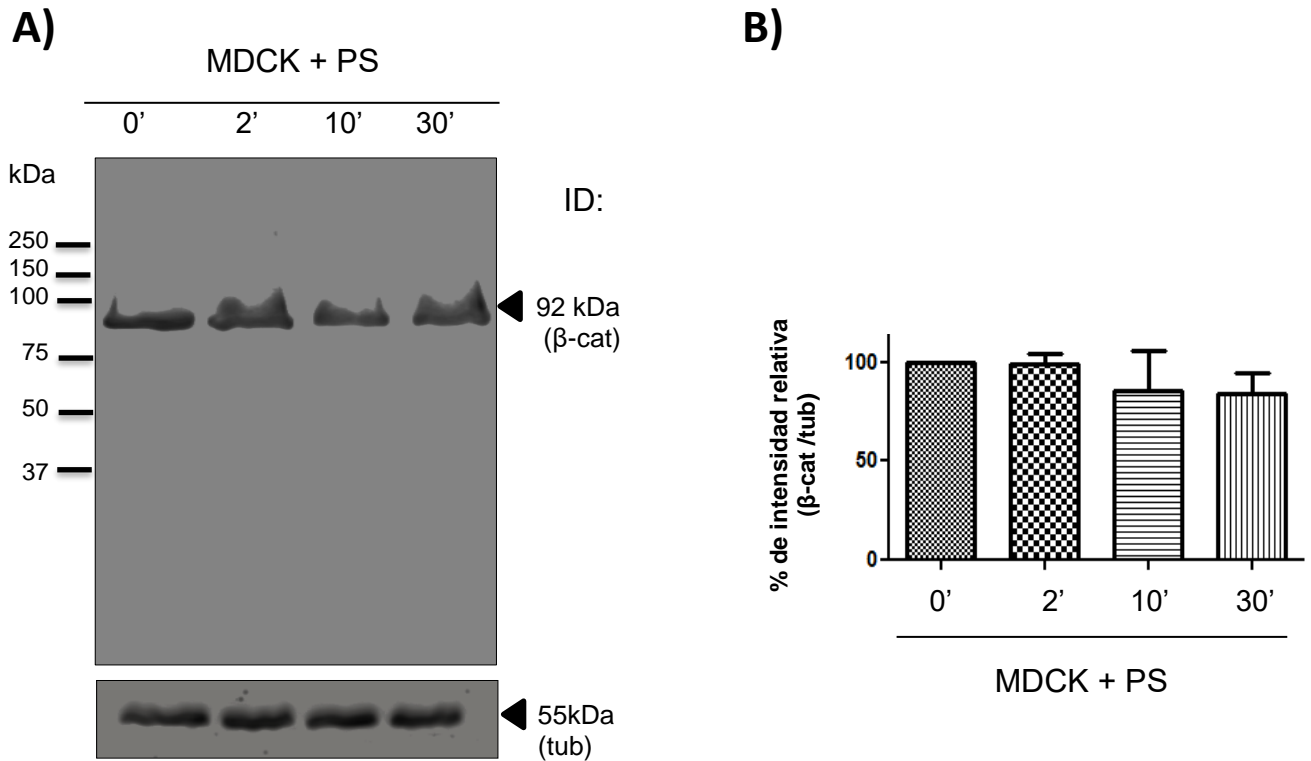


Figura. 22. Los productos secretados de *E. histolytica* no degradan a la β -catenina. **A)** Células MDCK incubadas con PS a diferentes tiempos fueron lisadas y procesadas para ensayos de western blot. Las proteínas β -catenina (β -cat) y tubulina (tub) fueron inmunodetectadas (ID) con anticuerpos específicos. **B)** Análisis densitométrico de las bandas de β -catenina y tubulina, normalizadas con respecto al tiempo 0'. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes. Después del análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas, entre los diferentes tiempos de interacción.

En resumen, la disminución de β -catenina en células MDCK interaccionadas con *E. histolytica*, nos sugiere que los TC son capaces de degradar esta proteína a tiempos cortos de interacción (2 min). A diferencia de los ET que muestran un

efecto más lento, a partir de los 10 min de interacción. Al igual que con la E-cadherina, los PS no afectan la cantidad de β -catenina.

Degradación de desmoplaquina I y II

Para analizar el efecto de *E. histolytica* sobre los desmosomas, utilizamos a la proteína submembranal Dsp, la cual presenta dos isoformas (Dsp I y II). Ambas isoformas fueron detectadas en células MDCK control, con un peso de 250 y 210 kDa, que corresponden al peso molecular reportado para Dsp I y Dsp II, respectivamente (Suhrbier *et al.*, 1986) (Fig. 23, 24 y 25; 0 min). En algunas ocasiones, la Dsp se degrada y podemos observar otras bandas de menor peso molecular (Fig. 23 A y 25 A), aún en células no incubadas con *E. histolytica*, por lo que no podemos adjudicar esta degradación a la amiba. Sin embargo, cuando las células MDCK se incubaron con TC, se observó una disminución gradual de las bandas de 250 y 210 kDa, dependiente del tiempo de incubación (Fig. 23 A). Al realizar el análisis densitométrico de las 2 bandas de Dsp, respecto a la de tubulina, confirmamos una disminución significativa en la cantidad de estas proteínas, desde los 2 minutos de interacción (Fig. 23 B).

Cuando utilizamos ET y los incubamos con MDCK, observamos una mayor disminución de las Dsp I y II (Fig. 24), que cuando empleamos TC (Fig. 23). En tanto que los PS no alteraron la cantidad de Dsp I y II (Fig. 25).

Nuestros resultados sugieren que la Dsp I y II son degradadas cuando la células epiteliales son interaccionadas solo con TC y ET, pero no con los PS.

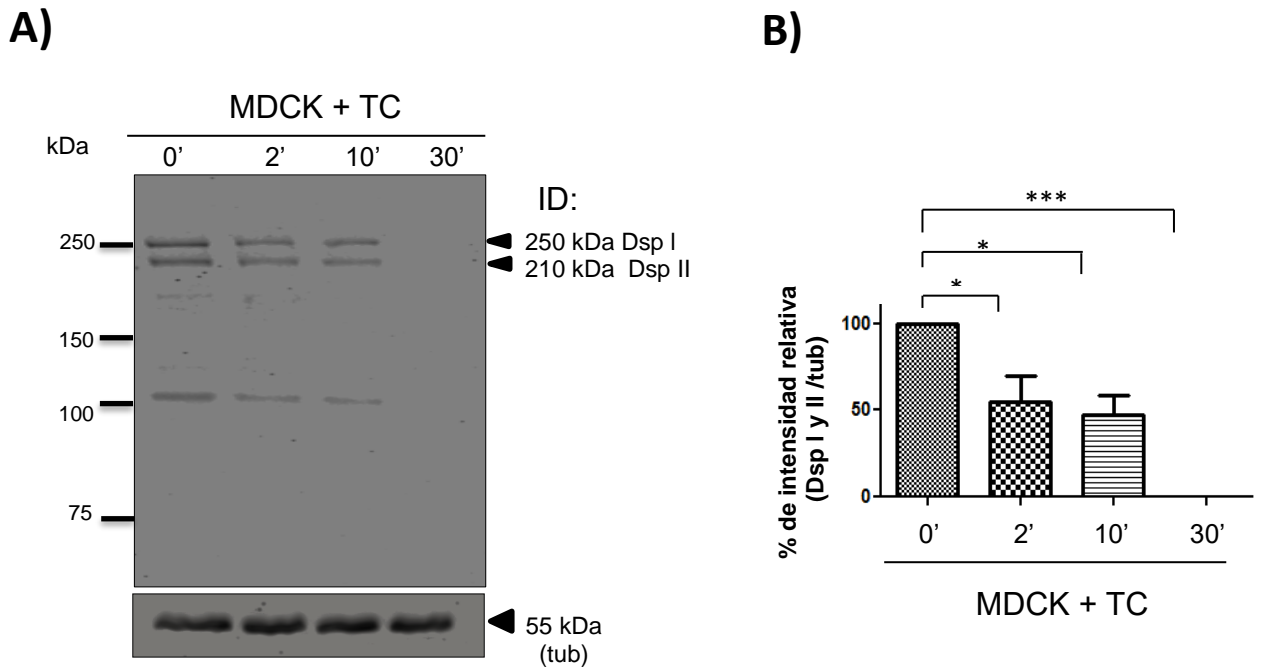


Figura. 23. Los trofozoítos completos de *E. histolytica* degradan a Dsp I y II. A) Células MDCK incubadas con TC a diferentes tiempos fueron lisadas y procesadas para ensayos de western blot. Las proteínas Dsp (Dsp I y II) y tubulina (tub) fueron inmunodetectadas (ID) con anticuerpos específicos. **B)** Análisis densitométrico de ambas bandas de Dsp y tubulina, normalizadas con respecto al tiempo 0'. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes. * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$.

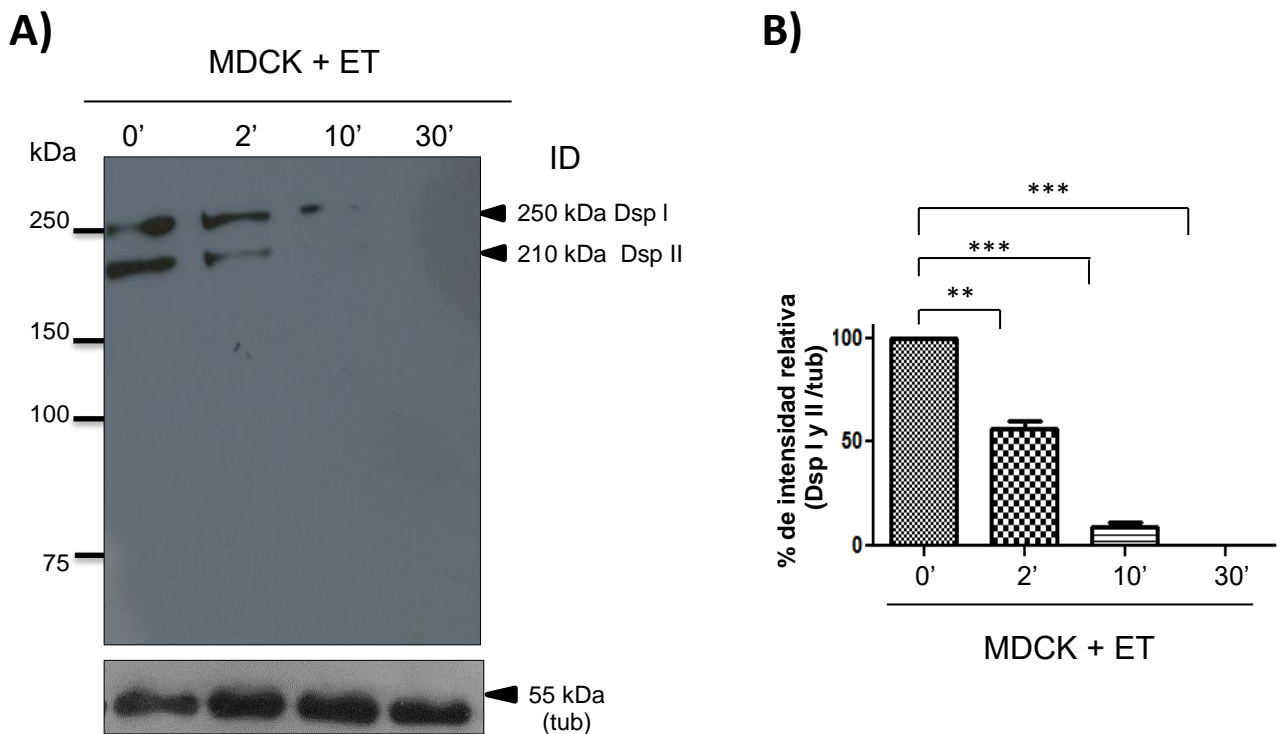


Figura. 24. Los extractos totales de *E. histolytica* degradan a la Dsp I y II. A) Células MDCK incubadas con ET a diferentes tiempos fueron lisadas y procesadas para ensayos de western blot. Las proteínas Dsp I y II y tubulina (tub) fueron inmunodetectadas (ID) con anticuerpos específicos. **B)** Análisis densitométrico de ambas bandas de Dsp y tubulina, normalizadas con respecto al tiempo 0'. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes. ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$.

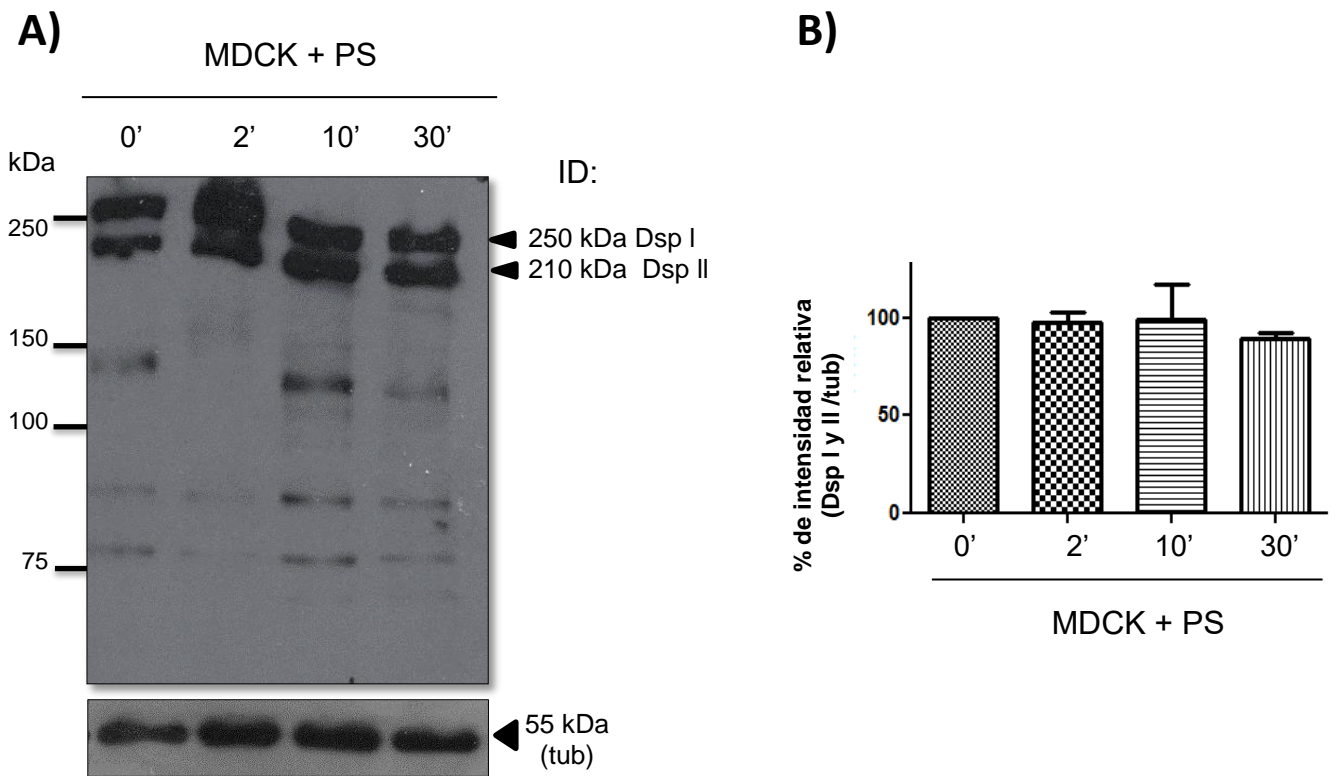


Figura. 25. Los productos secretados de *E. histolytica* no degradan a la Dsp I y II. **A)** Células MDCK incubadas con ET a diferentes tiempos fueron lisadas y procesadas para ensayos de western blot. Las proteínas Dsp I y II y tubulina (tub) fueron inmunodetectadas (ID) con anticuerpos específicos. **B)** Análisis densitométrico de ambas bandas de Dsp I y II y tubulina, normalizadas con respecto al tiempo 0'. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes. No hay diferencias significativas.

Degradación de la citoqueratina 18 (CK 18)

La proteína CK18 fue inmunodetectada en células MDCK control, con un peso de 45 kDa, que corresponde al peso molecular reportado para esta proteína (Weng *et al.*, 2012) (Fig. 26, 27 y 28; 0 min). Cuando las células MDCK fueron incubadas con TC, se observó una disminución de dicha proteína, a partir de los 2 min de interacción, notando que a los 30 min prácticamente se vuelve indetectable (Fig. 26). Al interaccionar ET con células MDCK se observó, que la cantidad de CK18 disminuyó también desde los 2 min de interacción (Fig. 27), aunque no tan

drásticamente como con los TC (Fig. 26). Mientras que con los PS, la CK18 tampoco reportó cambios significativos (Fig. 28).

Al igual que las otras proteína analizadas, la CK18 de células MDCK es probablemente degradada por los TC y ET de *E. histolytica*.

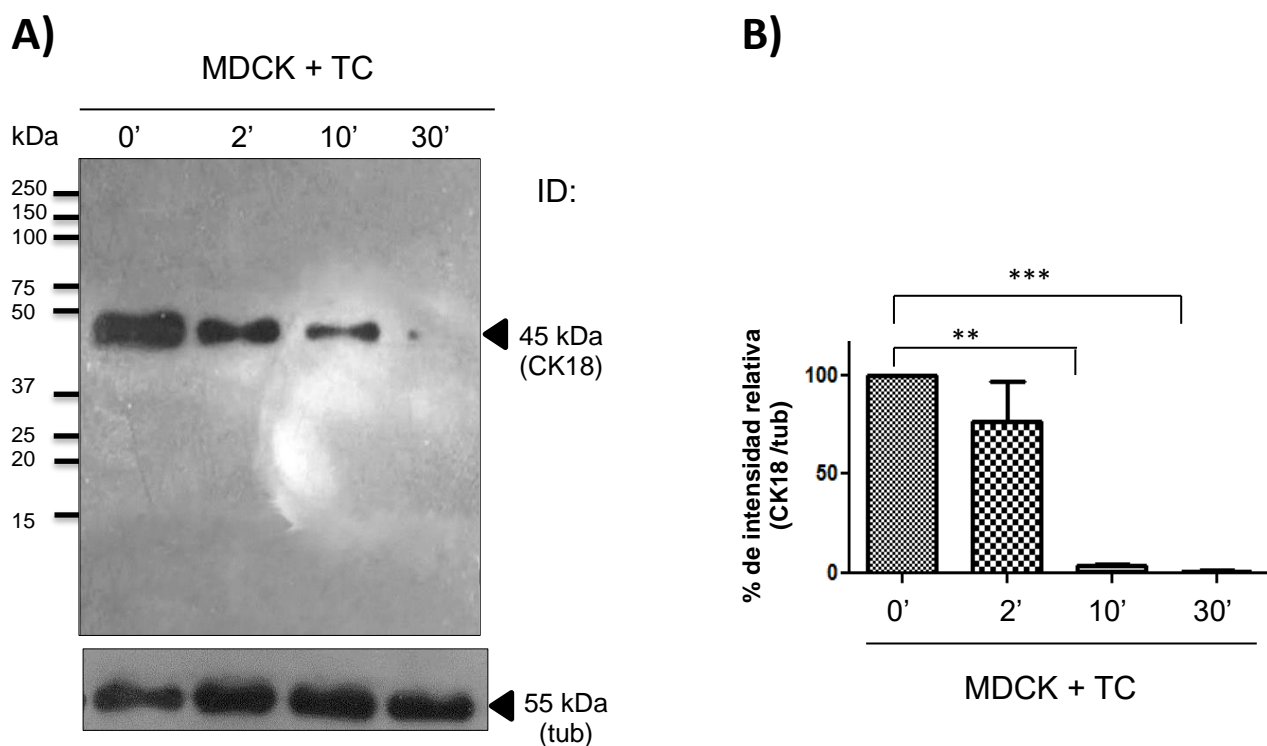


Figura. 26. Los trofozoitos completos de *E. histolytica* degradan a la CK 18. **A)** Células MDCK incubadas con ET a diferentes tiempos fueron lisadas y procesadas para ensayos de western blot. Las proteínas CK18 y tubulina (tub) fueron inmunodetectadas (ID) con anticuerpos específicos. **B)** Análisis densitométrico de las bandas de CK18 y tubulina, normalizadas con respecto al tiempo 0'. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes. ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$.

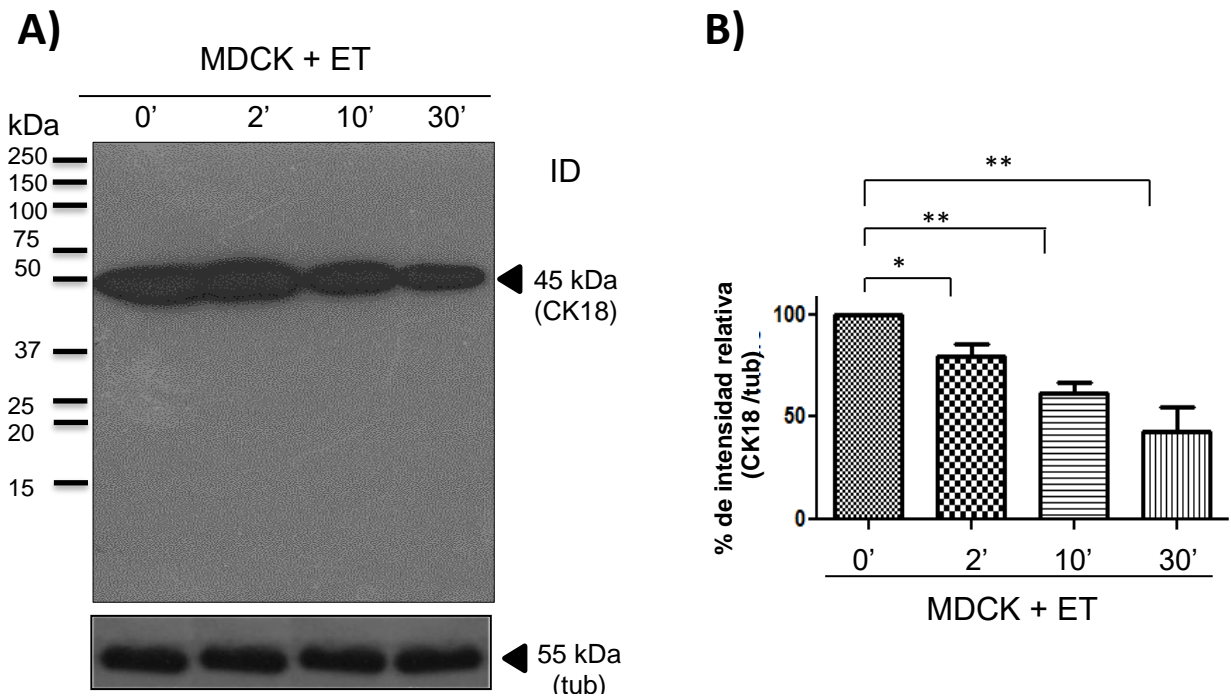


Figura. 27. Los extractos totales de *E. histolytica* degradan a la CK 18. **A)** Células MDCK incubadas con ET a diferentes tiempos fueron lisadas y procesadas para ensayos de western blot. Las proteínas CK18 y tubulina (tub) fueron inmunodetectadas (ID) con anticuerpos específicos. **B)** Análisis densitométrico de las bandas de CK 18 y tubulina, normalizadas con respecto al tiempo 0'. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes. $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

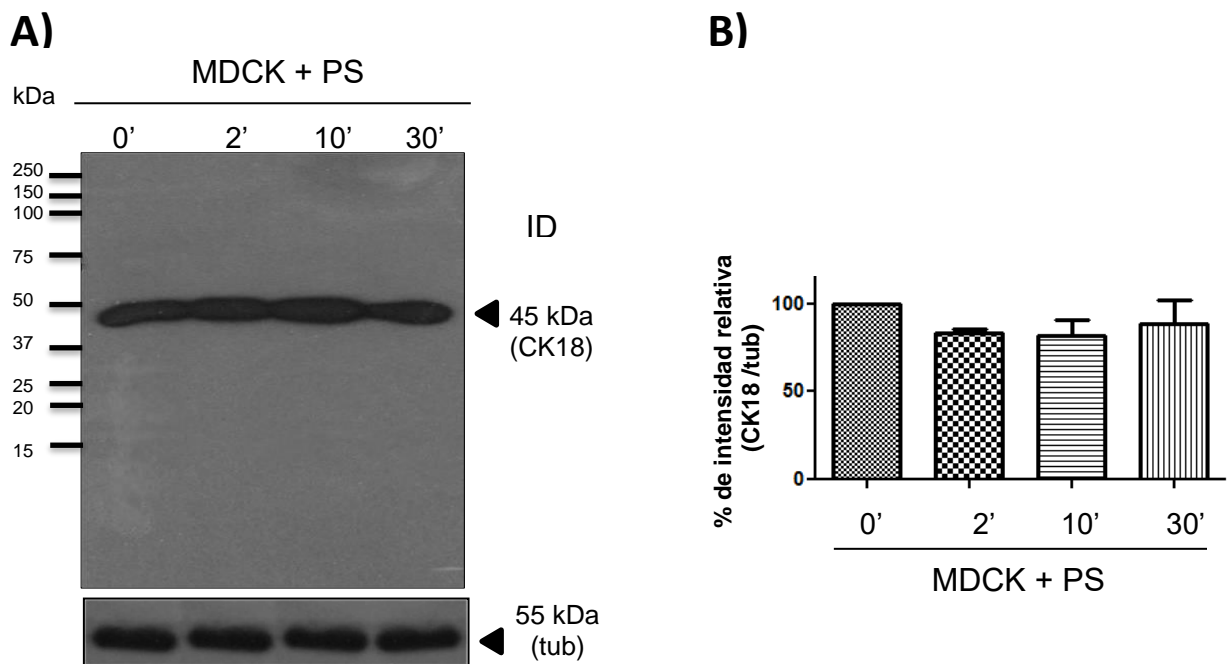


Figura. 28. Los productos secretados por *E. histolytica* degradan a la CK 18. **A)** Células MDCK incubadas con ET a diferentes tiempos fueron lisadas y procesadas para ensayos de western blot. Las proteínas CK18 y tubulina (tub) fueron inmunodetectadas (ID) con anticuerpos específicos. **B)** Análisis densitométrico de las bandas de CK18 y tubulina normalizadas con respecto al tiempo 0'. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes. $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

Los PS de *E. histolytica* presentan actividad proteolítica y contienen al complejo EhCPADH

Debido a que no se observó degradación de las proteínas de la UA y desmosomales analizadas, cuando las células MDCK se incubaron con los PS de *E. histolytica*, quisimos corroborar si las moléculas presentes en éstos, conservaban su capacidad proteolítica. De manera que realizamos geles de sustrato (SDS-PAGE co-polimerizados con gelatina al 0.04%) donde se corrieron los PS y como control positivo usamos ET de *E. histolytica*. Después de activar las moléculas separadas en estos geles, observamos que tanto los PS (Fig. 29; carriles 4-8) como los ET (Fig. 29; carriles 1 y 2) presentaron actividad proteolítica, principalmente a la altura de los 120 kDa. Como control negativo utilizamos ET de MDCK (EM), los cuales fueron incapaces de degradar el sustrato (Fig. 29 carril 3).

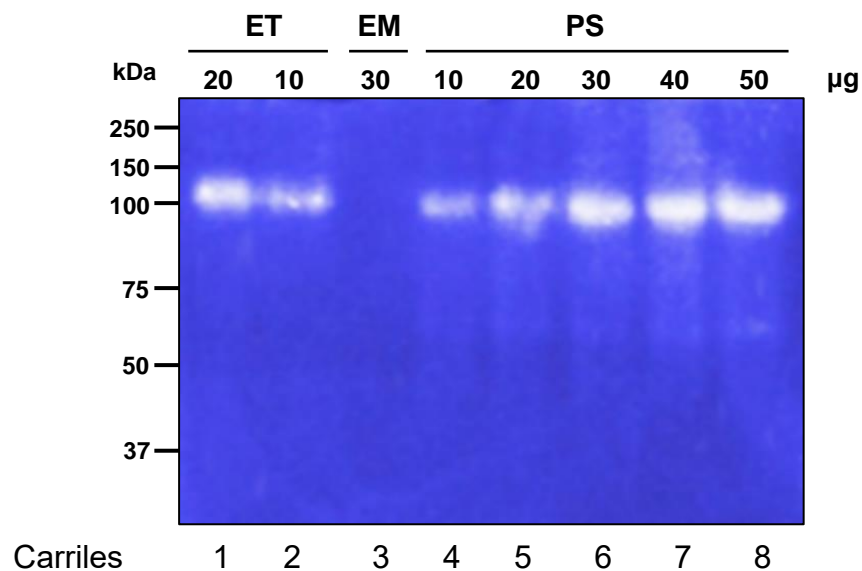


Figura. 29. Actividad proteolítica de los PS. PS y ET de *E. histolytica* y extractos proteicos de células MDCK (EM) se corrieron en geles SDS-PAGE al 10% co-polimerizado con gelatina al 0.04%. Después de activar las proteasas, los geles se tiñieron con azul de Coomassie.

Aunque ya se ha establecido que los PS contienen al complejo EhCPADH (Ocadiz R, 2000), quisimos corroborar si nuestras condiciones para obtener los PS

preservaban a esta proteína. Mediante ensayos de western blot detectamos la presencia de EhCPADH en los PS (Fig. 30, carril 2). Como control positivo, usamos ET, donde está más documentado la presencia de EhCPADH con un peso molecular de 124 kDa (Fig 30; carril 1) (García-Rivera, *et al.*, 1999). Es de notar que también se detectaron bandas de menor peso molecular, que pudieran corresponder a productos de degradación o a las proteínas que conforman este complejo (Fig. 30; cabezas de flecha), ya que la EhADH presentó un peso molecular de 75 kDa (Bañuelos, *et al.*, 2005) y la EhCP de 52 kDa (Ocadiz, *et al.*, 2005). Sin embargo ambas proteínas fueron débilmente detectadas en los PS.

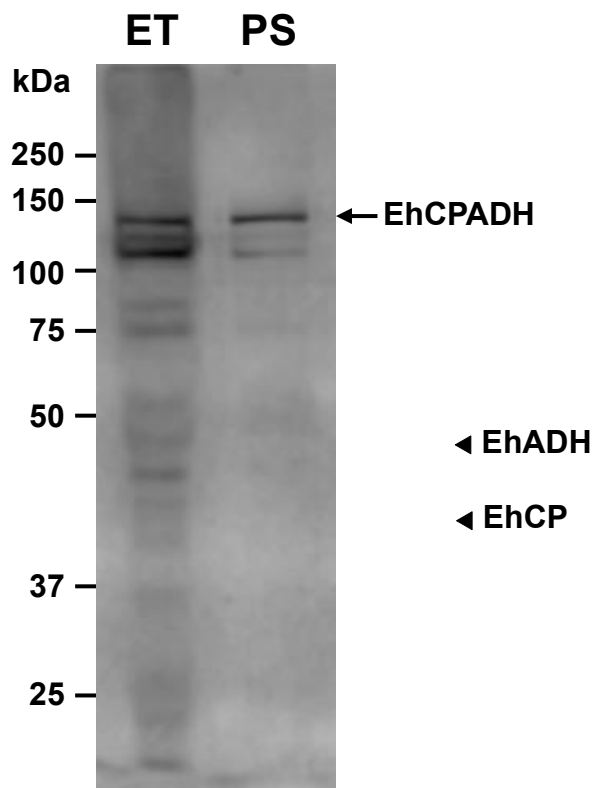


Figura. 30. Presencia del complejo EhCPADH en los PS de *E. histolytica*. Ensayos de western blot de ET y PS, usando el anticuerpo α -EhCPADH. Flecha: complejo EhCPADH. Cabezas de flecha: proteínas por separado que componen a este complejo.

Tomando juntos nuestros resultados de actividad proteolítica y la presencia de EhCPADH en los PS, podemos especular que la proteasa de ~120 kDa detectada en los zimogramas, corresponde a la CP que forma parte del complejo EhCPADH.

De manera que aunque los PS contengan al complejo EhCPADH y probablemente presente actividad proteolítica, no observamos degradación de las proteínas de la UA y desmosomales analizadas.

Localización de EhCPADH en la UA

Se sabe que el complejo EhCPADH se localiza en las UE, a tiempos tempranos de interacción (2 min) entre las MDCK y *E. histolytica*. Además, nuestros resultados previos indican que esta amiba es capaz de degradar algunas proteínas de la UA, para lo cual *E. histolytica* tendría que localizarse en esta estructura epitelial. Por lo que pensamos que EhCPADH, después de alcanzar las UE, podría penetrar el espacio intercelular hasta alcanzar las estructuras epiteliales que se encuentran por debajo de las UE. Para probar esta hipótesis realizamos ensayos de inmunofluorescencia, con anticuerpos anti-EhCPADH y con marcadores de la UA (E-cadherina y β -catenina), en células MDCK incubadas con *E. histolytica*. Después de permitir la interacción por 2, 10 y 30 minutos, las células MDCK se lavaron exhaustivamente para remover las moléculas amibianas no unidas.

Co-localización de EhCPADH con E-cadherina

En células MDCK control, sin incubación con *E. histolytica*, la proteína E-cadherina presentó una localización en el borde celular (Fig. 31-33; tinción roja, tiempo 0'), a largo de la membrana lateral (Fig. 31-33; tinción roja, tiempo 0', plano zy). En tanto que el anticuerpo anti-EhCPADH no reconoció inespecíficamente a ninguna proteína en las células MDCK (Fig. 31-33; tinción verde, tiempo 0').

En células MDCK incubadas con TC, a los 2 min pudimos observar a la proteína EhCPADH en los bordes celulares (Fig. 31; tinción verde, tiempo 2', flechas), co-

localizando con E-cadherina (Fig. 31; tinción roja, tiempo 2', flechas). Sin embargo, en los planos laterales EhCPADH presentó una localización en la parte más apical de la membrana lateral (Fig. 31; tinción verde, tiempo 2', plano zy, cabezas de flecha), en tanto que la E-cadherina se expresó por toda la membrana lateral (Fig. 31; tinción roja, tiempo 2', plano zy, cabezas de flecha). A los 10 min de interacción, la localización de EhCPADH fue más clara en los bordes celulares (Fig. 31; tinción verde, tiempo 10', flechas) y co-localizó mejor con la E-cadherina (Fig. 31; tinción roja, tiempo 10', flechas). De hecho, a este tiempo, la co-localización de ambas proteínas se presentó a todo lo largo de la membrana lateral (Fig. 31; mezcla, tiempo 10', plano zy, cabezas de flecha). En tanto que a los 30 min, EhCPADH se observó poco en los bordes celulares (Fig. 31; tinción verde, tiempo 30', flechas) y fue más abundante en el interior celular. Sin embargo, aún co-localizó con E-cadherina (Fig. 31; tinción roja, tiempo 30', flechas) en la membrana lateral (Fig. 31; mezcla, tiempo 30', plano zy, cabezas de flecha). Es importante señalar que la cantidad de E-cadherina se vio disminuida significativamente a lo largo del tiempo de incubación, aunque a los 30 min se localizó en la membrana plasmática y un poco en el interior celular (Fig. 31; tinción roja, tiempo 2-30').

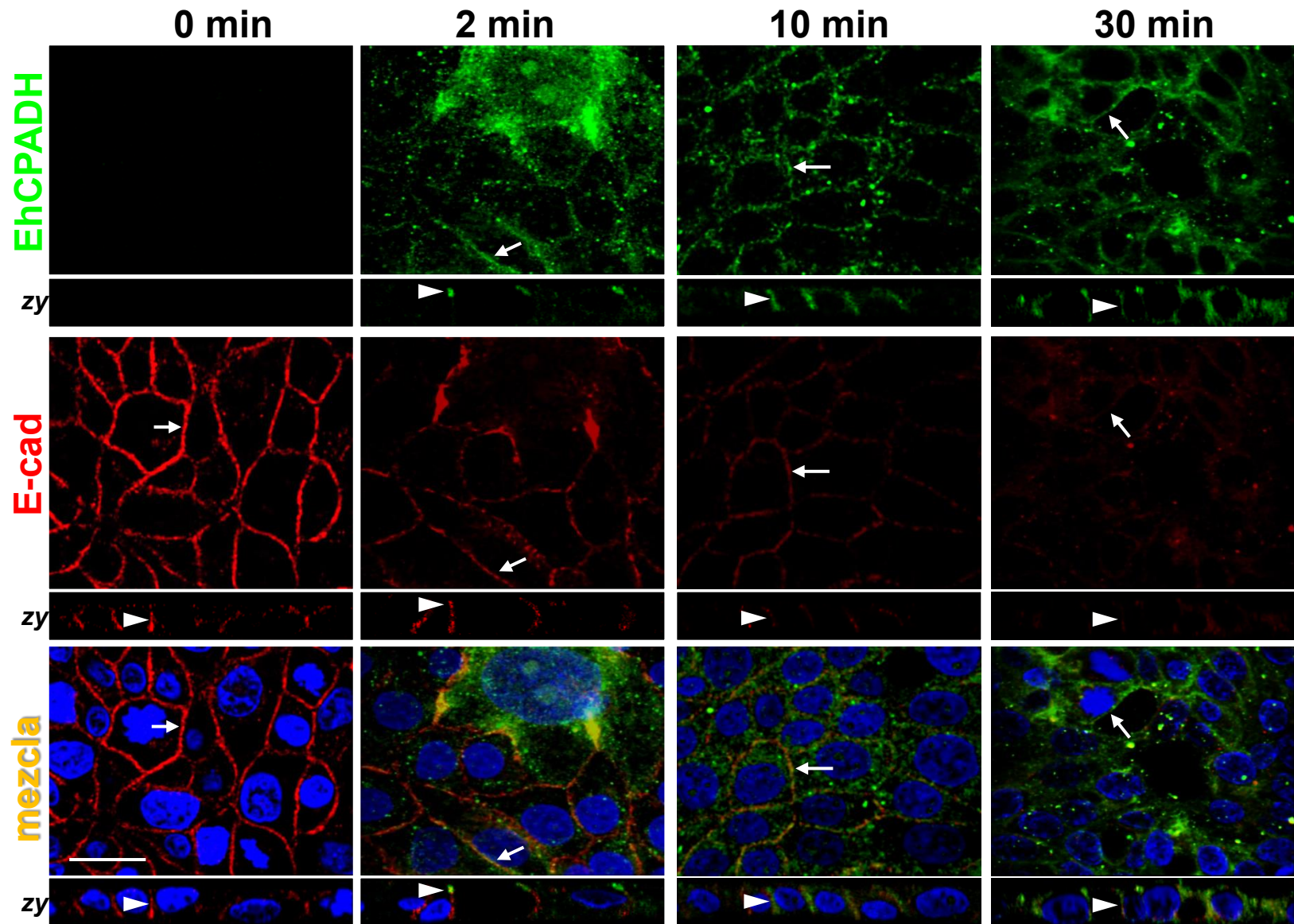


Figura 31. Co-localización de EhCPADH con E-cadherina en MDCK tratadas con TC de *E. histolytica*. Células MDCK fueron incubadas con TC a diferentes tiempos. Después de exhaustivos lavados, las células MDCK fueron tratadas para inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos $\rho\alpha$ -EhCPADH y $m\alpha$ -E-cad. Flechas: localización en el borde celular. Cabezas de flechas: localización en la membrana lateral. Barra = 10 μ m.

Cuando utilizamos ET, en lugar de TC y los incubamos con las células MDCK, observamos un resultado similar. El complejo EhCPADH se localizó en los bordes celulares desde los 2 min de interacción, siendo más evidente a los 10 min e incrementándose la marca en el interior celular a los 30 min (Fig. 32; tinción verde, 2-30', flechas). En todos los tiempos analizados, el complejo co-localizó con E-cadherina en los contactos intercelulares (Fig. 32; mezcla, 2-30', flechas); aunque a partir de los 10 min ambas proteínas se detectaron a lo largo de la membrana lateral (Fig. 32; mezcla, 10' y 30', cabezas de flecha). Por su parte, la cantidad de E-cadherina disminuyó de manera dependiente del tiempo de incubación con ET (Fig. 32; tinción roja, 2-30'), similar a lo que sucedió con los TC.

En cambio cuando utilizamos PS y los incubamos con MDCK, las células epiteliales continuaron expresando la misma cantidad de E-cadherina, aunque su localización se alteró (Fig. 33). A los 2 min de incubación E-cadherina se localizó principalmente en los bordes celulares, con un patrón definido (Fig. 33; tinción roja, 2', flechas); en tanto que a los 10 min, aunque se mantuvo en la membrana, empezó a incrementar la marca en el interior celular (Fig. 33; tinción roja, 10', flechas); siendo más evidente a los 30 min de incubación, donde la tinción membranal fue más difusa (Fig. 33; tinción roja, 30', flechas). Con respecto al patrón de tinción de la EhCPADH, fue muy similar al descrito para los TC y los ET. Durante los diferentes tiempos de incubación EhCPADH se localizó en los contactos intercelulares (Fig. 33; tinción verde, 2-30').

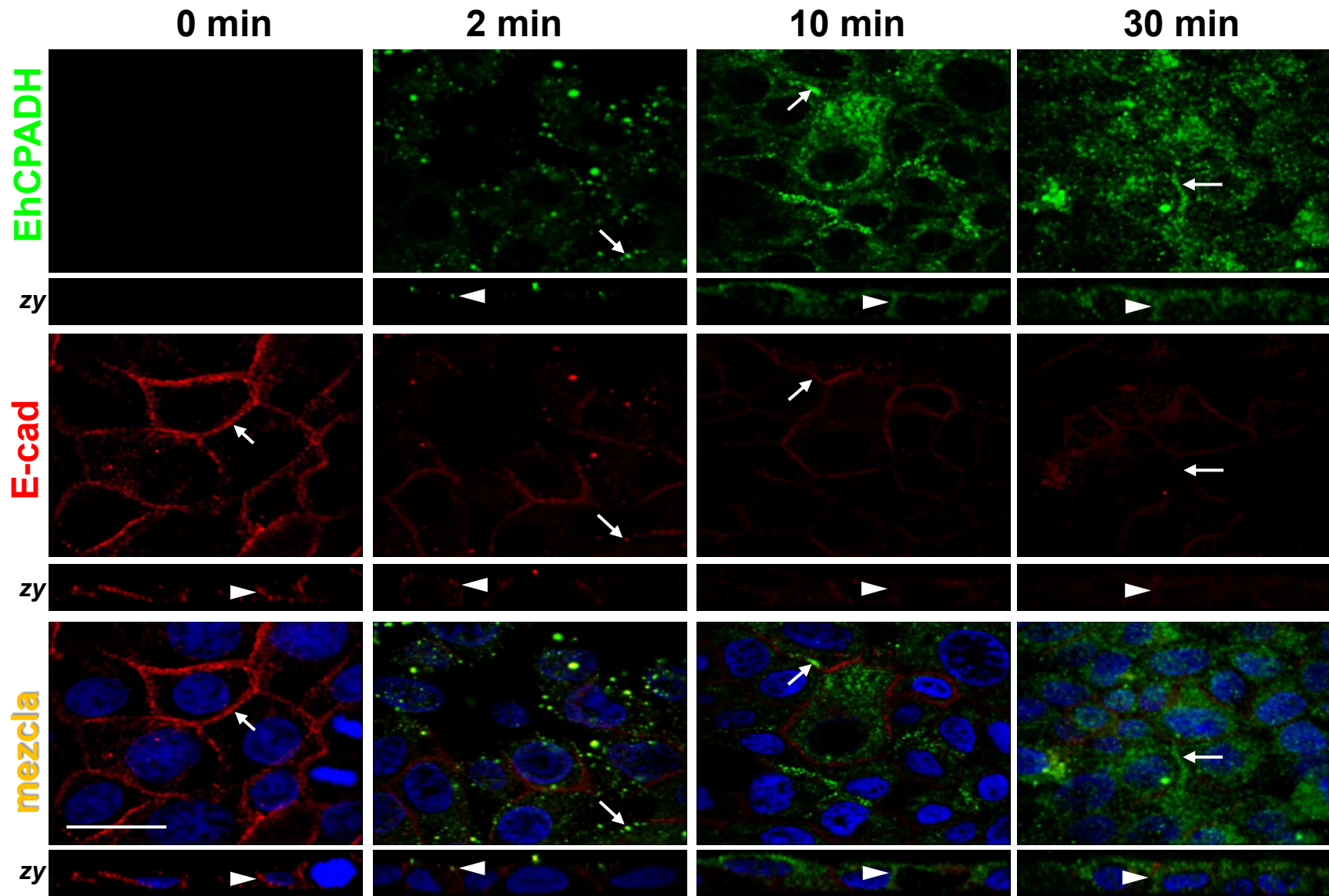


Figura 32. Co-localización de EhCPADH con E-cadherina en MDCK tratadas con ET de *E. histolytica*. Células MDCK fueron incubadas con ET a diferentes tiempos. Después de exhaustivos lavados, las células MDCK fueron tratadas para inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos α -EhCPADH y α -E-cad. Flechas: localización en el borde celular. Cabezas de flechas: localización en la membrana lateral. Barra = 10 μ m.

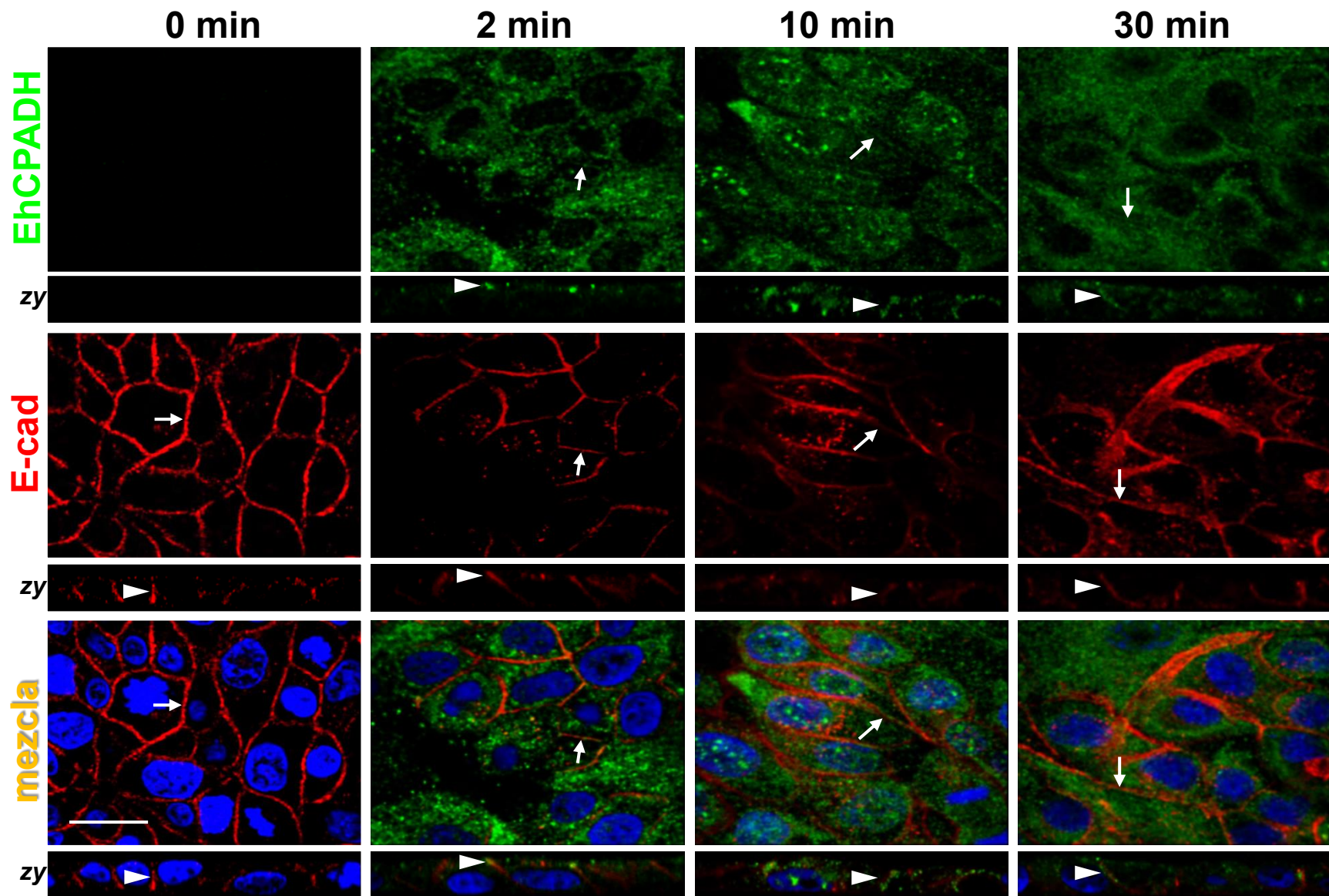


Figura 33. Co-localización de EhCPADH con E-cadherina en MDCK tratadas con PS de *E. histolytica*. Células MDCK fueron incubadas con PS a diferentes tiempos. Después de exhaustivos lavados, las células MDCK fueron tratadas para inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos α -EhCPADH y α -E-cad. Flechas: localización en el borde celular. Cabezas de flechas: localización en la membrana lateral. Barra = 10 μ m.

Co-localización de EhCPADH con β -catenina

Otro marcador de la UA es la β -catenina, la cual presentó una localización en las regiones de contacto célula-célula (Fig. 34-36, tinción roja, 0', flechas), a lo largo de la membrana lateral (Fig. 34-36; tinción roja, 0', plano zy, cabezas de flecha), como ha sido reportado previamente (Crawford, *et al.*, 1999). Sin embargo, cuando las células epiteliales se incubaron con TC (Fig. 34; tinción roja, 2-30') o ET (Fig. 35; tinción roja, 2-30'), la cantidad de β -catenina disminuyó drásticamente a partir de los 2 min de interacción, siendo, su presencia en la membrana plasmática, la que se vió más alterada (Fig. 34 y 35; tinción roja, 2-30', flechas). En tanto que cuando las células MDCK se trataron con PS, la cantidad de β -catenina no se modificó (Fig. 36; tinción roja, 2-30'), pero a los 30 min su localización en la membrana disminuyó (Fig. 36; tinción roja, 30', flechas), re-localizándose en el citoplasma.

Por su parte EhCPADH mostro una localización en los bordes celulares en todos los tiempos analizados y con los diferentes tratamientos de *E. histolytica*. Aunque su patrón en la membrana lateral pasa de ser apical a los 2 min, cuando la invasión inicia (Fig. 34-36; tinción verde, 2', plano zy, cabezas de flecha), a una localización que abarca toda la membrana lateral (Fig. 34-36; tinción verde, 10' y 30', plano zy, cabezas de flecha). En todas las imágenes que muestran las mezclas, EhCPADH co-localizó con la β -catenina (Fig. 34-36; mezclas, 2-30', flechas).

Nuestros resultados nos permiten sugerir que EhCPADH se localiza en la UA, principalmente a los 10 min de interacción.

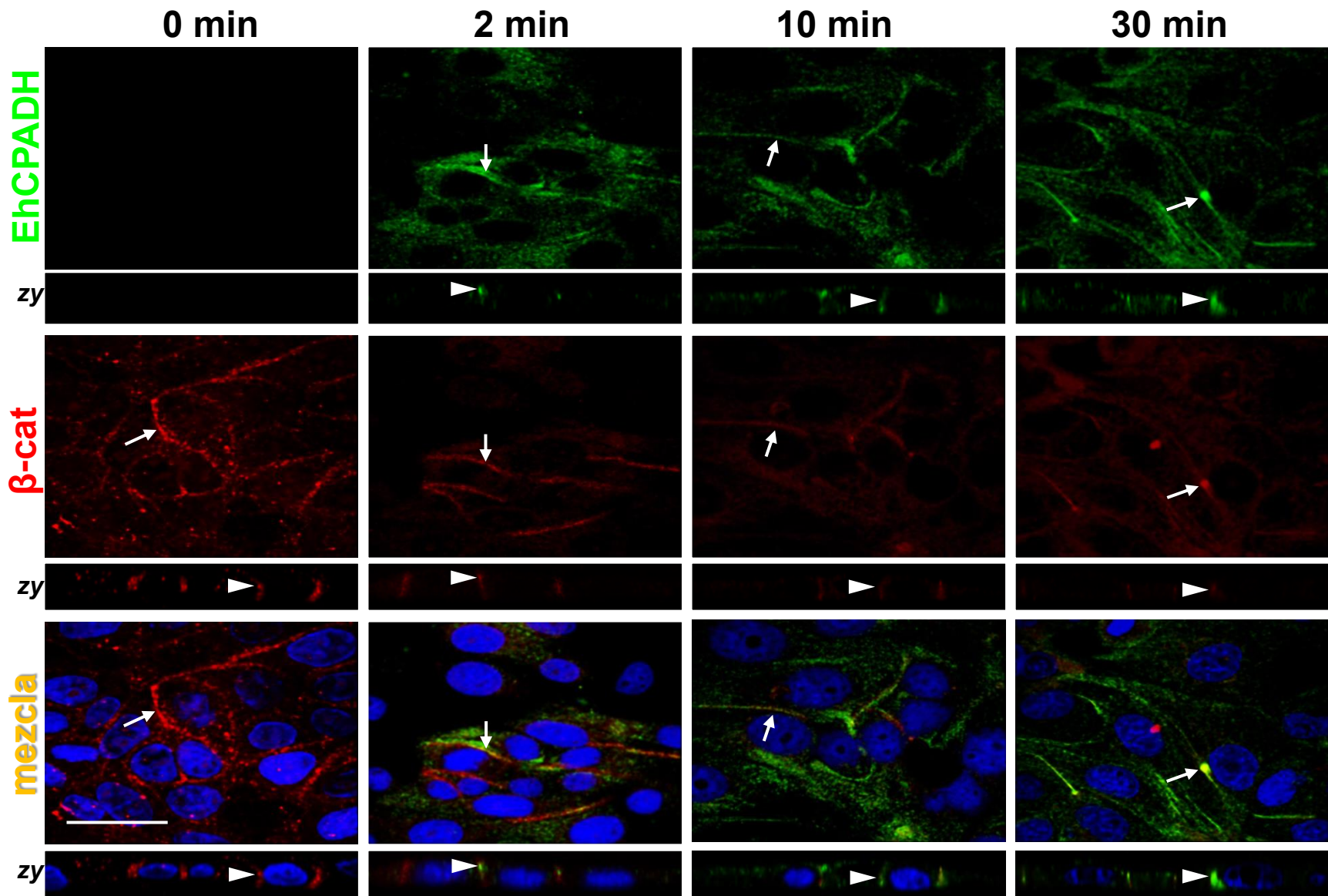


Figura 34. Co-localización de EhCPADH con β -catenina en MDCK tratadas con TC de *E. histolytica*. Células MDCK fueron incubadas con TC a diferentes tiempos. Después de exhaustivos lavados, las células MDCK fueron tratadas para inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos α -EhCPADH y α - β -cat. Flechas: localización en el borde celular. Cabezas de flechas: localización en la membrana lateral. Barra = 10 μ m.

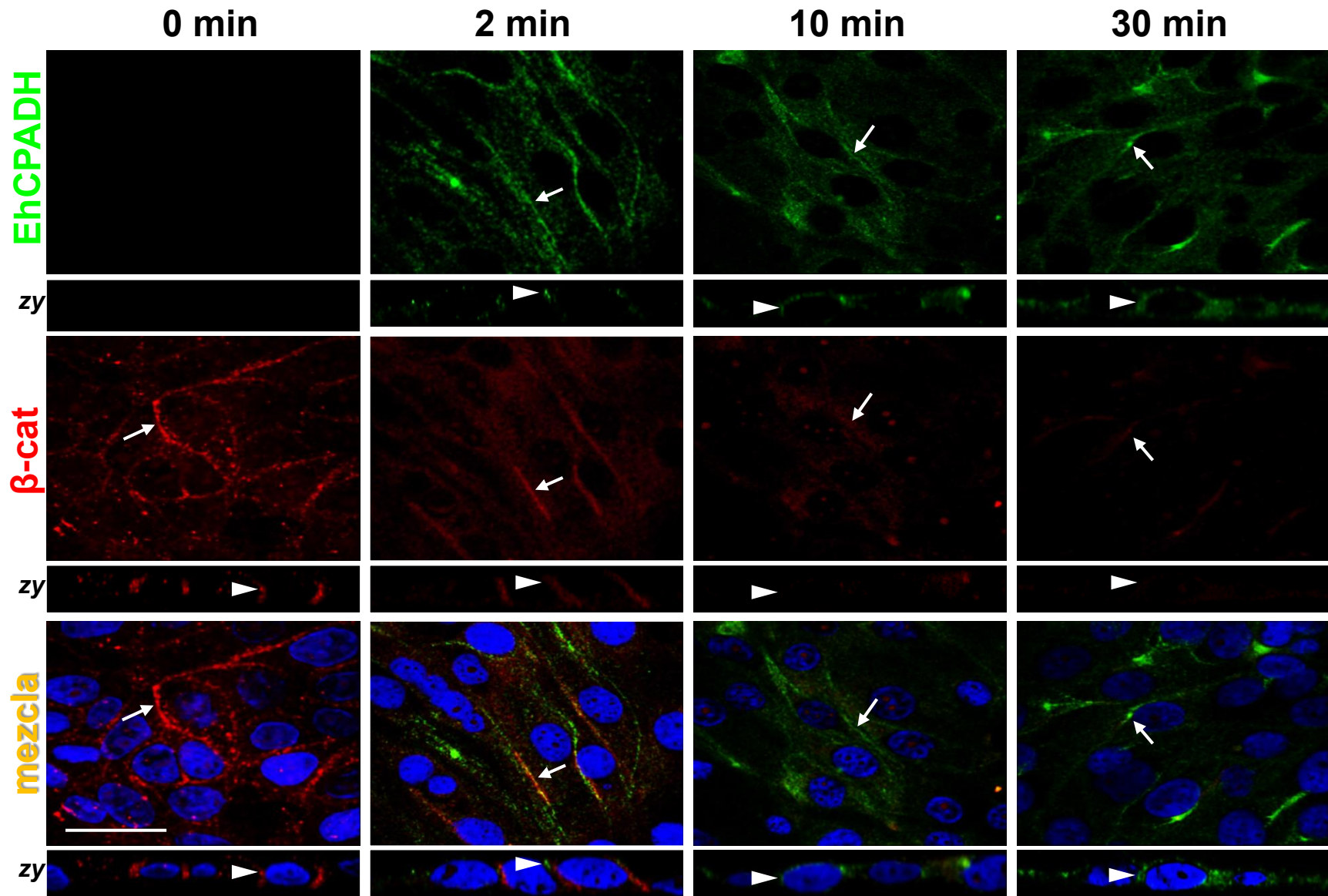


Figura 35. Co-localización de EhCPADH con β -catenina en MDCK tratadas con ET de *E. histolytica*. Células MDCK fueron incubadas con ET a diferentes tiempos. Después de exhaustivos lavados, las células MDCK fueron tratadas para inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos p α -EhCPADH y m α - β -cat. Flechas: localización en el borde celular. Cabezas de flechas: localización en la membrana lateral. Barra = 10 μ m.

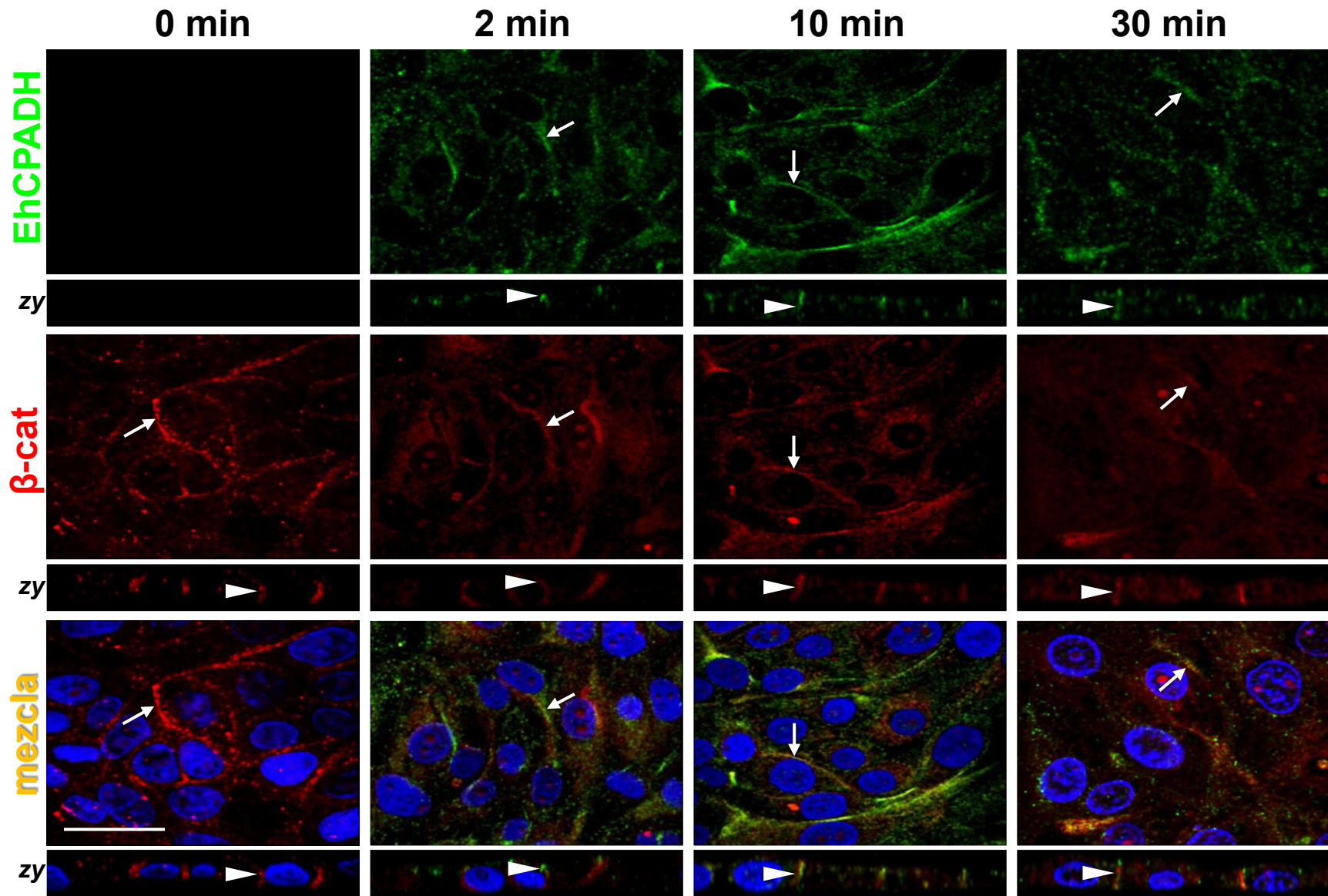


Figura 36. Co-localización de EhCPADH con β -catenina en MDCK tratadas con PS de *E. histolytica*. Células MDCK fueron incubadas con PS a diferentes tiempos. Después de exhaustivos lavados, las células MDCK fueron tratadas para inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos α -EhCPADH y α - β -cat. Flechas: localización en el borde celular. Cabezas de flechas: localización en la membrana lateral. Barra = 10 μ m.

Localización del complejo EhCPADH en los desmosomas

También analizamos si el complejo EhCPADH alcanza otra de las estructuras del CUI, que son los desmosomas, utilizando como marcadores de estas uniones a las Dsp I y II para análisis por MET e IF y a la CK18 para IF.

Co-localización de EhCPADH con Dsp

Debido a que los desmosomas a través MET pueden observarse en células epiteliales como zonas electrodensas (Garrod, *et al.*, 1986), utilizamos esta técnica para corroborar la localización del complejo EhCPADH en este tipo de uniones intercelulares. Además esta técnica nos permite observar con más detalle la ultraestructura de la célula, a nivel del CUI. Mediante la inmunodetección con partículas de oro coloidal en MET, se detectaron con partículas grandes de 30 nm de diámetro a las desmoplaquinas I y II (Dsp), ya que el anticuerpo usado reconoce a ambas isoformas y, con partículas pequeñas de 10 nm de diámetro al complejo EhCPADH. El inmunomarcaje para Dsp permitió localizar a esta proteína en las zonas electrodensas típicas de los desmosomas (Fig. 37 A-D). En tanto que el inmunomarcaje para EhCPADH en células MDCK incubadas con ET por 2 min, no se observó en la zona de los desmosomas, sino en la parte más apical del espacio intercelular (Fig. 37 B), donde se encuentran las UE, confirmando los resultados previamente reportados por nuestro grupo (Betanzos, *et al.*, 2013). En cambio, a los 10 min de interacción, EhCPADH se localizó en los desmosomas (Fig. 37 C). Cuando la invasión del parásito progresa (30 min), el complejo EhCPADH ya no se encontró en los desmosomas, sino que se localizó en el interior celular (Fig. 37 D).

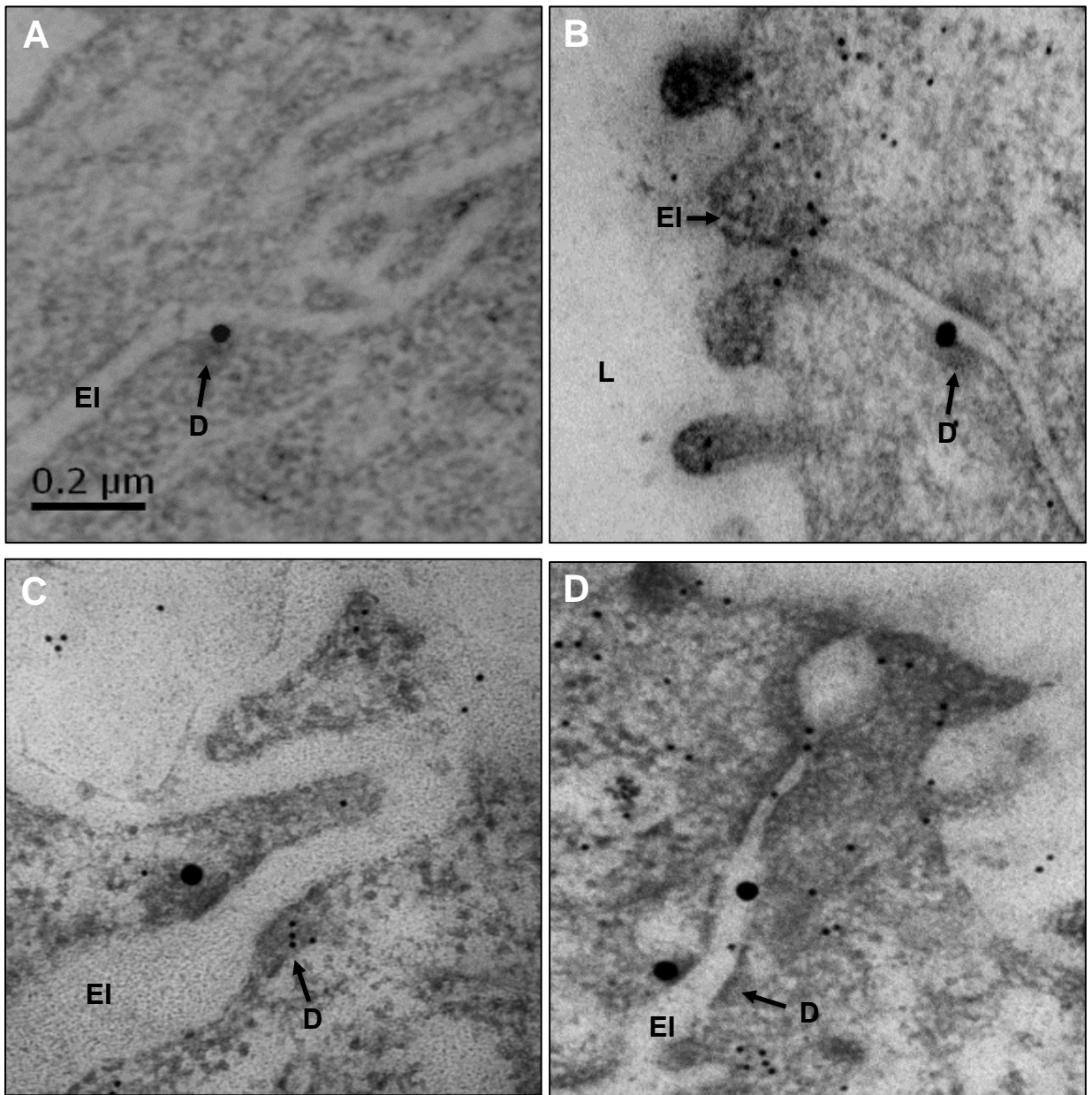


Figura 37. Localización del complejo EhCPADH en los desmosomas. Células MDCK controles (A) o incubadas con ET de *E. histolytica* durante 2 (B), 10 (C) y 30 min (D), fueron tratadas para MET e inmunomarcaje con oro coloidal. Las partículas de 30 nm se acoplaron al anticuerpo α -EhCPADH y las de 10 nm al α -Dsp. D: desmosomas. EI: espacio intercelular. L: lumen.

La co-localización de EhCPAH y Dsp también se corroboró a través de ensayos de IF.

En células MDCK, la Dsp normalmente se localizó en los bordes celulares (Fig. 37-39; tinción roja, 0', flechas), distribuida en la membrana lateral (Fig. 37-39; tinción roja, 0', plano zy, cabezas de flecha). Cuando las células epiteliales fueron tratadas con TC (Fig. 37; tinción roja, 2-30') o ET (Fig. 38; tinción roja, 2-30'), esta proteína se observó disminuida significativamente conforme pasó el tiempo de incubación, siendo casi imperceptible a los 30 min (Fig. 37 y 38; tinción roja, 30'). Es de notar, que con el tratamiento de TC a los 2 min el patrón membranal fue más punteado (Fig. 37; tinción roja, 2', flechas), no tan continuo como en las células control (Fig. 37; tinción roja, 0', flechas). En tanto que los ET, produjeron que la Dsp se re-localizara en el núcleo (Fig. 38; tinción roja, 2' y 10'). La importancia funcional de esta localización será analizada con detalle en futuros estudios.

Por su parte, el complejo EhCPADH describió la misma localización en los bordes celulares, mencionada previamente con los diferentes tratamientos y a los distintos tiempos de interacción analizados (Fig. 37-39; tinción verde, 2-30', flechas). Entretanto, los estudios de co-localización demostraron que con TC y ET, EhCPADH co-localizó más en los contactos intercelulares con la Dsp a los 10 min de interacción (Fig. 37-38; mezcla, 10', flechas) y hubo poca co-localización a los 2 y 30 min (Fig. 37-38; mezcla, 2' y 30').

En células MDCK tratadas con PS, no existió disminución de la Dsp y ésta no cambió su localización en los contactos célula-célula (Fig. 39; tinción roja, 2-30', flechas), co-localizando con la EhCPADH a todos los tiempos analizados (Fig. 39; mezcla, 2-30', flechas). Es de notar que a partir de los 10 min de interacción, ambas proteínas se distribuyeron más a lo largo de la membrana lateral (Fig. 39; mezcla, 10', plano zy, cabezas de flecha), sugiriendo que cuando la invasión de *E. histolytica* progresa, el complejo EhCPADH permea por el espacio paracelular hasta alcanzar a los demosomas.

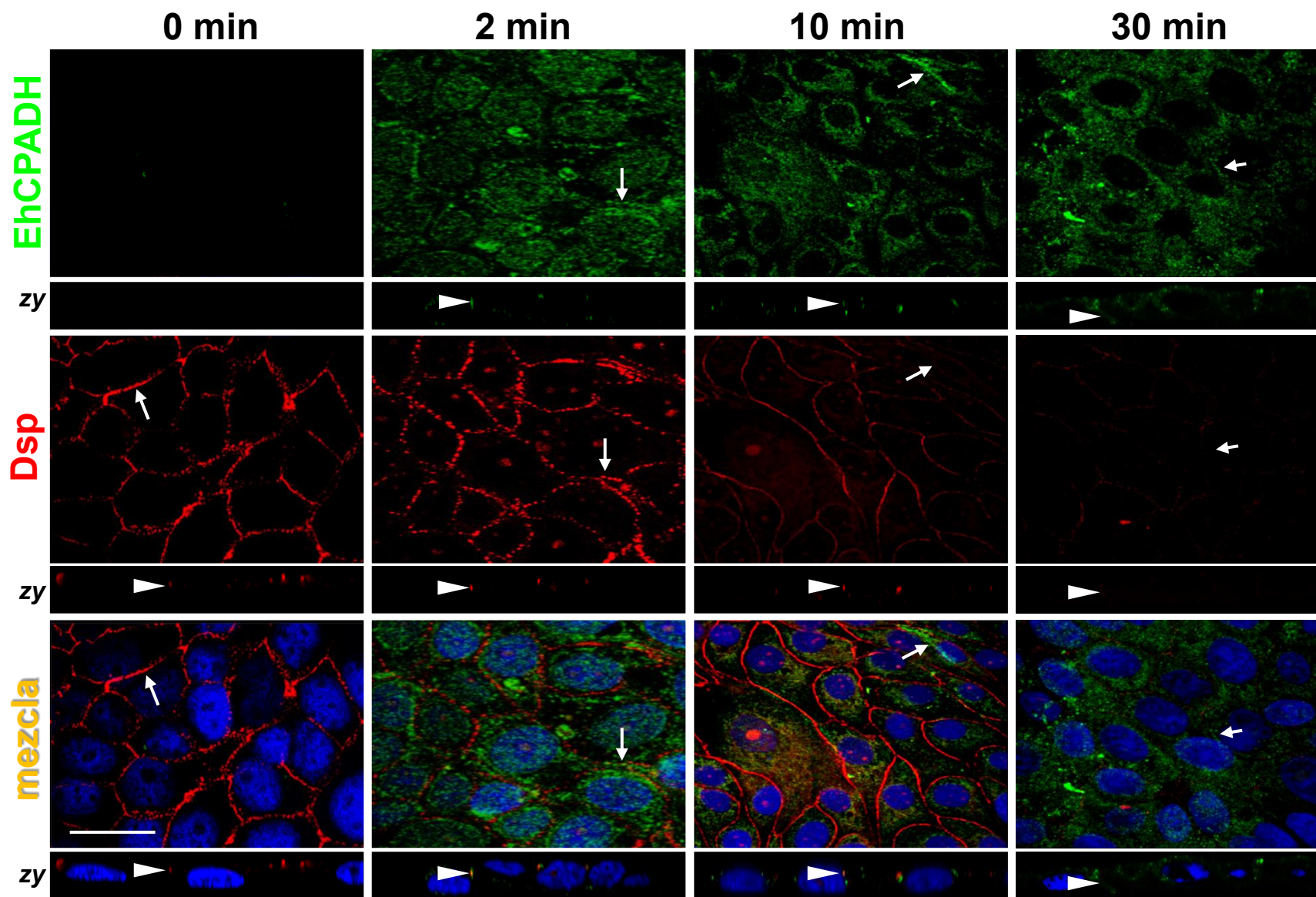


Figura 37. Co-localización de EhCPADH con Dsp en MDCK tratadas con TC de *E. histolytica*. Células MDCK fueron incubadas con TC a diferentes tiempos. Después de exhaustivos lavados, las células MDCK fueron tratadas para inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos α -EhCPADH y $\rho\alpha$ -Dsp. Flechas: localización en el borde celular. Cabezas de flechas: localización en la membrana lateral. Barra = 10 μ m.

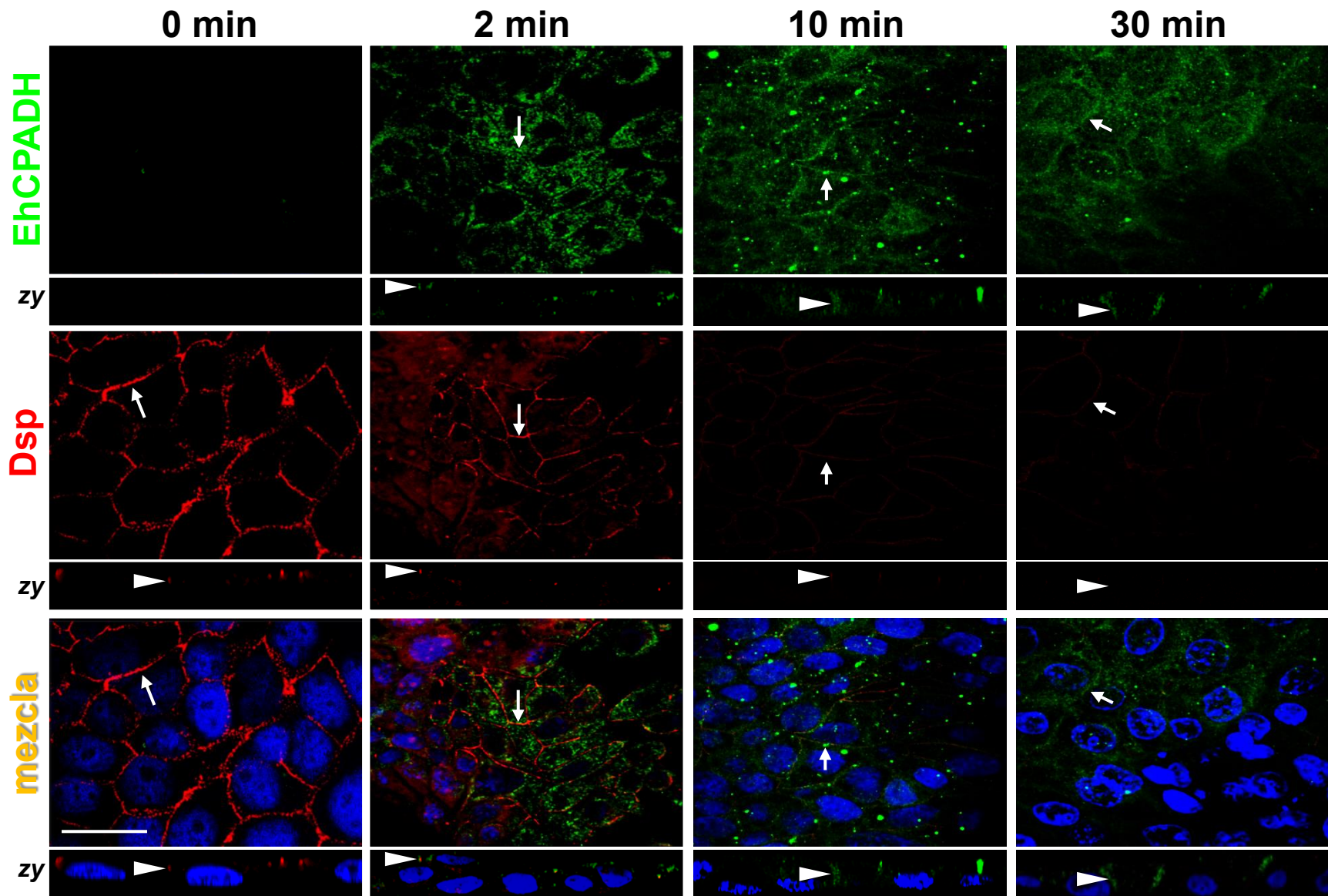


Figura 38. Co-localización de EhCPADH con Dsp en MDCK tratadas con ET de *E. histolytica*. Células MDCK fueron incubadas con ET a diferentes tiempos. Después de exhaustivos lavados, las células MDCK fueron tratadas para inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos α -EhCPADH y α -Dsp. Flechas: localización en el borde celular. Cabezas de flechas: localización en la membrana lateral. Barra = 10 μ m.

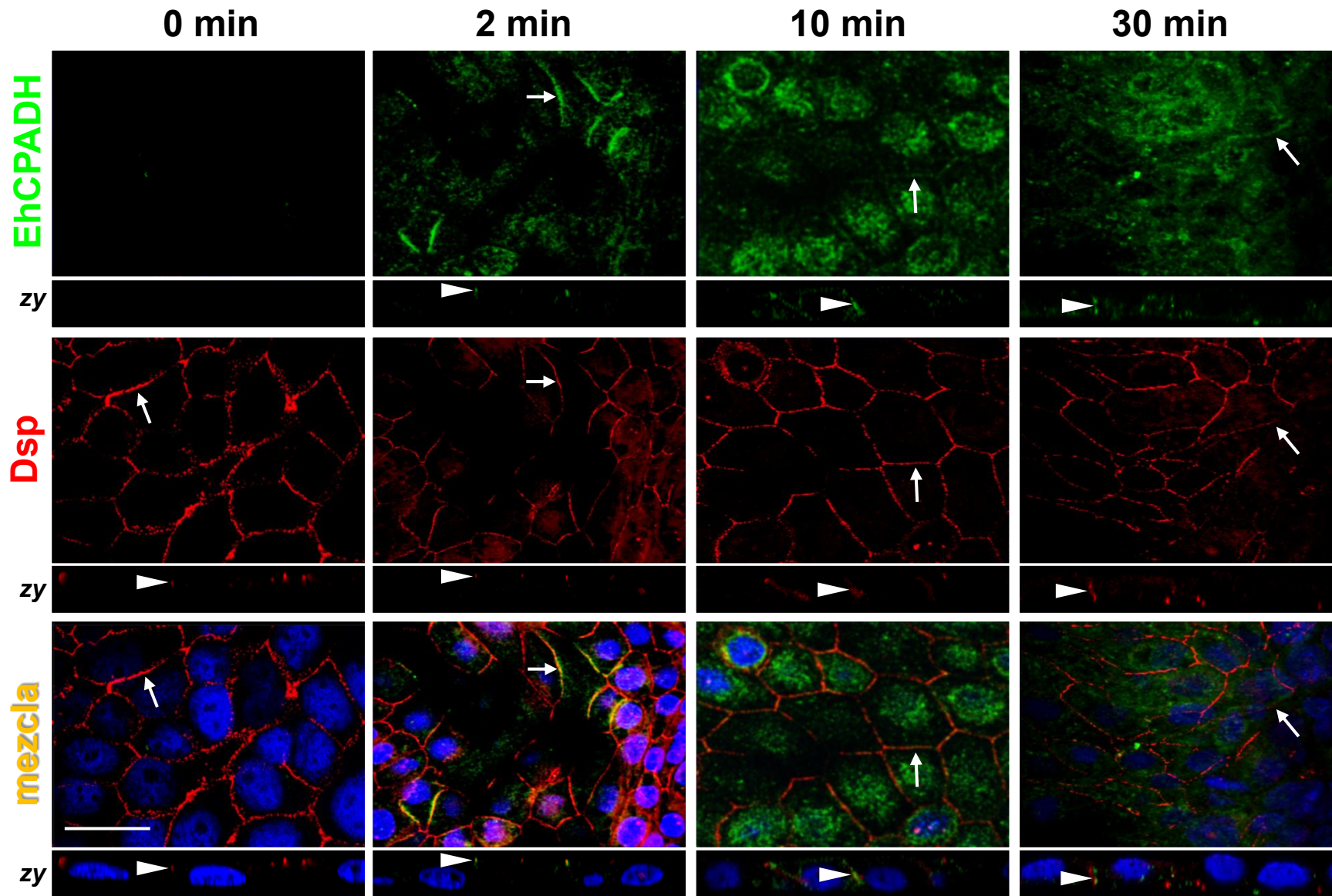


Figura 39. Co-localización de EhCPADH con Dsp en MDCK tratadas con PS de *E. histolytica*. Células MDCK fueron incubadas con PS a diferentes tiempos. Después de exhaustivos lavados, las células MDCK fueron tratadas para inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos α -EhCPADH y α -Dsp. Flechas: localización en el borde celular. Cabezas de flechas: localización en la membrana lateral. Barra = 10 μ m.

Co-localización de EhCPADH con CK18

La proteína de los filamentos intermedios CK18 no presenta un patrón tan definido en la membrana plasmática a nivel de los desmosomas (Seyun, *et al.*, 2013), lo cual pudimos corroborar en nuestros ensayos de inmunofluorescencia, donde además de presentarse en los contactos intercelulares (Fig. 40-42; tinción roja, 0', flechas), se localizó de manera difusa en el citoplasma, en zonas cercanas a la membrana (Fig. 40-42; tinción roja, 0'). Cuando analizamos los cortes laterales de las células, observamos claramente cómo se distribuyó a lo largo de la membrana lateral, con un típico patrón de desmosomas (Fig. 40-42; tinción roja, 0', plano zy, cabezas de flecha).

Con los tratamientos de TC (Fig. 40; tinción roja, 2-30') y ET (Fig. 41; tinción roja, 2-30'), la cantidad de CK18 disminuyó significativamente tanto de la membrana (Fig. 40 y 41; tinción roja, 2-30', flechas), como del interior celular (Fig. 40 y 42; tinción roja, 2-30').

Por su parte, EhCPADH co-localizó con la CK18 en los bordes celulares a partir de los 2 min de interacción con ambos tratamientos (TC y ET) (Fig. 40 y 41; mezcla, 2-30', flechas); aunque la localización fue mayor a los 10 min, por toda la membrana lateral (Fig. 40 y 41; mezcla, 10', plano zy, cabezas de flecha).

En células MDCK tratadas con PS, la cantidad de CK18 aparentemente no se alteró (Fig. 42; tinción roja, 0-30', flechas), confirmando nuestros resultados de degradación (Fig. 28). En los contactos intercelulares, a los 10 min de interacción, la CK18 también co-localizó con EhCPADH (Fig. 42; mezcla, 10 min, flecha). Sin embargo, llama la atención que a los 30 min, la CK18 además de localizarse en la membrana plasmática, también se re-localizó en el núcleo (Fig. 42; tinción roja, 30'). La significancia funcional de esta ubicación nuclear deberá ser explorada en el futuro.

Tomando junto nuestros resultados de MET e IF, podemos concluir que cuando la invasión de *E. histolytica* progresa hacia el epitelio, el complejo EhCPADH alcanza a los desmosomas.

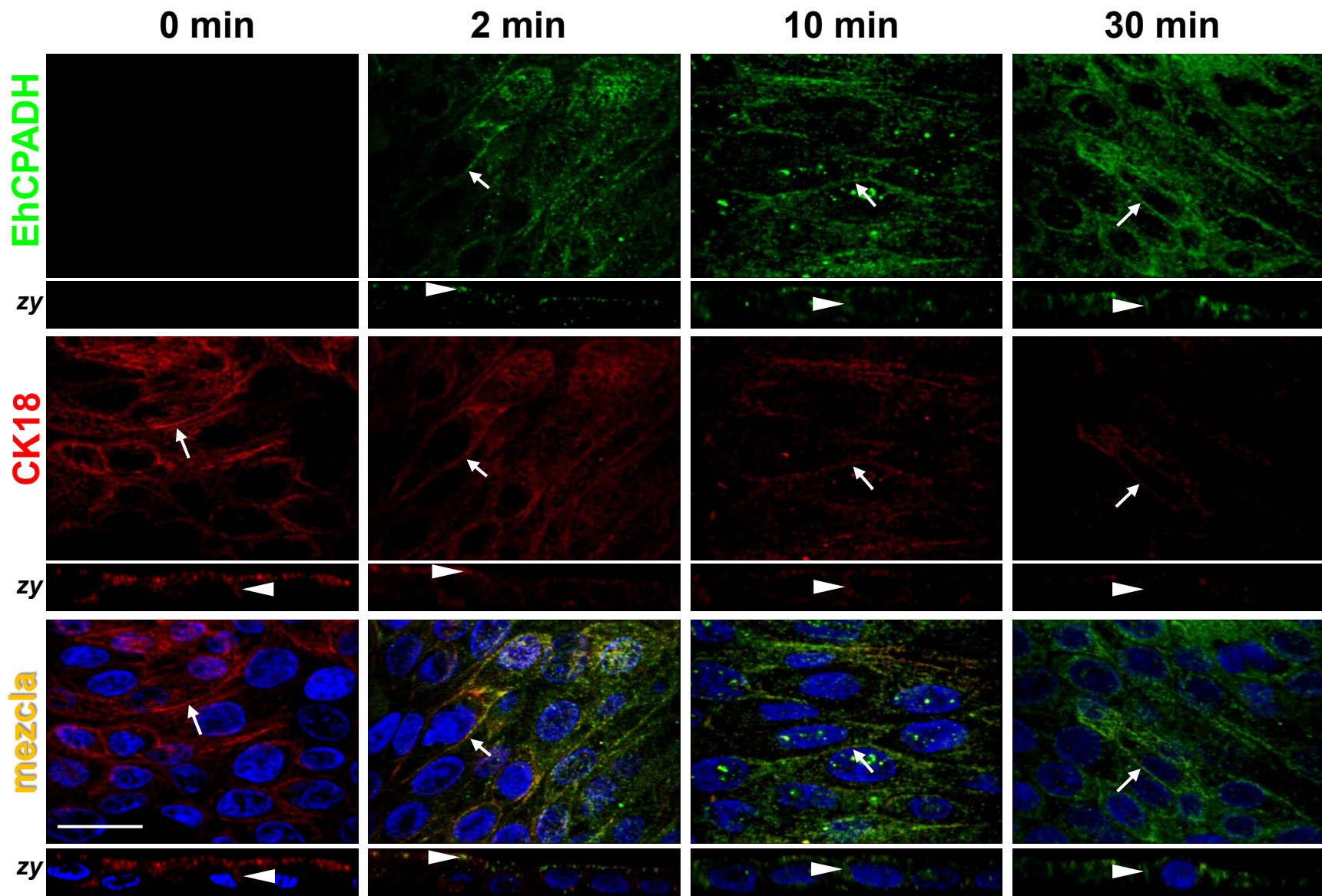


Figura 40. Co-localización de EhCPADH con CK 18 en MDCK tratadas con TC de *E. histolytica*. Células MDCK fueron incubadas con TC a diferentes tiempos. Después de exhaustivos lavados, las células MDCK fueron tratadas para inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos p α -EhCPADH y m α -CK 18. Flechas: localización en el borde celular. Cabezas de flechas: localización en la membrana lateral. Barra = 10 μ m.

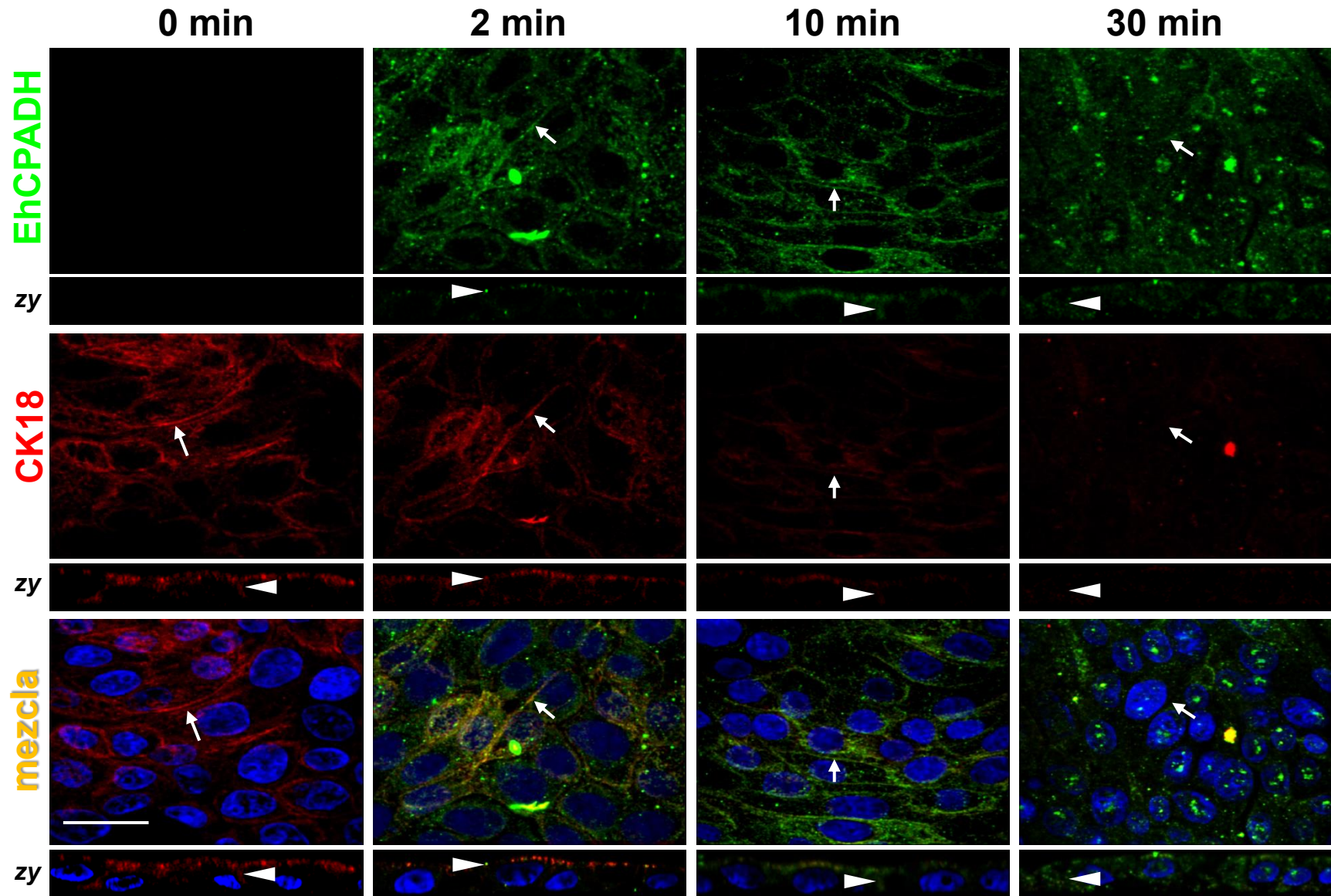


Figura 41. Co-localización de EhCPADH con CK 18 en MDCK tratadas con ET de *E. histolytica*. Células MDCK fueron incubadas con ET a diferentes tiempos. Después de exhaustivos lavados, las células MDCK fueron tratadas para inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos p α -EhCPADH y m α -CK 18. Flechas: localización en el borde celular. Cabezas de flechas: localización en la membrana lateral. Barra = 10 μ m.

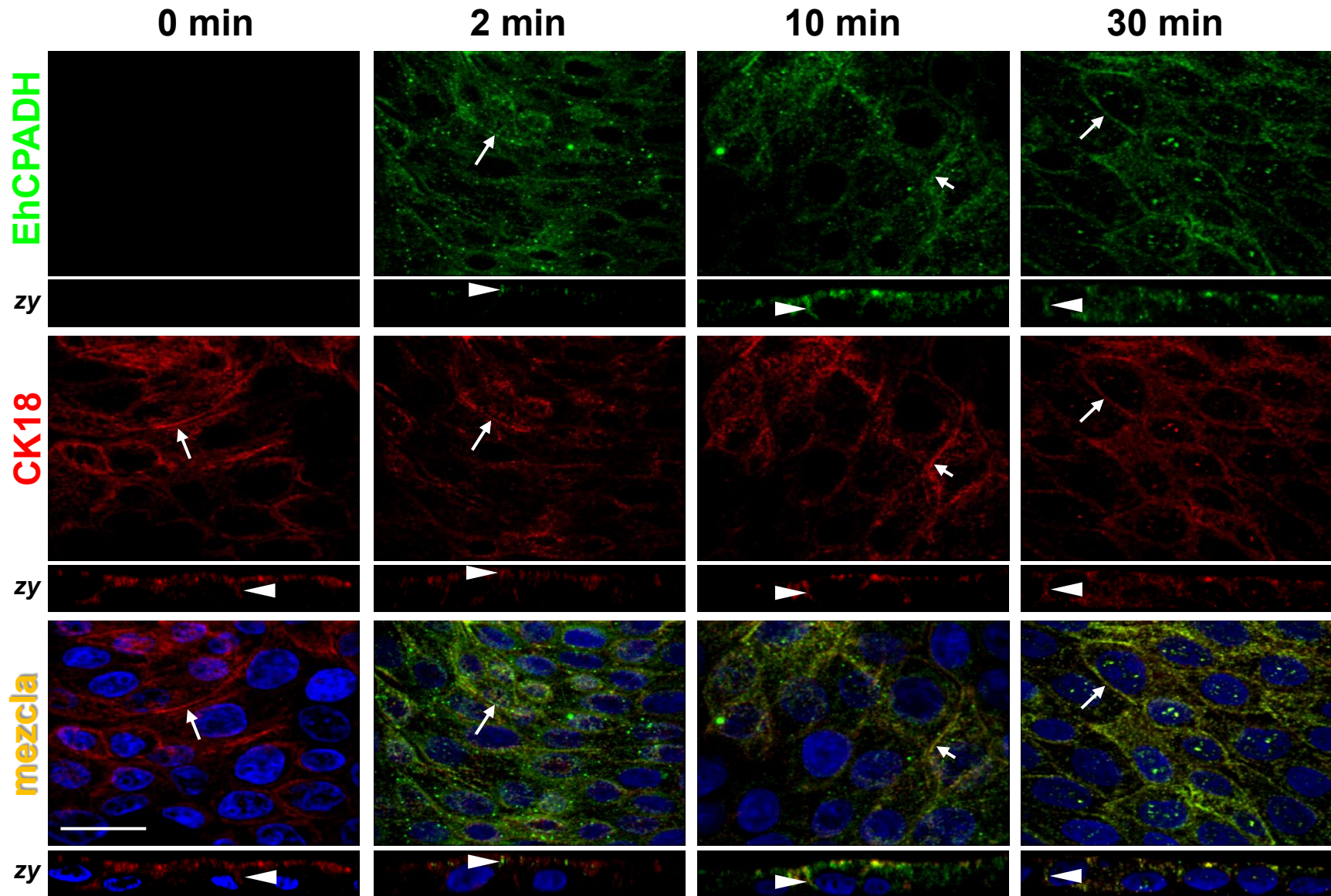


Figura 42. Co-localización de EhCPADH con CK 18 en MDCK tratadas con PS de *E. histolytica*. Células MDCK fueron incubadas con PS a diferentes tiempos. Después de exhaustivos lavados, las células MDCK fueron tratadas para inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos p α -EhCPADH y m α -CK 18. Flechas: localización en el borde celular. Cabezas de flechas: localización en la membrana lateral. Barra = 10 μ m.

EhCPADH se asocia con componentes de la UA y de los desmosomas

Nuestros resultados anteriores sugieren que al compartir la misma localización la EhCPADH y algunos componentes de la UA y de los desmosomas, quizá se encuentren asociados.

Para probar esta hipótesis, llevamos a cabo experimentos de inmunoprecipitación con células MDCK incubadas con ET e inmunoprecipitamos a la proteína EhCPADH con el anticuerpo α -EhCPADH. Como control negativo, también utilizamos suero pre-inmune (SP) para eliminar la inmunoprecipitación inespecífica. Posteriormente, analizamos la presencia de las proteínas de la UA y desmosomales en estos inmunoprecipitados. Para corroborar los pesos moleculares de las proteínas a analizar, utilizamos extractos de amibas (ET) y de células MDCK (EM). A través de ensayos de western blot, confirmamos que inmunoprecipitamos al complejo EhCPADH, ya que solo detectamos una banda de 124 kDa en el inmunoprecipitado con el anticuerpo α -EhCPADH (Fig. 43; primer panel, carril +, flecha) y no con el SP (Fig. 43; primer panel, carril -, flecha). Esta proteína de 124 kDa migró en el mismo peso que la proteína presente en el control de ET (Fig. 43; primer panel, carril ET, flecha). También pudimos observar una banda de menor peso molecular (~100 kDa), que probablemente se deba a un producto de degradación (Fig. 43; primer panel, carril ET y +, cabeza de flecha) y que ya habíamos detectado previamente con este anticuerpo (Fig. 30).

En el inmunoprecipitado con el α -EhCPADH no detectamos la presencia de la proteína de la UA, E-cadherina (Fig. 43; segundo panel, carril +); pero si observamos la precipitación de la β -catenina (Fig. 43: tercer panel, carril +, flecha) y de otra proteína de 120 kDa (Fig. 43: tercer panel, carril +, cabeza de flecha), que probablemente corresponda a p120. Recordemos que el anticuerpo α - β -cat puede reconocer ambas proteínas, como ya nos había ocurrido en otros western blot (Fig. 20). En los EM no detectamos a p120 (Fig. 43; tercer panel, carril EM, cabeza de flecha), probablemente porque necesitamos cargar una mayor cantidad de proteína.

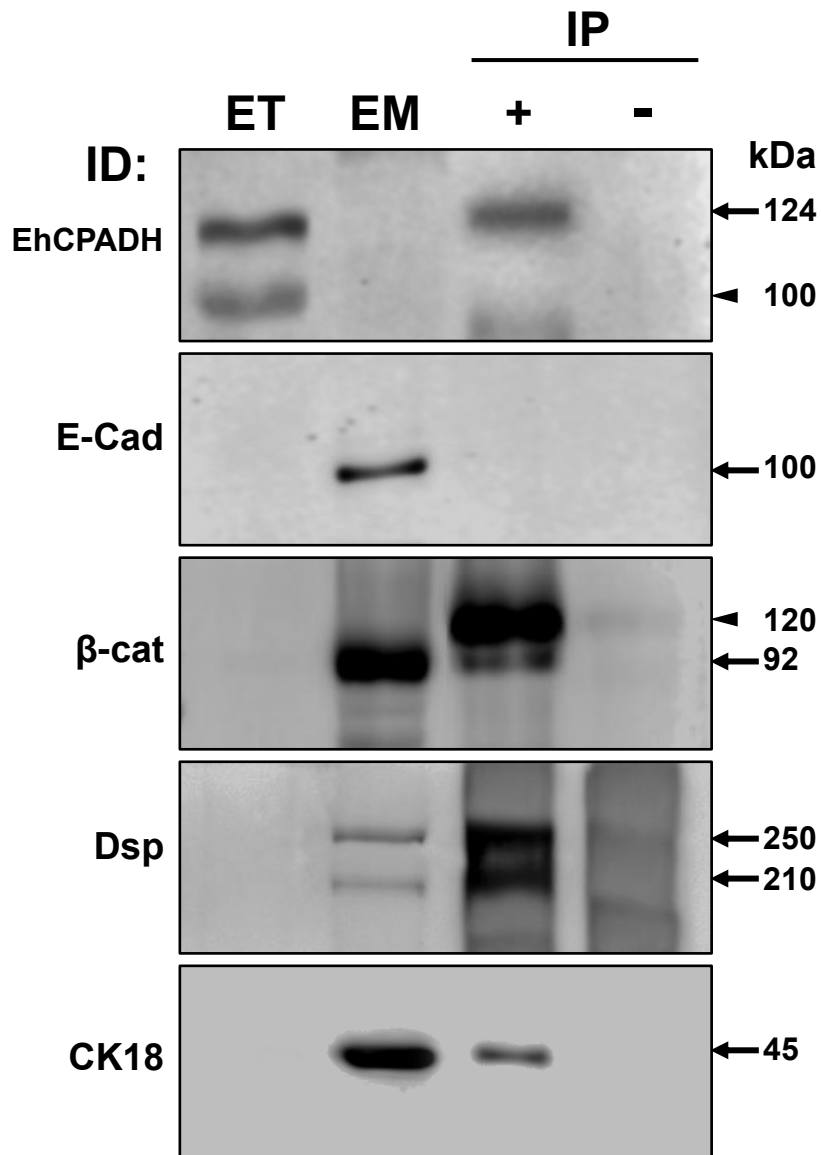


Figura 43. Asociación del complejo EhCPADH con proteínas de la UA y del desmosoma. Células epiteliales MDCK fueron incubadas por 30 min con ET, en presencia de inhibidores de proteasas para evitar la degradación de las interacciones. Posteriormente, llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación (IP) con el anticuerpo α -EhCPADH (+) o con suero pre-immune (-), e inmunodetectamos (ID) a las proteínas referidas. Flechas: tamaño molecular esperado para cada proteína.

En los inmunoprecipitados con α -EhCPADH, también encontramos a las proteínas desmosomales Dsp I, Dsp II (Fig. 43; cuarto panel, carril +, flechas) y a la CK18 (Fig. 43; quinto panel, carril +, flecha).

El peso molecular de las proteínas co-inmunoprecipitadas se corroboró con el que presentan en los EM (Fig. 43; carril EM).

Ninguna de las proteínas analizadas, se detectó en los inmunoprecipitados con SP (Fig. 43; carril -).

Con estos resultados podemos concluir que cuando la amiba *E. histolytica* interacciona con las células MDCK, el complejo EhCPADH se asocia con las proteínas β -catenina, p120, Dsp I, Dsp II y CK18.

IX. DISCUSIÓN

Durante la invasión intestinal por *E. histolytica*, se ha demostrado que uno de los eventos iniciales es la alteración de la barrera epitelial (Martínez-Palomo, *et. al.*, 1985). La manera más fácil de afectar esta barrera es a través del CUI. Al respecto, se sabe que *E. histolytica* es capaz de dañar a las proteínas de la UE (Leroy, *et. al.*, 2000; Betanzos, *et. al.*, 2013). Sin embargo, se desconoce si perturba otras estructuras del CUI, cuando la invasión de *E. histolytica* hacia el epitelio progresa.

En este trabajo inicialmente investigamos si *E. histolytica* era capaz de provocar la degradación de las proteínas que se encuentran conformando a la UA (E-cadherina y β -catenina) y a los desmosomas (Dsp y CK18). Para determinar la integridad de las proteínas de la UA y de los desmosomas, células MDCK fueron incubadas con diferentes condiciones de *E. histolytica*: trofozoito vivo (TC), donde idealmente todas sus moléculas están activas; extractos totales (ET), para hacer más accesibles a las proteínas amibianas y que localizaran más fácilmente a sus blancos epiteliales; y moléculas secretadas al medio (PS), ya que es bien sabido que las proteasas amibianas se secretan, como es el caso de la EhCP112. Los

tiempos de incubación fueron de 2', 10' y 30', debido a que en estudios previos realizados por nuestro grupo, se determinó que a tiempos tempranos (2') se afectan principalmente las UE, de manera que pensamos que a partir de los 10', cuando ya se abrieron las UE, *E. histolytica* podría penetrar hacia el espacio intracelular para alcanzar a las UA y a los desmosomas.

Nuestros resultados nos permitieron concluir que los TC y los ET degradan a las proteínas epiteliales E-cadherina, β -catenina, Dsp y CK18, a partir de los 2 min; además esta degradación es dependiente del tiempo de incubación. En general, los TC fueron más eficientes para degradar a las proteínas analizadas, que los ET; aun cuando la mayoría de las proteasas presentes en los ET fueron activadas con β -mercaptoetanol. El mayor efecto degradativo de los TC se podría deber a que éstos presentan a todas sus proteasas activas y en condiciones nativas. De hecho se ha documentado que cuando se utilizan TC y se evalúa el daño en monocapas epiteliales, el tiempo al que se inicia el daño celular es menor que cuando se utilizan lisados de *E. histolytica* (García-Rivera *et al.*, 1999).

Nuestros resultados también sugieren que las proteínas de la UA se degradan más rápido que las del desmosoma en presencia de *E. histolytica*. Esto probablemente se deba a que los desmosomas son estructuras más resistentes, que proporcionan una mayor estabilidad mecánica al epitelio (Garrod *et al.*, 2008). El hecho de que no observamos este efecto proteolítico en las proteínas de la UA y desmosomales analizadas, cuando las células epiteliales fueron incubadas con PS; a pesar de que se sabe que existen proteasas que son secretadas al medio por los trofozoítos como: EhCP5 y EhCP112 (Chadee *et al.*, 2010; Ocadiz *et al.*, 2005). Sugería la posibilidad de que en nuestras manos, los PS no tuvieran actividad proteolítica, por lo que realizamos geles de sustrato en donde demostramos que los PS degradan la gelatina presente en los geles. De hecho observamos que la mayor actividad proteolítica la tuvo una proteína de ~120 kDa, que pudiera corresponder al complejo EhCPADH. En varios estudios se ha demostrado que la forma funcional más frecuente de las proteínas EhCP y EhADH no es por separado, sino en forma de complejo (EhCPADH) (García-Rivera *et al.*,

1999). Más aún, en los PS inmunodetectamos al complejo EhCPADH. Por lo que sugerimos que la degradación de las proteínas de las UA y del desmosoma, requieren del contacto parásito-huésped. Esto es porque probablemente, las moléculas encargadas de la degradación necesitan algún estímulo o señal de la célula epitelial para activarse. Esto también explicaría por qué los TC fueron más eficientes para degradar que los ET. Al respecto, en estudios anteriores se ha reportado que se necesita de este contacto, para que el trofozoíto pueda transferir ciertas moléculas a la superficie de la célula blanco; como es el caso de la lectina Gal/GalNAc y el lipofosfopeptidoglicano (LPPG), las cuales se han localizado en la membrana lateral de las células epiteliales (Leroy *et al.*, 1995; Lauwaet *et al.*, 2004).

El complejo EhCPADH es un factor de virulencia que participa en la adhesión, citólisis y fagocitosis de las células blanco (García-Rivera *et al.*, 1999). Además, en estudios previos de nuestro grupo se ha demostrado que esta molécula participa directamente en la apertura de las UE (Betanzos *et al.*, 2013). Así que decidimos investigar si EhCPADH también participa en el daño observado en las UA y en los desmosomas. En primer lugar evaluamos si EhCPADH se localizaba en estas estructuras epiteliales, cuando las MDCK fueron incubadas con *E. histolytica*. A través de ensayos de IF, EhCPADH co-localizó con E-cadherina, β -catenina, Dsp y CK18 en los bordes celulares, a partir de los 2 min de incubación. EhCPADH se mantuvo en la región más apical de la membrana lateral, mientras que el resto de las proteínas presentaron un patrón a lo largo de la membrana lateral. Esto lo corroboramos, mediante MET, donde observamos que a este tiempo de incubación, EhCPADH se ubicó en lo que probablemente sea la UE (zona más apical del espacio intercelular) y no co-localizó con la Dsp en los desmosomas. En cambio, a los 10 min de interacción, a través de ensayos de IF, observamos como EhCPADH co-localizó a lo largo de la membrana lateral con las proteínas analizadas; y en la MET detectamos la presencia de EhCPADH en la zona de los desmosomas. Cuando el daño progresa (30 min), aunque el complejo EhCPADH permaneció en los contactos intercelulares, la cantidad de la mayoría de las proteínas analizadas disminuyó, principalmente en la membrana y se

relocalizaron hacia el interior celular o al núcleo. La disminución de estas proteínas en la membrana plasmática y su re-localización hacia el citoplasma, hace que las UA y los desmosomas, pierdan su función como estructuras de adhesión y de estabilidad mecánica.

La disminución de las proteínas desmosomales y de la UA, solo se observó cuando empleamos TC o ET, pero no con PS, confirmando nuestros resultados de degradación. Sin embargo, logramos detectar cambios de re-localización de estas proteínas, hacia el citoplasma y el núcleo.

La localización nuclear de β -catenina, CK18 y Dsp sólo se ha documentado para las dos primeras proteínas. Cuando β -catenina no está unida a la E-caderina, se localiza en el citoplasma, constitutivamente fosforilada por el complejo Axina-APC-GSK3 β , lo que la conduce a su degradación dependiente de ubiquitina en el proteosoma. Sin embargo, en condiciones anómalas, β -catenina no se asocia al complejo Axina-APC-GSK3 β y se acumula en el citoplasma, lo que promueve su re-localización hacia el núcleo donde se asocia al factor de transcripción TCF/LEF, y de esta forma modula la expresión de determinados genes. Estos cambios de localización están relacionados con una gran variedad de enfermedades humanas que incluyen: cáncer, osteoporosis y ciertas enfermedades neurodegenerativas (Wantae *et al.*, 2013). De manera que podríamos especular que durante la invasión de *E. histolytica* hacia el epitelio, la β -catenina nuclear podría modular la expresión de genes epiteliales que ayuden a combatir la invasión o quizá que la favorezcan.

En cuanto a la CK18, estudios previos han demostrado que durante la apoptosis temprana un fragmento de 33 aa de su región carboxilo terminal, liberado por la acción de la caspasa 9, se re-localiza desde el citoesqueleto hacia el nucleólo donde estimula la transcripción del RNAr y lo procesa, evento que culmina con la modulación de la actividad de la topoisomerasa I. Esto conduce a la conservación de la actividad transcripcional, requerida durante los estadios tempranos de la muerte celular programada (Schutte *et al.*, 2009). Al respecto nuestros resultados de IF, detectaron a la CK18 en el nucleólo cuando *E. histolytica* se incubó con las

MDCK. Además estudios previos en nuestro laboratorio, han demostrado inducción de apoptosis temprana durante estos mismos tiempos de interacción (Betanzos *et al.*, 2013). De manera que podríamos sugerir que cuando *E. histolytica* invade al epitelio, provoca la re-localización de CK18, la cual podría inducir la apoptosis de las células epiteliales.

Para Dsp no existen reportes de su localización nuclear, sin embargo, se sabe que interacciona con la placofilina 1, otra proteína desmosomal que sí migra al núcleo, donde se cree que participa en la supervivencia celular mediante un mecanismo que aún se desconoce (Sobolik-Delmaire *et al.*, 2010). De manera que quizá por asociación a la placofilina 1, la Dsp podría viajar al núcleo. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para probar esta hipótesis.

Adicionalmente se han observado otras moléculas de esta amiba en las UA. Tal es el caso de la lectina Gal/GalNac, la cual co-localizó con E-cadherina después de que células epiteliales CaCo-2 se incubaron con TC (Leroy *et al.*, 1995; Lauwaet *et al.*, 2004). Con estos datos y nuestros resultados podemos sugerir que al inicio del contacto entre el epitelio y el parásito, EhCPADH altera a la UE y una vez que se ha abierto la ruta paracelular, EhCPADH y otras moléculas como la lectina Gal/GalNac, alcanzan a las UA.

Dado que el complejo EhCPADH se localiza en las UA y los desmosomas, quisimos investigar si existe alguna asociación con los componentes de estas estructuras, para lo cual llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación. Nuestros resultados nos permiten sugerir que EhCPADH es capaz de asociarse con β -catenina, Dsp y CK18 y no con E-cadherina. Además podemos sugerir que EhCPADH también se está asociando con la proteína de la UA, p120. La catenina p120, al igual que la β -catenina, es miembro de la familia armadillo y es componente esencial de las UA, ya que se une al dominio citoplásmico de las cadherinas. Esta proteína participa en diversos procesos celulares: en la regulación de la integridad de los contactos célula-célula, en el desarrollo embrionario, en la proliferación celular, en la polaridad, en la progresión del cáncer. Además recientes estudios han demostrado que p120 está implicada en la

respuesta anti-inflamatoria durante una infección (Hu *et al.*, 2012). De manera que podríamos sugerir que la asociación de EhCPADH con p120, contribuiría en la respuesta anti-inflamatoria por parte del epitelio, para combatir la invasión de *E. histolytica*. Sin embargo, primero debemos confirmar la asociación entre EhCPADH y p120, mediante el uso de anticuerpos específicos para p120.

Es interesante el hecho de que EhCPADH se una solo a las proteínas submembranales y no a la E-cadherina, que es una proteína transmembranal. Una hipótesis que planteamos es que otras moléculas del parásito, p. ej. la lectina Gal/GalNac, sean las encargadas de asociarse con las proteínas de la parte extracelular de la UA y de los desmosomas y que el complejo EhCPADH tenga como principal función asociarse con las proteínas de la parte intracelular para degradarlas o re-localizarlas. Sin embargo, primero debemos descartar si no existe asociación con otras proteínas integrales de los desmosomas como desmogleina o desmocolina.

Con todo esto podemos sugerir que cuando la amiba *E. histolytica* llega al epitelio, a través del complejo EhCPADH daña las UE y de esta manera la amiba accede al espacio intracelular, donde a través de otras moléculas como la lectina Gal/GalNac, el LPPG y la PGE₂, daña a las proteínas integrales de la UA y de los desmosomas, permitiendo así que la EhCPADH se asocie con las proteínas submembranales, contribuyendo al daño de estas estructuras epiteliales.

Cabe resaltar que este trabajo es el primero en describir daños en los desmosomas, por el parásito *E. histolytica*. Además este estudio, abre la posibilidad de estudiar a las UA y a los desmosomas, como sitios blanco para el desarrollo de fármacos con aplicaciones terapéuticas contra la amibiasis.

X. CONCLUSIONES

- Los trofozoítos vivos y los lisados totales de *E. histolytica* son capaces de degradar a las proteínas de las UA y de los desmosomas, mientras que las proteínas secretadas al medio por los trofozoitos, al parecer no fueron capaces de inducir la degradación de las proteínas epiteliales analizadas.
- El complejo EhCPADH se localiza en las UA y en los desmosomas, a partir de los 2 min de interacción entre los TC y ET con las MDCK; aunque a los 10 min, EhCPADH co-localiza más con la UA y los desmosomas, a lo largo de la membrana lateral.
- Aunque los PS, no degradaron a las proteínas de la UA y de los desmosomas, si afectan su localización, promoviendo su re-localización hacia el citoplasma, núcleo y nucléolo.
- El complejo EhCPADH se asocia con las proteínas β -catenina, Dsp y CK18, facilitando así la degradación de las UA y de los desmosomas, y en general el proceso invasivo de *E. histolytica* hacia el epitelio.

XI. PERSPECTIVAS

- Para determinar el efecto específico del complejo EhCPADH sobre las UA y los desmosomas, se pueden utilizar a las proteínas recombinantes EhCP y EhADH.
- Estudios similares al descrito en esta tesis, también los podemos llevar a cabo en células intestinales como la línea celular CaCo2, ya que es un modelo más aproximado a lo que sucede en el humano. Incluso, podríamos utilizar explantes *ex-vivo* del intestino de ratón para corroborar las alteraciones de las UA y los desmosomas.
- Analizar la relevancia de la re-localización nuclear o nucleolar de las proteínas β -catenina, Dsp y CK18, cuando *E. histolytica* interacciona con el epitelio.
- Corroborar si otras proteínas de la UA y de los desmosomas se asocian con EhCPADH y si son degradadas por *E. histolytica*.
- Usar amibas silenciadas en las proteínas del complejo EhCPADH y analizar su efecto en la cantidad y localización de las proteínas de la UA y los desmosomas.

XII. REFERENCIAS

1. Alavi, M.D. (2007). Amebiasis. Division of Colon and Rectal Surgery, Department of Surgery, University of Minnesota. *Clinical Colon Rectal Surgical*; 20:33–37.
2. Arroyo, R. and Orozco, E (1987) Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Molecular Biochemistry Parasitology*. 23: 151-158. as a virulence factor. *J Exp Med* 158: 1511-1521.
3. Bañuelos C, Garcia-Rivera G, Lopez-Reyes I, Orozco E (2005) Functional characterization of EhADH112: an *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein. *Experimental Parasitology*, 110: 292-297.
4. Betanzos A, Orozco E, Gonzalez-Mariscal L (2013) The EhCPADH112 complex of *Entamoeba histolytica* interacts with tight junction proteins occludin and claudin-1 to produce epithelial damage. *PLoS ONE* 8(6): e65100.
5. Bruce Alberts, (2010). *Biología Molecular de la Célula*, Editorial Omega.
6. Cereijido, M. and Martinez-Palomo, A. (1981). Occluding junctions in cultured epithelial monolayers. *Amer. J. Physiol.* 240, C96-C102.
7. Conde-Bonfil C, Mora-Zerpa C (1992) *Entamoeba histolytica*: un desafío vigente. *Salud Publica* 34:335-341.
8. Cook, G.C (1990) *Parasitic disease in clinical practice*. The Bloomsbury series in clinical science. Springer- Verlag. Lond on. G.B. pp 103-112.
9. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC (1978) A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72: 431–432.
10. Espinoza Castellano M., Martínez Palomo A (2000). Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease, *Clinical Microbiology Reviews*, p 318-331 Vol. 13, No. 2.
11. Faust D.M., Guillen N (2012). Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis.
12. García-Lievano, J (1994) Caracterización inmunobioquímica de un antígeno de superficie de *Entamoeba histolytica* que participa en el contacto con la

- célula blanco. Tesis de Licenciatura (Biología). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN México, D. F.
13. Garcia-Rivera G, Rodriguez MA, Ocadiz R, Martinez-Lopez MC, Arroyo R, et al. (1999) *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol Microbiol* 33: 556–568.
 14. Garrod David and Chidgey Martyn (2008). Desmosome structure, composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778 572–587.
 15. Gonzalez-Mariscal L, Chavez de Ramirez B, Cereijido M (1985) Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J Membr Biol* 86: 113-125.
 16. Guttman JA, Finlay BB (2009). Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim Biophys Acta* 1788: 832-841.
 17. Haque, R., Huston, CD., Hughes, M., Houpt E and Petri, WA Jr (2003). Amebiasis. *New England Journal Medical*. 348 (16). 1565-1573.
 18. Hartsock Andrea and James Nelson. (2008) Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*. March; 1778: 660–669.
 19. Holthöfer Bastian, Windoffer Reinhard, Troyanovsky Sergey and Leube Rudolf E (2007). Structure and Function of Desmosomes. *International Review of Cytology*, Volume 264, ISSN 0074-7696.
 20. Hu G, (2012). p120-Catenin: a novel regulator of innate immunity and inflammation. *Critical Reviews™ in Immunology*, 32:127-138.
 21. Kisson-Singh V, Moreau F, Trusevych E, Chadee K (2013) *Entamoeba histolytica* Exacerbates Epithelial Tight Junction Permeability and Proinflammatory Responses in Muc2(2/2) Mice. *Am J Pathol* 182: 852–865.
 22. Lauwaet T, Oliveira MJ, De Bruyne G, Bruchhaus I, Duchene M, et al. (2004) *Entamoeba histolytica* trophozoites transfer lipophosphopeptidoglycans to enteric cell layers. *Int J Parasitol* 34: 549–556.

23. Lejeune M, Moreau F, Chadee K (2011) Prostaglandin E2 produced by *Entamoeba histolytica* signals via EP4 receptor and alters claudin-4 to increase ion permeability of tight junctions. *Am J Pathol* 179: 807–818.
24. Leroy A, Lauwaet T, De Bruyne G, Cornelissen M, Mareel M (2000) *Entamoeba histolytica* disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers. *FASEB J* 14: 1139–1146.
25. Llop Hernández A., Fonte Galindo L (2001). *Microbiología y Parasitología Médicas*, ISBN: 9597132524, Editorial Ciencias Médicas, La Habana, pp 88-107.
26. M.C. Conde, C. de la Mora-Zerpa (1992). *Entamoeba histolytica*: a standing treat *Salud Pública Mex.*, 34: 335-41.
27. Martinez M, Rodriguez MA, Garcia-Rivera, Sanchez T, Hernandez Pando R, Aguilar D, Orozco E (2009). A pcDNA-Ehcpadh vaccine against *Entamoeba histolytica* elicits a protective Th1-like response in hamster liver. *Vaccine* 27 4176-4186.
28. Martínez Palomo, A (1986) *Biology of Entamoeba histolytica*. In: Amebiasis. A. Martínez-Palomo (ed.) Amsterdam Elsevier Biomedical, pp 11-43.
29. Martinez-Lopez C, Orozco E, Sanchez T, Garcia-Perez RM, Hernandez-Hernandez F, et al. (2004) The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cell Microbiol* 6: 367–376.
30. Niessen Carien M (2007). Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 2525–2532.
31. Ocadiz R, Orozco E, Carrillo E, Quintas LI, Ortega-Lopez J, et al. (2005) EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cell Microbiol* 7:221-232.
32. Panilla Análida Elizabeth, López Myriam Consuelo, Viasus Diego Fernando (2008). Historia del protozoo *Entamoeba histolytica* *Revista Médica de Chile*; 136: 118-124.

33. Petri WA, Jr., Haque Rashidul (2003). Amebiasis. The new england journal of medicine. 348:1565-73.
34. Petri WA, Jr., Schnaar RL (1995) Purification and characterization of galactose- and Nacetylgalactosamine-specific adhesin lectin of *Entamoeba histolytica*. Methods Enzymol 253: 98-104.
35. Ramos Fernando, Morán Patricia, González Enrique, García Gabriela, Ramiro Manuel, Gómez Alejandro, García León María del Carmen, Melendro Emma I., Valadez Alicia and Ximénez Cecilia (2005). High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in rural Mexican community. American Journal of Tropical Medicine Hyg., 73, pp. 87–91.
36. Ravdin, J.I., Croft, B. Y. and Guerrant, R.L. (1980) Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*, Journal of Experimental Medicine 152: 377-390.
37. Reed, S.L., Flores, B.M., Batzer, M.A. and Stein, M.A. (1992) Molecular and cellular characterization of the 29-kilodalton peripheral membrane protein of *Entamoeba histolytica*: Differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates. Infect. Immun. 60: 542-549.
38. Rodriguez Mario Alberto, Hernández Fidel, Santos Leopoldo, Valdez Amelia and Orozco Esther (1989). *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship México D.F., Elsevier, Molecular and Biochemical Parasitology. 37 87-100.
39. Rosales-Encina, J.L., Meza, I., López de León, A., Talamás- Rohana, P. and Rojking, M. (1987) Isolation of a 22-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. J. Infect. Dis. 156: 790-797.
40. Schmidt Ansgar and Koch Peter J (2007). Desmosomes. Just Cell Adhesion or Is There More?. Cell Adhesion & Migration 1:1, 28-32; Landes Bioscience.

41. Schutte B, Henfling ME, Verheyen FK, Li G, Tolstonog GV, Ramaekers FC (2009). The caspase-9 derived C-terminal fragment of cytokeratin 18 modulates topoisomerase action. *Int J Oncol.* 35:625-30.
42. Sobolik-Delmaire T, Reddy R, Pashaj A, Roberts J. James K, Wahl III (2010). Plakophilin-1 Localizes to the nucleus and interacts with single-stranded DNA. *Journal of Investigative Dermatology* 130, 2638-2646.
43. Stanley, S.L. Jr., Becker, A., Kunz-Jenkin, C. and Foster, L. (1990) Cloning and expression of an membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing tandem repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Jul;87:4976-80.
44. Suhrbier A, Garrod D (1986). An investigation of the molecular components of desmosomes in epithelial cells of five vertebrates. *Cell Sci.* 81, 223-242.
45. Trejo-Córdova A (2008). Cadherina-Cadherina: mecanismo de adhesión. UAM-I.
46. Valenta T, Hausmann G, Basler K (2012). The many faces and functions of β -catenin. *The EMBO journal* 31, 2714-2736.
47. Wantae KIM1, Minseong KIM1 and Eek-hoon JHO2 (2013). Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus *Biochem. J.* 450, 9–21 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20121284 9
48. Wei Ye Liu, Zhi Bin Wang, Li Chao Zhang, Xin Wei & Ling Li (2012). Tight Junction in Blood-Brain Barrier: An Overview of Structure, Regulation, and Regulator. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 18 609–615.
49. Weng Yu, Cui Yun, Fang Yuan (2012). Biological Functions of Cytokeratin 18 in Cancer. *Mol Cancer Res* 10; 485-493.
50. WHO (1998) World Health Report. Life in the 21st Century: a vision for all Chap.2, Measuring health: 45-107.
51. Zavala Zendejas Verónica E. y Rendón Huerta Erika P. (2010). Importancia de las Uniones Estrechas en los Epitelios: el papel de las Claudinas. *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXXIV, 1-15. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, México.