

**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Biomedicina Molecular

**EhCortexilina I: caracterización molecular
y celular de una nueva proteína de unión a
actina en *Entamoeba histolytica***

T E S I S

que presenta

María de Lourdes Mejía Hernández

para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

en la Especialidad de

Biomedicina Molecular

Director de tesis:

Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía

Ciudad de México

Agosto 2017

“When a eukaryotic cell is taken out of its physiological context and placed in a plastic or glass Petri dish, it is generally seen to flatten out to some extent. On a precipice, it could behave like a Salvador Dali watch, oozing over the edge. The immediate assumption, particularly in light of the fact that the cell is known to be mostly water by mass and volume, is that the cell is simply a bag of fluid. However, the cell actually has an intricate microstructure within it, framed internally by the components of the cytoskeleton”
-Cooper, 2000

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía** por su confianza al permitirme formar parte de su equipo de trabajo, sus enseñanzas, su paciencia y su apoyo durante la dirección de este trabajo. Le agradezco enormemente.

A la **Dra. Leticia Cedillo Barrón** y al **Dr. Michael Schnoor** por sus atinadas sugerencias y aportaciones a este trabajo.

A **BM. Ma de Jesús Almaraz Barrera** del Departamento de Biomedicina Molecular, por el apoyo técnico para la realización del presente proyecto.

A mis compañeros del laboratorio por compartir su tiempo, espacio, risas y enseñanzas durante este proceso.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme la beca con número 423029 de registro.

DEDICATORIA

“En el mundo, todos los días se rompe un vaso que contiene un mundo entero e intentamos recoger los trozos y mostrarlos a otros, justo así, como creíamos que era ese mundo...pero jamás tendremos su imagen completa, y mucho menos toda la belleza que contenía.”
A mi padre. Por la memoria de mi corazón: te quiero.

Por tus manías, tus locuras, tú sonrisa (que vale un millón de soles) y esa increíble fuerza para querer conocer el mundo. Por tu paciencia, apoyo y cariño. A mi madre, mi amor infinito.

Por sus apariciones constantes, curiosidad y credulidad. Por los buenos tiempos (y los malos también), por cuidarme hoy y siempre. A mis hermanos, mi cariño siempre con ustedes.

Para ellos que sienten partículas de estrellas corriendo a través de sus venas. Mi familia, mis amigos, los quiero enormemente.

A esas chicas con el cabello despeinado y corazones hambrientos. Para Rebeca, Yael, Paola, Eliana, Laura. Las quiero.

Para ellos que jamás se dieron por vencidos, por su entereza, inteligencia y compañerismo. Para los caifanes y el resto del equipo.

Por las aventuras y tiempo compartido. A ti, mi serendipia. Te quiero millones.

Y: “Te quiero a pesar de tus pulgas y de tu mal aliento, y de tus remolinos a cada lado del cuello, pese a tus lagañas y nariz mojada y el inconveniente que se te cae el pelo. Pero por tu empeño en hablar español y por tus labios negros: te quiero”. A Karenina

CONTENIDO

ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Aspectos generales de <i>Entamoeba histolytica</i> .	11
1.1.1 Epidemiología de la amebiasis	12
1.1.2 Morfología de <i>E. histolytica</i>	13
1.1.3 Ciclo de vida	15
1.2 Mecanismos patogénicos de <i>E. histolytica</i> .	17
1.2.1 Adherencia	18
1.2.2 Citotoxicidad dependiente del contacto.	19
1.2.3 Fagocitosis	20
1.2.4 Migración celular	21
1.2.5 Polarización y formación de uroide.	22
1.3 Citoesqueleto de actina en eucariontes superiores.	24
1.4 Proteínas que se unen a actina (<i>Acting-binding proteins</i>).	26
1.5 Citoesqueleto de actina y ABP's en <i>E. histolytica</i> .	27
1.6 Cortexilinas	30
2. ANTECEDENTES	34
3. JUSTIFICACIÓN	35
4. HIPÓTESIS	36
5. OBJETIVOS	36
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	37
6.1. Análisis <i>in silico</i> de EhCortexilina I	37
6.2 Cultivo celular	37
6.2.1 Cultivo de <i>E. histolytica</i>	37
6.2.2 Cultivo de cepas DH5 α y BL21-DE3 de <i>Escherichia coli</i>	38
6.2.3. Cultivo de línea celular MDCK	38
6.3 Generación de vectores	38
6.3.1 Amplificación clonación de la región carboxilo del gen EhCortexilina I en PCR2.1	38
6.3.2 Subclonación en vectores de expresión	39
6.4 Amplificación de DNA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	40
6.5 Electroforesis en geles de agarosa	40
6.6 Digestiones con enzimas de restricción	41
6.7 Obtención y purificación de DNA plasmídico	41
6.7.1 Purificación de plásmidos	41
6.7.2 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	42
6.8 Ligaciones de DNA	42

6.9 Preparación de bacterias competentes	43
6.10 Transformaciones de células competentes	43
6.11 Análisis de construcciones moleculares mediante PCR de colonia (<i>PCR colony</i>)	44
6.12 Electroporación de <i>E. histolytica</i> con vector pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV	44
6.13 Extracción de proteínas totales de <i>E. histolytica</i>	45
6.14 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).	45
6.15 Ensayo tipo Western blot	46
6.16 Ensayo de inmunoprecipitación proteína recombinante pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV	46
6.17 Análisis celular	47
6.17.1 Ensayo de proliferación	47
6.17.2 Ensayo de migración de transfectantes pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV	48
6.17.3 Efecto citopático de transfectantes pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV	48
6.17.4 Ensayo de adhesión a mucosaca de células MDCK de transfectantes pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV	50
6.18 Inmunofluorescencia y microscopia confocal	50
6.19 Inducción de proteínas recombinantes	51
6.19.1 Purificación de proteínas recombinantes solubles	52
6.19.2 Purificación de proteínas recombinantes con cuerpos de inclusión.	52
6.19.3 Purificación de EhCdc42 acoplada a polihistidinas.	53
6.20 Marcaje radiactivo de proteínas	54
6.21 Análisis de interacción proteica.	54
6.21.1 <i>Dot blots</i> lipídicos.	54
6.21.2 <i>Overlay</i> proteína-proteína.	55
7. RESULTADOS	56
7.1 Análisis <i>in silico</i> de EhCortexilina I en <i>E. histolytica</i>	56
7.2 Generación de proteínas recombinantes en vector de expresión amibiano pExEhNeo y de inducción pGEX2TK	64
7.3 Transfección y análisis de proteína recombinante pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV	67
7.4 Identificación de complejos proteicos asociados a pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV	68
7.5 Análisis de la función de pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV en ensayos celulares	70
7.5.1 Cinética de proliferación.	70
7.5.2 Migración de células transfectantes pExEhNeo/CTXI (317-753)-HSV	71
7.5.3 Capacidad citopática de transfectantes pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV	72
7.5.4 Adhesión de transfectantes pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV	73
7.5 Localización celular de pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV	74
7.6 Interacción de la proteína recombinante GST/CTXIΔ (1-316) con fosfoinositidos	77
7.7 Interacción de la proteína recombinante GST/CTXIΔ (1-316) con RhoGTPasas.	78
8. DISCUSIÓN	80
9. CONCLUSIONES	94
10. PERSPECTIVAS	94
11. LITERATURA CITADA	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadios celulares de <i>E. histolytica</i> .	14
Figura 2. Ciclo de vida <i>E. histolytica</i> .	16
Figura 3. Modelo de la invasión del epitelio intestinal por <i>E. histolytica</i> .	17
Figura 4. Fagocitosis y trogocitosis amebiana.	20
Figura 5. Representación esquemática de la arquitectura y mecanismos de movimiento de una célula eucarionte.	25
Figura 6. Forma y tamaño de células silvestres y mutantes faltantes de una isoforma de cortexilina o ambas en <i>D. discoideum</i> .	30
Figura 7. Representación esquemática del homodímero de cortexilina I en <i>D. discoideum</i>	31
Figura 8. Representación gráfica de las regiones génicas y dominios de EhCortexilina I	56
Figura 9. Multialineamiento de proteínas de la familia de Cortexilinas en <i>E. histolytica</i> .	58
Figura 10. Cortexilina I en diferentes especies de Entamoeba.	59
Figura 11. Multialineamientos de dominios de Homología con Calponina CH en Cortexilinas de <i>E. histolytica</i> y otras ABP's.	60
Figura 12. Modelado por homología de dominios de homología con calponina CH em EhCortexilina I	61
Figura 13. Alineamientos de regiones hipotéticas identificadas en la región carboxilo terminal de EhCTXI.	62
Figura 14. Amplificación por PCR de la región carboxilo terminal de EhCortexilina I (A) y Análisis de PCR de las colonias de EhCTXIΔ (1-316) en PCR2.1 con sitios KpnI/BamHI (B) y para subclonación en vector pGEX-2TK (C).	64
Figura 15. Análisis de restricción de colonias positivas en el vector PCR2.1 (A). Digestión del vector pExEhNeo (B) y pGEX-2TK (C) para subclonaciones.	65
Figura 16. PCR de colonia y análisis de restricción en vectores finales de clonación	66
Figura 17. Proteínas totales obtenidas de transfectantes pExEhNeo/CTXIΔ (1-316) y detección de proteína recombinante en células transfectadas	67
Figura 18. Inmunoprecipitación de la región pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)	69
Figura 19. Cinética de proliferación de transfectantes pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV	70
Figura 20. Porcentaje de migración de células transfectadas pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV	71
Figura 21. Porcentaje de destrucción de monocapa	72
Figura 22. Porcentaje de células transfectantes adheridas a monocapa MDCK	73
Figura 23. Localización celular de la proteína pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV en diferentes condiciones.	75
Figura 24. Localización de pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV en la formación de uroide celular.	76
Figura 25. La proteína fusión GST/CTXIΔ (1-316) interactúa con fosfoinosítidos	77
Figura 26. La proteína recombinante GST/CTXIΔ (1-316) interactúa con GTPasas de la familia Rho.	78
Figura 27. Modelo propuesto de EhCortexilina I-Δ (1-316) en <i>E. histolytica</i>	90

ABREVIATURAS

ABP	Proteínas de unión a filamentos de actina
ABS	Sitio de unión a filamentos de actina
ABD	Dominio de unión a actina
CH1	Dominio de homología con Calponina 1
CH2	Dominio de homología con Calponina 2
DNA	Ácido desoxiribonucleico
FH3	Formin homology domain 3
GBD	GTPase binding domain
h	Horas
HSV	Herpes simplex virus
Kb	Kilobases
M	Molar
Mb	Megabases
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
pb	Pares de bases
PtdIns(3)P	Fosfatidilinositol-3-fosfato
PtdIns(5)P	Fosfatidilinositol-5-fosfato
PI (4,5) P₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3 fosfato
PIP2	Fosfatidilinositol-2-fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
vol	Volumen
µl	Microlitros
µm	Micrometros
°C	Grados Celsius

RESUMEN

Entamoeba histolytica, es un protozooario capaz de invadir la mucosa intestinal y causar amebiasis. El proceso invasivo del parásito requiere de la adhesión a las células del hospedero y una alta motilidad del mismo, lo cual implica la participación del citoesqueleto de actina. Moléculas tales como las "actin binding proteins" (ABP's) tienen una participación importante en la conformación de estructuras celulares altamente especializadas en coparticipación con la actina filamentosa o F-actina. Diversos grupos de investigación han estudiado diferentes tipos de proteínas que se unen a F-actina y que participen en el proceso invasivo del parásito. Ejemplo de esto, en el grupo de MacFarlane y Singh (2006) reportaron que probablemente la proteína ABP EhCortexilina I de *E. histolytica* podría tener alguna participación en la patogenia de este parásito. Por lo que este trabajo tiene como objetivo caracterizar a la proteína EhCortexilina I mediante ensayos moleculares, celulares y bioquímicos. Mediante un análisis *in silico*, de la proteína EhCortexilina de *E. histolytica*, detectamos que esta proteína posee en la región amino terminal un dominio del tipo CH1-CH2 (con el 30% de identidad) y hacia la región carboxilo terminal, un dominio *coiled-coil* el cual le permite dimerizar con sus proteínas hermanas, así como una región de unión a fosfoinosítidos e interesantemente identificamos la presencia de un dominio hipotético GBD-FH3 (con el 16% de identidad), un dominio que se encuentra presente en la familia de las forminas y que su función está relacionada en la formación de estructuras como los filopodios en asociación con las pequeñas GTPasas de la familia Rho. El gene de EhCortexilina, está constituido por 2,376 pb, y cuenta con dos regiones intrónicas (66-127; 430-484), El RNAm de esta proteína codifica para un proteína de 89.2 kDa. Debido a que el gen de la proteína posee dos secuencias intrónicas, nos ha dificultado su amplificación y estudio de esta molécula; por ello que en este trabajo reportamos los hallazgos experimentales funcionales la región carboxilo de la proteína EhCortexilina I a través de la generación los trofozoitos transfectantes pExEhNeo/CTXIA (1-316)-HSV. Los resultados mostraron que la sobre expresión de la proteína CTXIA (1-316)-HSV en los trofozoitos de *E. histolytica*, afectó la adherencia a las células epiteliales de la línea celular MDCK hasta un 20% así como hasta en un 50% su migración celular. Sin embargo no se ven afectados los procesos celulares tales como la citopatogenicidad del parásito ni su proliferación celular. Estos resultados nos indicaron que probablemente la región 317-753aa de este parásito este propiciando la formación de estructuras para la adhesión celular y entorpeciendo la maquinaria para la migración del parásito. Adicionalmente, logramos encontrar que al estimular a los trofozoitos de *E. histolytica* con la lectina Concaivalina A, permite un reclutamiento de la proteína recombinante CTXIA (1-316)-HSV hacia la formación del uroide de la célula. Por otro lado, logramos determinar que la región CTXIA (1-316)-HSV es capaz de interactuar con los lípidos PtdIns (3) P y PtdIns(5) P, difiriendo de lo reportado con su proteína ortóloga en *D. discoideum* y con relación a los reportado para otras ABP's que poseen dominios similares a ella. Finalmente mediante ensayos de *overlay* con GTPasas de la familia Rho, encontramos que esta región de EhCortexilina I interactúa con proteínas como EhRho I, EhRac A, EhRacC y EhRac G; los cuales se conoce que participan el proceso de capping y además en la formación de fibras de estrés en la parte posterior de la célula. Esto es relevante ya que EhCortexilina es capaz de unirse a GTPasas de la familia Rho directamente y no requiere de otras proteínas andamio para su regulación, tal como lo hace su proteína hermana en *D. discoideum*.

ABSTRACT

Entamoeba histolytica, is a protozoan capable of invading the intestinal mucosa and causing amebiasis. The invasive process of the parasite requires the adhesion to the host cells and a high motility, which implies the actin cytoskeleton participation. Molecules such as ABPs play an important role in the conformation of particular structures with actin filaments, depending on the cellular context, for example, MacFarlan and Singh in 2006 found the EhCortexilin I an ABP protein, have a role in the pathogenesis of the parasite. Therefore, this work aims to characterize EhCortexilin I by molecular, cellular and biochemical assays. *In silico* analysis revealed that EhCortexilin protein possesses a CH1-CH2 domain (31 and 20% identity score, respectively) in the amino-terminal region and towards the carboxyl terminal region, a coiled-coil domain which allows the dimerization with other similar proteins, also a phosphoinositides binding site and interestingly we identified the presence of a hypothetical domain GBD-FH3 (16% score identity), which are present in the formins family proteins, which is a target on the Rho small GTPases. The generation of pExEhNeo/CXTIΔ (1-316) *E. histolytica* transfectants cells to overexpress this region showed that the adhesion on MDCK monolayer cellular was affected in a 20%; as well as their cellular migration was affected until 50%, however the cytopathogenicity of the parasite as well as its proliferation were not affected. All these results suggest that C-terminal region from EhCortexilin I probably favors the structures formation for cell adhesion and the same time structures that they hinder the machinery for the cellular migration of the parasite. In addition to this, we found that stimulating these cells with Concanavalin A, it allows a recruitment of the recombinant protein towards uroid region of the cells. On the other hand, the overlay assays such as lipid-protein and protein-protein interaction assays using the [γ -P³²] ATP-GST/EhCTX1 as a probe showed that the EhCortexilin I Δ (1-316) protein is able to interact with PtdIns (3) P and PtdIns (5) P, lipids differing from that reported with its orthologous protein in *D. discoideum* and in relation to those reported for other ABP's which have domains similar to it. This indicates that the protein is likely to be recruited into specific compartments at the membrane and endocytic vesicles. By overlay assays with Rho GTPases, we discovered that this region of EhCortexilin I interacts with proteins like EhRho1, EhRac A, EhRacC and EhRac G; which are known to participate in the capping process and also in the formation of stress fibers in the back of the cell. This is relevant because EhCortexilin is able to bind to Rho GTPases directly and does not require other scaffold proteins for its regulation, like its sister protein in *D. discoideum* does.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales de *Entamoeba histolytica*.

Existen diversas especies que pertenecen al género *Entamoeba* y al menos ocho de ellas infectan a los humanos: *Entamoeba dispar*, *E. coli*, *E. moshkovskii*, *E. hartmanni*, *E. polecki*, *E. gingivalis*, *E. bangladeshi* y *E. histolytica*. Esta última es la única que ha sido universalmente reconocida como la causante de enfermedades intestinales y extraintestinales en humanos.

E. histolytica, el agente causal de la amebiasis, es la segunda causa importante de la mortalidad por infecciones intestinales parasitarias. La amebiasis fue responsable de la muerte de 55,500 personas a lo largo del mundo en el 2010. Sin embargo, no todas las infecciones por *E. histolytica* conllevan al desarrollo de la enfermedad en el hospedero y al menos 1 de cada 10 individuos afectados progresan al desarrollo de síntomas clínicos (Ali, 2015).

A pesar del progreso en el tratamiento de esta enfermedad, el parásito continua siendo un problema de salubridad pública en la mayor parte del mundo y ha re-emergido en algunas áreas controladas (Stanley, 2003).

Debido a la escasez de drogas disponibles para esta parasitosis, la resistencia a fármacos es una preocupación importante. La mejora en el entendimiento de la patogénesis del parásito y la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos son clave para combatir la enfermedad (Wassmann y col; 1999).

1.1.1 Epidemiología de la amebiasis

Aproximadamente 10% de la población mundial se encuentra infectada con *E. histolytica* o *E. dispar*; sin embargo sólo 1 de 10 individuos es infectado con la forma patógena de *E. histolytica*, siendo esto un riesgo para el desarrollo de amebiasis invasiva (Zlobl, 2001). El porcentaje de personas infectadas varía de región a región. Su distribución es diversa y existe un riesgo significativo en zonas dónde la contaminación de alimentos y agua es alta. El parásito es categorizado como la segunda causa más importante de la mortalidad por enfermedades parasitarias alrededor del mundo y requiere de un mejor tratamiento de salud pública (Stanley, 2003). Alrededor de 50 millones de personas al año se infecta con el parásito; no obstante, sólo 5 millones desarrollan la enfermedad, resultando en 100,000 muertes anuales (Chacin-Bonilla, 2013). La prevalencia mundial de *E. histolytica* no es bien conocida, esto por la existencia de diferentes formas que morfológicamente son idénticas pero genéticamente distintas (*E. dispar* y *E. moshkovskii* las cuales son no patógenas) (Ali y col; 2008). Esto particularmente es relevante para el continente africano así como otros países en desarrollo en el mundo dónde hay una carencia de herramientas específicas de diagnóstico. El rango de prevalencia es de 1-40% en América Central y Sur, Asia y África.

Por otro lado, la prevalencia en países industrializados es de 0.2% a 13.8% (Haque y col; 2006). A pesar de que la enfermedad se desarrolla principalmente en países subdesarrollados, también puede encontrarse en viajeros que han regresado de áreas endémicas, inmigrantes, entre otros (Mortimer y Chadee, 2010). Los rangos de mortalidad de la amebiasis varían de acuerdo al estado de enfermedad y gran parte de ellas ocurre en regiones en desarrollo. En infantes, aquellos que tienen disentería amebiana moderada el rango es menor de 1%. La mortalidad incrementa a 40% cuando existen complicaciones como perforaciones gastrointestinales o peritonitis. Los valores de incidencia entre los años 2002 y 2006 fueron de 1128.8 a 615.85 por cada 100,000 habitantes cada año, en el que un grupo afectado recurrentemente son los niños de entre 5-9 años (Samie y col; 2009).

Los individuos con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) son un grupo importante de riesgo, diversos estudios indican que son más susceptibles a desarrollar infecciones sintomáticas y formas severas de la enfermedad (Watanabe y col; 2011).

La infección por *E. histolytica* se transmite a través de agua, alimentos y manos contaminadas con los quistes, donde los manipuladores de alimentos y objetos en contacto con quistes, son posibles fuentes de infección (Schuster y Visvesvara, 2004). Las parasitosis intestinales constituyen un enorme problema de salud pública, pero a pesar de su prevalencia en países en vías de desarrollo, en muchos de ellos, no se recibe la atención prioritaria. A pesar de su baja mortalidad, *E. histolytica* afecta a un gran número de individuos, ya sea que éstos permanezcan asintomáticos o en estados de diarrea crónica y desnutrición (Benetton y col; 2005).

1.1.2 Morfología de *E. histolytica*

E. histolytica es un protozoo perteneciente al *Phylum Sarcomastigophora* que incluyen organismos que tienen locomoción por medio de flagelos, pseudópodos o ambos. El *Suphylum Sarcodina* contiene especímenes que se mueven por medio de protrusiones citoplasmáticas, conocidas comúnmente como pseudópodos; presentan uno o varios núcleos en los diferentes estadios de vida, se multiplican por fisión binaria. Aquí se incluye a las amibas de vida libre, los simbioses del tracto intestinal y la patógena *E. histolytica* (Martínez, 1986).

Esta especie emite pseudópodos a base de material protoplásmico locomotor, se presenta en la naturaleza en estados morfológicos bien establecidos: trofozoíto y quiste (Figura 1).

El trofozoito (Figura 1B) corresponde a la forma vegetativa y móvil, es pleomórfico ya que su aspecto y movilidad están influidos por los cambios de pH, potencial redox y osmolaridad (Pumarola, 1999).

Su tamaño es muy variable y oscila entre 10 y 60 μm y más frecuentemente 15 y 30 μm . Las formas más pequeñas corresponden a las no invasivas, y se encuentran habitualmente en los casos asintomáticos. Los parásitos de mayor tamaño son las formas invasivas, que a diferencia de los anteriores no aparecen en la luz intestinal, ya que migran hacia el colon y otros órganos; estos parásitos poseen en el endoplasma restos celulares o hematíes (Pumarola, 1991). La forma móvil presenta una membrana citoplasmática dividida en dos porciones: una externa llamada ectoplasma, y una interna denominada endoplasma (Petri, 1993). El primero es hialino, transparente, retráctil y casi sin granulaciones. Los pseudópodos son prolongaciones del ectoplasma y proporcionan una motilidad al parásito de aproximadamente 50 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (López-Romero y Villagómez-Castro, 1993). El endoplasma contiene una gran cantidad de inclusiones, por lo que es granuloso; aquí se localiza el núcleo y otros organelos como el retículo endoplásmico, ribosomas, aparato de Golgi, pero no se observan mitocondrias.

Además se encuentran vacuolas que contienen eritrocitos y restos celulares (Meléndez y Sánchez, 1999). El núcleo es esférico con un acumulo de cromatina pequeño y puntiforme en el centro, delimitados por una cápsula llamado cariosoma o endosoma (Petri, 1993). También presenta cromatina adherida a la cara interna de la membrana nuclear, la cual está distribuida homogéneamente (Brown, 1985).

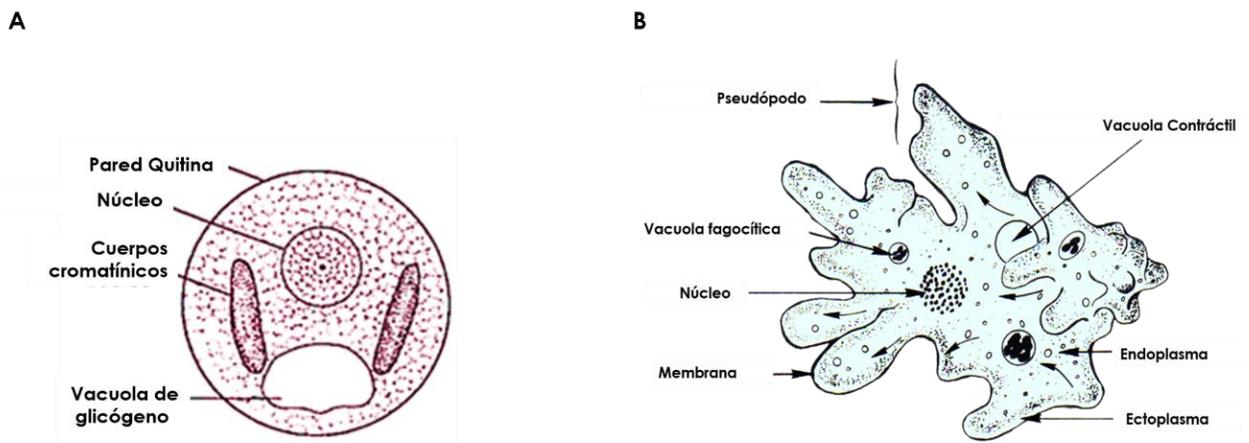


Figura 1. Estadios celulares de *E. histolytica*. A. Quiste celular B. Forma móvil ó trofozoito del parásito. Modificado Pearson Scott Foresman.

El quiste es la forma infectante (Figura 1A), es redondo y oval y se recubre de una pared lisa de 0.6 μm sumamente resistente de quitina, mide de 5 a 20 μm (Martínez, 1986). La pared quística es resistente al jugo gástrico, factores ambientales externos y a las cantidades habituales del cloro encontradas en el agua (Pumarola, 1991).

A medida de que el tiempo transcurre, en el interior del quiste se presentará una gran actividad: el núcleo se dividirá hasta encontrar formas que poseen de 1 a 4 núcleos, según la fase de maduración. Los quistes más jóvenes tienen 1 ó 2 núcleos, algunos cuerpos cromáticos (ácidos nucleicos y fosfatos) y vacuolas de glucógeno. Los quistes maduros poseen 4 núcleos y desaparecen los cuerpos cromáticos; estos son las formas infectivas (Barrón-González y col; 2008).

1.1.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *E. histolytica* es simple y consiste en un estado infectivo (quiste) y un estado móvil (trofozoito). La infección es normalmente iniciada por la ingestión de alimentos y bebidas contaminadas con restos fecales que contienen quistes del parásito (Haque y col; 2003). Los quistes del parásito sobreviven el pH ácido del estómago, pasando a través de él y del intestino delgado (Figura 2). El desenquistamiento ocurre en el lumen del intestino, donde la pared de resistencia se reblandece (por las condiciones alcalinas del intestino), los núcleos se duplican a ocho y se liberan ocho trofozoitos maduros, los cuales migran al intestino grueso.

Los trofozoitos se multiplican por fisión binaria formando quistes, que se expulsan por las heces (Clark y Diamond 1992). Los quistes maduros en el intestino grueso dejan el hospedero y permanecen viables e infectivos aún en ambientes fríos al menos durante 12 días; en agua estos pueden sobrevivir hasta 30 días, sin embargo, mueren rápidamente por la disecación y por las temperaturas entre 5°C y 40°C (Stenmark, 2009).

Las señales que permiten el enquistamiento o desenquistamiento aún no se comprenden del todo, aunque estudios en el parásito que infecta a los reptiles *E. invadens* sugieren que la lectina que se une a galactosa en la superficie del parásito, puede ser clave para el enquistamiento (Samie y col; 2006).

En la mayoría de las infecciones, los trofozoitos se agregan en la mucosa intestinal y como se mencionó anteriormente, pueden formar nuevos quistes, resultando en una auto-limitada infección asintomática. En algunos casos, la adherencia y la lisis del epitelio intestinal, mediante la lectina amibiana galactosa y N-acetil-D-galactosamina específica (Gal/GalNAc), inicia la invasión del colon por los trofozoitos. Los neutrófilos responden a la invasión liberando óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno; sin embargo, los trofozoitos al hacer contacto directo, lisan a las células de sistema inmune permitiendo que sus enzimas líticas contribuyan con el daño celular en el sitio de la invasión. Una vez que el epitelio intestinal es invadido, existe una diseminación extraintestinal al peritoneo, hígado y en algunos casos al cerebro (Haque y col; 2003).

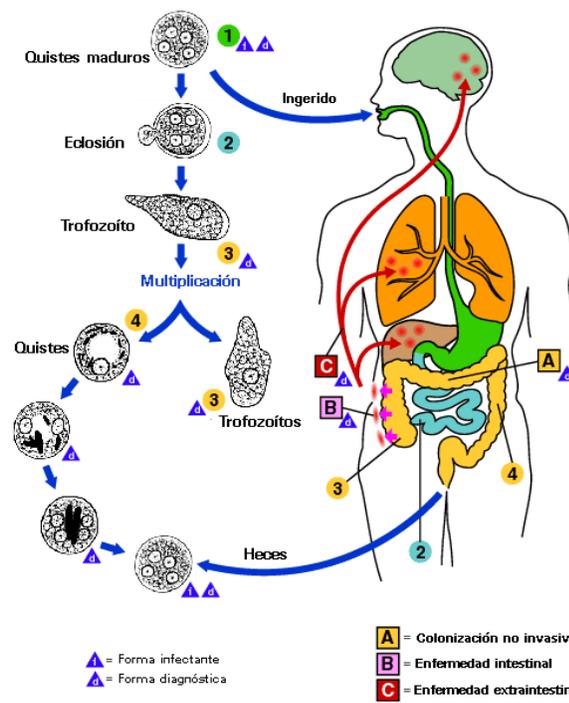


Figura 2. Ciclo de vida *E. histolytica*. Modificado "centre of disease and control", 2016

1.2 Mecanismos patogénicos de *E. histolytica*.

Este organismo fue nombrado "histolytica" por su habilidad para destruir los tejidos. Los trofozoitos son muy citotóxicos, realizan su acción directamente en las células del hospedero, reafirmando su habilidad para invadir y dañar los tejidos del hospedero. Además de la importancia fundamental en la patogénesis, el mecanismo preciso por el cual el parásito mata las células del hospedero aún no está claro (Ralston, 2015). Sin embargo, se conocen algunos procesos empleados por el organismo para llevar a cabo el proceso de invasión de tejidos, tal es el caso de la adhesión mediada por el reconocimiento de receptores específicos de superficie, citólisis de células del hospedero por contacto, fagocitosis de las células blanco y la migración celular (Figura 3). Durante cada uno de ellos, se requiere de la participación del citoesqueleto de actina (Tavares y col; 2000).

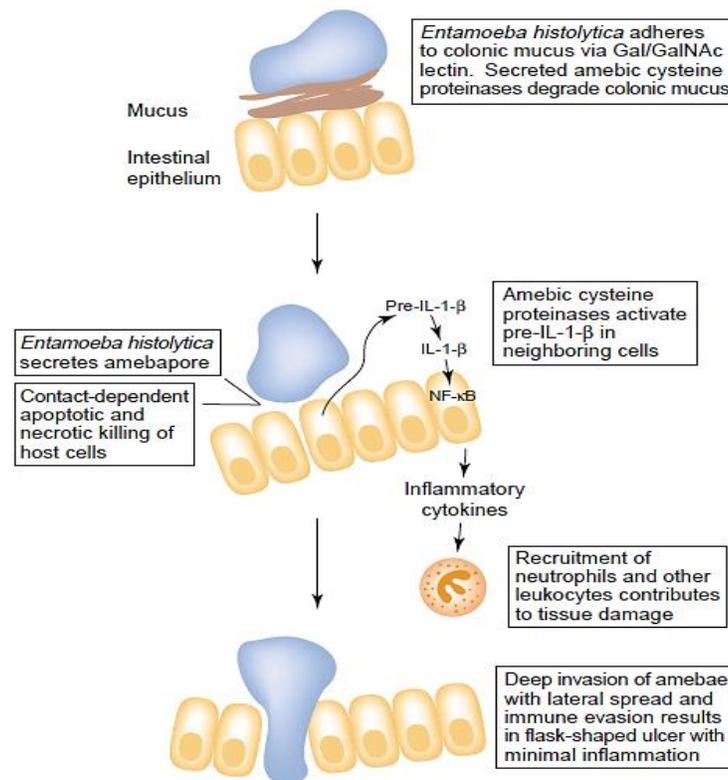


Figura 3. Modelo de la invasión del epitelio intestinal por *E. histolytica*. (Tomado de Huston, 2004)

1.2.1 Adherencia

Las moléculas de superficie controlan la adherencia, señalización, ingestión y la modulación de la respuesta inmune hospedero-parásito. Muchas proteínas de superficie amebianas tienen gran diversidad funcional en diferentes procesos, incluyendo la lectina heterotrimérica Gal/GalNAc (Petri y col; 2002). Está compuesta por una subunidad pesada (HGL), ligera (LGL) e intermedia (IGL). La subunidad pesada contiene el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que se une fuertemente a galactosa y N-acetil-D-galactosamina encontrados en la mucosa de las células del hospedero (Mann, 2002).

Rosales-Encina y colaboradores (1987) reportaron el aislamiento y la purificación de una proteína con propiedades de lectina de 220 kDa encontrada en la superficie de trofozoitos del parásito la cual está involucrada en la adherencia celular a eritrocitos humanos y monocapa de células MDCK.

Otra molécula involucrada en la adherencia de *E. histolytica* es una proteína de 112 kDa descrita por Rodríguez y colaboradores en 1986. Con el uso de la proteína recombinante, se confirmó que esta adhesina es translocada durante el proceso de fagocitosis de la membrana plasmática a vacuolas fagocíticas, por lo que se le denominó "fagocina".

Por último, se identificó una proteína similar a las integrinas $\beta 1$, de 140 kDa que reconoce la secuencia RGD encontrada en FN. Esta interacción le permite formar estructuras similares a placas de adhesión a través de la formación de complejos multimoleculares de señalización que desencadena eventos de fosforilación de tirosinas, involucrando a proteínas como FAK, paxilina y vinculina (Flores-Robles y col; 2003).

1.2.2 Citotoxicidad dependiente del contacto.

E. histolytica una vez que se adhiere induce múltiples efectos citotóxicos en las células del hospedero incluyendo el incremento de Ca^{2+} intracelular, la producción de especies reactivas de oxígeno, pérdida de la integridad membranal, fragmentación del DNA y activación de caspasa-3 (Ralston y Petri, 2011). El parásito requiere de la participación de moléculas que le permiten lisar la matriz extracelular de las células blanco; ejemplo de esto son las proteínas formadoras de poros "amebaporos" las cuales actúan como toxinas secretadas. Los tres amebaporos A, B y C tienen una secuencia similar a proteínas permeabilizadoras de membrana encontradas en mamíferos como NK-lisina y granulosina. Estos requieren un pH de aproximadamente 5.2 para que tengan actividad formadora de poros (Andrä y col; 2003); como el encontrado en el intestino delgado.

El genoma de *E. histolytica* posee genes que codifican para al menos 50 cisteín-proteasas, algunas de ellas son secretadas y se piensa que están involucradas en la muerte celular. De éstas, sólo cuatro proteínas, EhCP1, EhCP2, EhCP5 y EhCP7 son altamente expresadas en cultivo y en conjunto, tienen un 90% de la actividad proteolítica en extractos celulares. Estas moléculas son capaces de actuar sobre diversos sustratos del hospedero incluyendo mucinas, colágeno, matriz extracelular, etc (Faust y Guillen, 2012).

Diversos estudios sugieren que la proteína EhCP5 tiene mayor participación en la virulencia del parásito en comparación con las otras tres proteasas, esto debido a que tiene la capacidad para unirse a integrinas vía dominio RGD y provoca una respuesta proinflamatoria en células Caco-2 *in vitro*, y en colón murino mediante la activación de NLRP3 (Mortimer y col; 2015). La ausencia de la proteína homóloga a EhCP5 en *E. dispar* corrobora la participación de esta proteasa en el proceso de invasión de tejidos (Wilson y col; 2012).

Las proteínas que se unen a las cisteín-proteasas de *E. histolytica* (EhCPBF's) fueron recientemente identificadas como reguladores de la actividad de proteasas y el tráfico a los fagosomas (Nakada-Tsukui y col; 2012). Sin embargo, las actividades duales en la digestión en los fagosomas y potencialmente en la virulencia puede perjudicar la flexibilidad funcional de enzimas degradativas dependiendo de la disponibilidad de los nutrientes encontrados en el colon del hospedero (Marie y Petri, 2014).

1.2.3 Fagocitosis

En diversos organismos multicelulares, la fagocitosis está involucrada en el proceso de apoptosis, con la finalidad de limpiar sin provocar una respuesta inflamatoria por los componentes tóxicos de las células muertas. De manera similar, las células muertas del hospedero son fagocitadas por *E. histolytica* (Figura 4A) con la ayuda de la fosfatidilserina expuesta (Begum y col; 2015).

Desde un concepto evolutivo, el parásito fagocita bacterias por la adquisición de nutrientes, por lo que la ameba preferencialmente reconoce y fagocita células apoptóticas que tienen superficies similares con las bacterias (Teixeira y col; 2008)

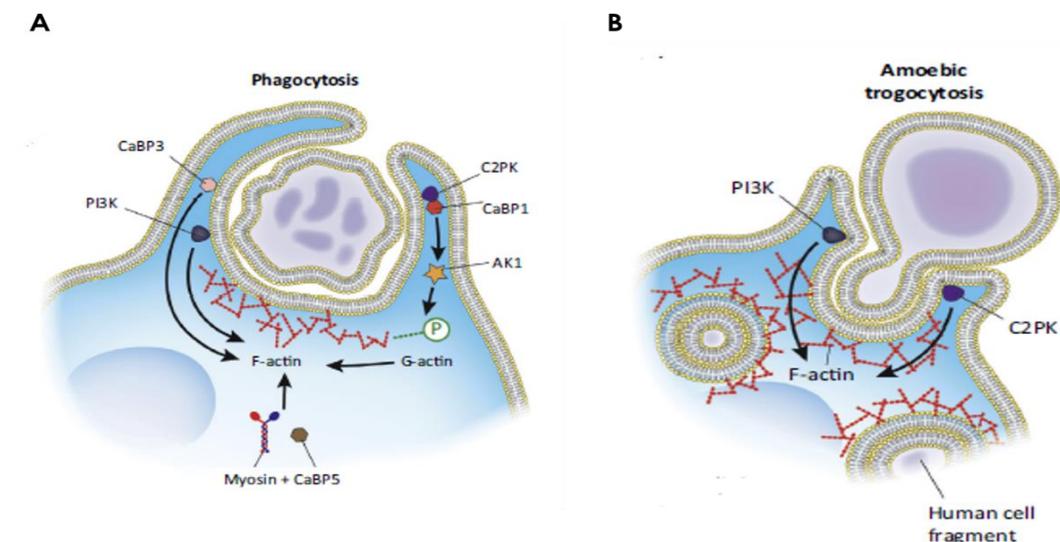


Figura 4. Fagocitosis y trogocitosis amebiana. A. Fagocitosis amebiana, la transducción de señales involucra proteínas como EhCaBP3 y PI3K ambos influenciando la polimerización de actina. B. Trogocitosis amebiana (Ralston, 2015).

Recientemente, se describió un nuevo mecanismo de muerte por *E. histolytica*. Usando tecnología de captura de imágenes *in vivo*, se descubrió que seguido de la adhesión a las células del hospedero, los trofozoitos ingieren partes separadas o “mordiscos” de las células del hospedero; a este proceso se le denominó “trogocitosis amebiana” (Figura 4B). La trogocitosis es muy rápida, da comienzo después de un minuto de adhesión a las células. Debido a las mordeduras y a la ingestión de piezas separadas de células del hospedero, los niveles intracelulares de calcio son elevados y esto desencadena la muerte celular, evidenciada por la pérdida de la integridad membranal (Ralston, y col; 2014). Interesantemente, cuando los trofozoitos son incubados con ambas, células vivas y muertas, sólo las células vivas son trogocitadas por el parásito y las muertas fueron ingeridas completamente (Ralston, 2015).

1.2.4. Migración celular

El proceso invasivo de *E. histolytica* el cual es central para la patogénesis del parásito, es dirigido por la motilidad del mismo, sin embargo se conoce relativamente poco de este nivel celular. La motilidad está sustentada por la interacción con el sustrato (por ejemplo, la matriz extracelular) y por la reorganización del citoesqueleto de actina. La polarización celular necesaria para que este parásito mantenga su alta motilidad depende de la formación de pseudópodos (en la parte frontal), los cuales se encuentran enriquecidos de actina y de proteínas asociadas al mismo. La extensión pseudopodial es acompañada de reciclamiento del citoplasma y formación de un apéndice posterior, comúnmente conocido como “uroide”. Estas conformaciones celulares no sólo se observan durante la locomoción, también en otros procesos como la fagocitosis (Labruyère y Guillen, 2006). Se ha propuesto que existe un movimiento retrógrado de partículas ancladas a la membrana que dirigen el movimiento (Guillen, 1993).

La eficiencia en la migración requiere de la coordinación con otras actividades celulares, como la extrusión de componentes de la membrana, dinámica de microtúbulos, etc. Análisis celulares sobre la formación de pseudópodos ha permitido la identificación de diversas proteínas que se unen al citoesqueleto de actina (*Actin Binding Proteins* por sus siglas en inglés ABP's) tales como ABP-120 (Vargas y col; 1996), miosina IB (Vargas y col; 1997), miosina II (Raymond-Denise y col; 1993); así como pequeñas GTPasas como RacG (Guillen y col; 1998) y proteínas como PAK (Labruyere y col; 2003). Esto soporta el modelo basado en la actividad energética del complejo formado por filamentos de actina y miosina presentes en el córtex de las células en movimiento. Se ha sugerido que durante la migración en amibas, los cambios en la interacción actina-miosina II durante la actividad contráctil puede reducir la tensión cortical en regiones particulares, permitiendo la extensión de protrusiones celulares (Arhets y col; 1998); un exceso de miosina II puede bloquear la extensión membrana en los laterales celulares, permitiendo la polarización celular (Marion y col; 2005).

1.2.5 Polarización y formación de uroide.

La sensibilidad a quimioatrayentes y los procesos coordinados asociados con la dirección en la locomoción aparentemente son centrales para el inicio de la infección amibiana. La forma móvil de *E. histolytica* presenta un pseudópodo frontal y un uroide en la parte posterior. La polarización amibiana es asociada con una distribución diferencial en la célula de complejos de actinmiosina en grupos de proteínas que regulan la dinámica del citoesqueleto de actina. El pseudópodo de *E. histolytica* se caracteriza por la acumulación local de F-actina ó de entrecruzadores como ABP-120 y la miosina no convencional Miosina IB (Guillén, 1996); sin embargo, no se han identificado receptores involucrados en la quimiotaxis o fagocitosis.

Seguido de la extensión pseudopodial, la protrusión también se retracta y los pseudópodos emergen en otras posiciones de la amiba o como proyecciones citoplasmáticas, así el movimiento celular ocurre a partir de esta región (Tavares y col; 2000). El uroide es una estructura celular encontrada en la parte posterior y se caracteriza por grandes cantidades de membrana plegada (Arhets y col; 1995). Esta estructura es detectada en un pequeño número de trofozoitos de una población en crecimiento bajo condiciones axénicas. La unión de ligandos multivalentes (por ejemplo, la lectina ConavalinaA) a moléculas de superficie, permite la formación del uroide en la mayoría de las amibas de la población (Calderón y col; 1980), generando agrupaciones de moléculas de superficie que entrecruzan con el ligando (Bourguignon y Singer 1977). Las agrupaciones son transportadas activamente hacia la parte posterior del trofozoito en movimiento donde se juntan para formar "parches" ó caps (Arhets y col; 1998). Moléculas como actina, miosina II, y proteínas que se unen a actina como ABP-120, α -actinina y GTPasas de la familia Rho como EhRacG, se concentran en este tipo de estructuras (Guillén y col; 1998). Los parches o Caps se acumulan en el uroide para después ser liberados de la amiba (Calderón y col; 1980); fuerzas contráctiles generadas en la parte posterior por miosina II, facilitan la liberación del uroide. Al término del proceso de capping, se eliminan los ligandos multivalentes unidos a la superficie del parásito. Eso es como una estrategia de los trofozoitos para evadir al sistema inmune del hospedero (Tavares y col; 2000).

1.3 Citoesqueleto de actina en eucariontes superiores.

Como el nombre lo indica, el citoesqueleto actúa como un esqueleto propio de la célula el cual es altamente dinámico, sufriendo constantes cambios y rearrreglos en respuesta a las necesidades de la célula, que pueden ser categorizadas como estructurales y de transporte.

Conformado por tres componentes principales (Filamentos intermedios, microtúbulos, microfilamentos) el citoesqueleto es capaz de desempeñar sus funciones; sin embargo cada uno de ellos realiza diferentes acciones, en gran parte debido a sus características biofísicas diferenciales entre sí (Dos Remedios y col; 2003).

Particularmente actina es un componente esencial del citoesqueleto y participa en diferentes funciones cruciales en las células eucariotas. Forma parte de una familia altamente conservada de proteínas que recae en tres clases amplias: α , β y γ .

Generalmente se localiza en el citoplasma, sin embargo también se encuentra presente en el núcleo, donde puede o no tener funciones motrices asociadas (Oriol y col; 1997). Se encarga el mantenimiento de la morfología celular y polaridad; endocitosis y tráfico intracelular; contractilidad, motilidad y división celular.

El ensamble y desensamble de filamentos de actina, además de su organización en diferentes formas (Figura 5) como redes cruzadas y ramificadas, paquetes paralelos y antiparalelos, además de estructuras contráctiles permite que la célula adquiera diversos tipos de estructuras dependiendo del requerimiento de la misma (Winder y Ayscough, 2005).

En el frente de la célula, se puede distinguir redes cruzadas y ramificadas conformando una estructura laminar conocida como *lamellipodium*; esta es el motor principal para el movimiento de la célula debido a la polimerización de filamentos contra la membrana celular, presionándola. Los filopodios que son estructuras similares a dedos en el frente de la célula, están conformados por paquetes alineados de filamentos de actina; estos son importantes para la respuesta direccional de la célula.

Una delgada capa de actina, denominada *córtex*, cubre la membrana plasmática de la célula; esta estructura es de suma importancia para el mantenimiento del tamaño y cambios morfológicos de la célula (Blanchoin y col; 2014).

Para construir los diferentes arreglos que generan las diversas arquitecturas celulares, la célula emplea una batería de proteínas accesorias que construyen una red de control del citoesqueleto de actina, denominadas "*actin-binding proteins*" (ABP's). Las actividades de estas proteínas están bajo control de vías de señalización específicas (Winder y Ayscough, 2005).

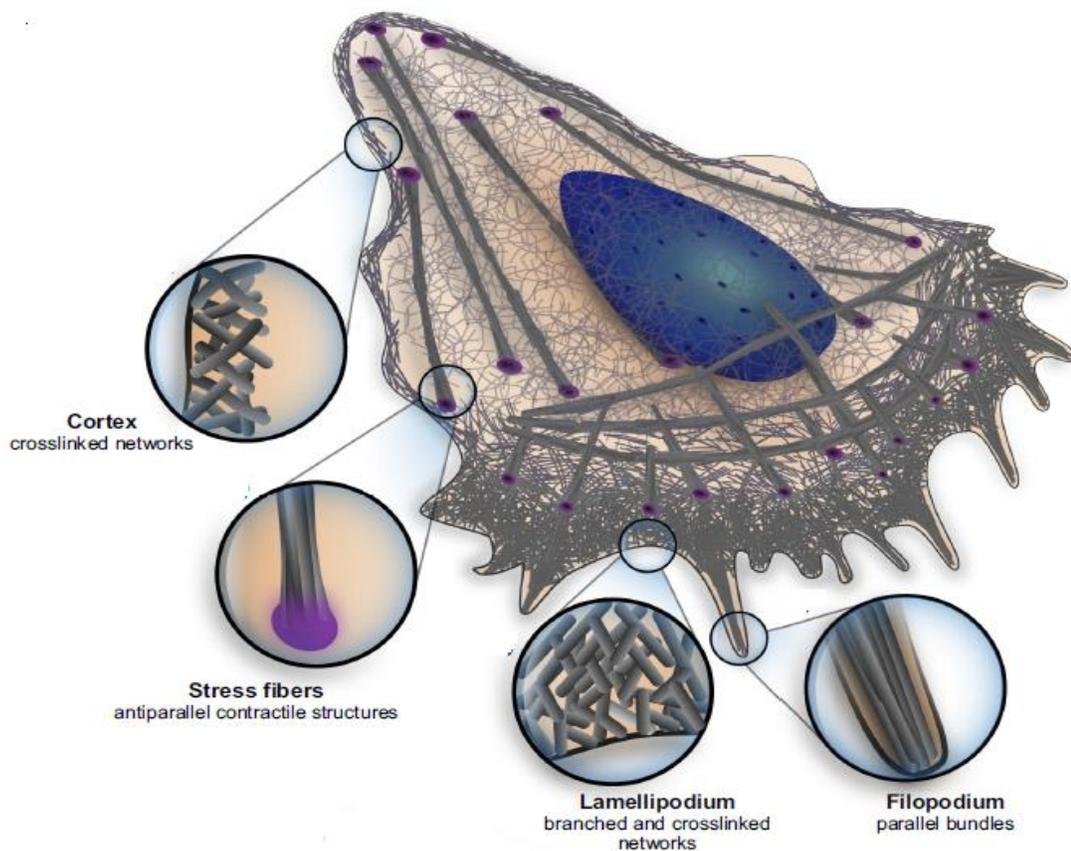


Figura 5. Representación esquemática de la arquitectura y mecanismos de movimiento de una célula eucariote. Los círculos indican los tipos de estructuras encontradas en una célula, como el *córtex*, fibras de estrés, lamelipodio y filopodio. (Tomado de Blanchoin y col; 2013).

1.4 Proteínas que se unen a actina (*Acting-binding proteins*).

Actina existe en dos formas principales, globular o monomérica (denominada también actina-G) y polimérica filamentosa (ó actina-F). Los filamentos de actina se elongan cuando los monómeros de actina unidos a ATP son incorporados en el extremo "barbado". A medida que el filamento se alarga, la unión con ATP en la hendidura central de actina es hidrolizada, se libera un grupo fosfato y actina queda unida a una molécula de ADP, resultando en el desensamble por la pérdida de monómeros de actina en el extremo (-) ó "punta de flecha" (Paavilainen y col; 2004).

Actina se une a un número sustancial de proteínas que colectivamente son llamadas ABP's. Las proteínas que se unen a actina facilitan los procesos de polimerización y depolimerización de los filamentos de actina (Winder y Ayscough, 2005).

Pollard y Cooper en 1986, identificaron un largo número de ABP's, las cuales participan en diferentes eventos celulares, en la formación de las distintas estructuras que le permiten a la célula realizar sus funciones. Estas proteínas se pueden clasificar de acuerdo con las funciones en las que participan, reduciéndose a siete grupos importantes: 1) proteínas que se unen a monómeros de actina previniendo su polimerización (ej. Timosina β 4, DNasa I); 2) proteínas de depolimerización de filamentos de actina induciendo la conversión de F-actina a G-actina (ej. CapZ y cofilina); 3) proteínas que se unen al extremo punta de flecha previniendo el intercambio de monómeros de actina (ej. tropomodulina) o al extremo barbado (ej. CapZ); 4) proteínas que acortan el tamaño de los filamentos de actina uniéndose a un lado (ej. Gelsolina); 5) proteínas que entrecruzan filamentos de actina, permitiendo la formación de paquetes, redes y ramificaciones de actina-F (ej. Arp2/3, forminas, ENA/VASP); 6) proteínas que estabilizan los extremos de los filamentos de actina previniendo su depolimerización (ej. Tropomiosina) y 7) proteínas motoras que usan a los filamentos de actina como tracción para el movimiento (ej. Miosinas motoras).

Las ABP's no están limitadas a una clase, existen diversas proteínas que poseen una serie de dominios particulares que les permiten realizar otras funciones, como de señalización (ej. ENA/VASP, IQGAP, cortactina) (Winder y Ayscough, 2005) ó que participan en la formación de diferentes estructuras como el complejo ARP2/3 que también puede participar en la elongación de los filamentos de actina presentes en fibras contráctiles, lamelipodios y filopodios (Cossart, 2004; Blanchoin y col; 20013).

1.5 Citoesqueleto de actina y ABP's en *E. histolytica*.

Como se mencionó anteriormente, la intensa motilidad de las amibas requiere de un citoesqueleto muy dinámico; técnicas moleculares permitieron la identificación de diversos genes que codifican para diversas proteínas del citoesqueleto, así como la interferencia en las secuencias de aminoácidos que poseen y los dominios funcionales que contienen. Actina amibiana fue identificada por inmunotinciones usando anticuerpos heterólogos contra actina muscular de conejo y humano (Sabanero y Meza, 1982). Su secuencia aminoacídica muestra entre un 89-86% de homología con actina citoplasmática y de musculo esquelético de humano, sin embargo posee una homología baja con respecto a la secuencia nucleotídica (69-67% respectivamente) (Edman y col; 1987).

Al igual que en otros eucariontes superiores, actina requiere de otras proteínas para formar estructuras complejas responsables de los movimientos celulares. La organización de estas formas es acompañada por la interacción de actina con múltiples ABP's que pueden conectar filamentos de actina en redes o pueden unirse a otras proteínas en el citoplasma o a otras proteínas y lípidos encontrados en membranas plasmáticas y vesiculares, así como las funciones ya descritas como la estabilización/ desestabilización de polímeros de actina (Cunningham y col; 1992).

En trofozoitos de *E. histolytica* se han identificado varias ABP's en asociación en estructuras como placas de adhesión, tal es el caso de vinculina, α -actinina y miosinas I y II, las cuales también se han encontrado como componentes de arreglos de adhesión en eucariontes superiores (Vásquez y col; 1995). Otras proteínas requeridas para la dinámica de la locomoción celular como Profilina, fueron encontradas en el parásito (Binder y col; 1995). La proteína ABP-120 importante para la estabilización/desestabilización de filamentos de actina amibiana fue localizada en procesos como extensión de pseudópodos y formación de cap (Vargas y col; 1996).

Proteínas que forman parte de la familia de miosinas motoras se identificaron en el parásito, encontrándose sólo dos con funciones muy específicas. Miosina II se localizó como componente de cap, enriqueciéndose también en el uroide de la célula, llevando a cabo diversas actividades motoras del parásito (Franco-Barraza y col; 2006). La otra proteína, miosina IB, fue encontrada en interacción con actina y α -actinina. Su sobreexpresión indicó que la proteína puede estar involucrada en procesos como la fagocitosis (Voigt y col; 1999). Muchas proteínas asociadas al citoesqueleto de actina son blancos para diversas vías de señalización que modulan el ensamble de actina en diferentes niveles. Estas actividades generalmente son reguladas por moléculas de señalización como Ca^{+2} , fosfoinositidos y cinasas. Las señales externas son percibidas por los receptores de membrana, resultando en cambios en estados físicos o bioquímicos que inician una cascada de señalización de eventos dentro de la célula (Forgacs y col; 2004).

El conocimiento de la regulación de las funciones del trofozoitos a través de vías de señalización que involucran a actina es poco, aunque varias de estas moléculas son conocidas por ser componentes convencionales en otras células eucariontes, en *E. histolytica* aún no han sido caracterizadas (Meza y col; 2006).

Los eventos celulares involucrados en la patogénesis del parásito están relacionados con otro mecanismo de regulación, el cual controla los complejos de adhesión y que es generado por la asociación con proteínas de unión con GTP (proteínas G); la interacción regula el tiempo de ensamblaje intracelular y el desensamble de complejos proteicos. Dos proteínas G, Rho y Rac (miembros de la familia Ras) están involucrados en la organización de fibras de estrés de actina y adhesión celular (Guillén, 1993). *E. histolytica* se une al sustrato celular usando un complejo focal de adhesión, los microfilamentos de actina están ligados a complejos de proteínas de adhesión y la pérdida de la misma, permite a la ameba tomar una forma redondeada, indicado que la red de filamentos está desorganizada.

Para ello, Rho GTPasas regulan este ensamblaje y organización, desencadenando vías de señalización río debajo de receptores de factores de crecimiento e integrinas. RhoA regula la formación de estos contactos focales y el subsecuente ensamblaje de las fibras de estrés y la migración celular (Ríos y col; 2008).

Esta serie de estudios son relevantes en el conocimiento de la patogénesis, ya que las células de *E. histolytica* requieren frecuentemente de su motilidad en el ambiente local que físicamente restringe la locomoción, como en el caso de la invasión celular (Labruyère y Guillén, 2006).

Con la finalidad de encontrar proteínas que se unen a los filamentos de actina y que participan en el proceso invasivo del parásito, varios grupos de investigación se han dado a la tarea de identificar dichas moléculas que tienen una participación en los diferentes mecanismos patogénicos del parásito.

Para identificar los genes que están diferencialmente expresados en cepas virulentas y no virulentas de Entamoeba; MacFarlane y Singh en el 2006, realizaron microarreglos de 2,110 genes únicos para hacer perfiles de expresión de virulencia de *E. histolytica*. Se identificaron 415 genes únicos que se expresan en niveles más altos en la cepa virulenta en comparación con la otra (no patógena); este conjunto de genes contiene varios que pertenecen

a los que codifican para las proteínas de la familia Ras, así como genes de resistencia a drogas, proteínas de choque térmico y, de manera relevante, se encontró una proteína del citoesqueleto llamada Cortexilina I.

1.6 Cortexilinas

Las cortexilinas (I y II) son proteínas de unión a actina, las cuales organizan los filamentos preferencialmente en estructuras de "bundles" antiparalelos y se asocian redes, formando mallas tridimensionales (Faix y col; 2001). Se identificaron por primera vez en *Dictyostelium discoideum* como proteínas que tienen participación en la citocinesis (Stock y col; 1999); se encuentran enriquecidas en el cortex de células en interfase, por lo que de ahí deriva su nombre (Faix y col; 1996). Además estas proteínas se translocan a la región ecuatorial de células en división y son requeridas para el correcto posicionamiento del surco de segmentación (Stock y col; 1999).

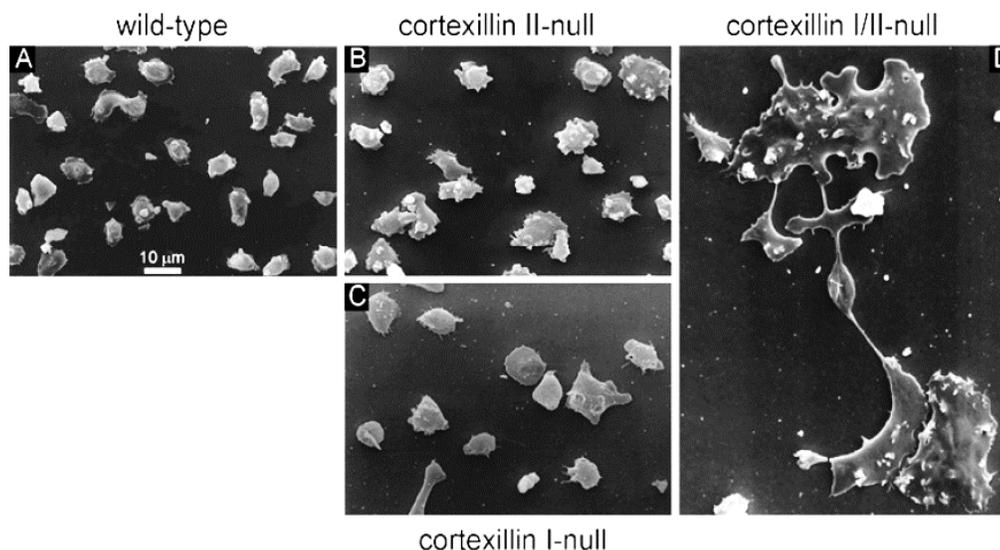


Figura 6. Forma y tamaño de células silvestres y mutantes faltantes de una isoforma de cortexilina o ambas en *D. discoideum*. Micrografías por microscopía electrónica de barrido de células silvestres (A), mutantes sin cortexilina II (B), mutantes sin cortexilina I (C) y, mutantes que carecen de ambas isoformas (D). Tomado de Faix, 2002.

Una participación importante de las cortexilinas es en el proceso de citocinesis; esto ha sido revelado por mutantes que no poseen ninguna de las proteínas I y II (figura 6). Las células con estas mutantes (figura 6D) tienden a tener un incremento en el tamaño y, además, se vuelven multinucleadas cuando son cultivadas en medio nutritivo (Weber y col; 1999). La pérdida de sólo cortexilina I en la célula (figura 6C), causa un incremento menos dramático en el número promedio de núcleos por célula, mientras que la falta de la cortexilina II (figura 6B) muestra un incremento muy bajo, indicando que estas formas pueden, en gran parte, reemplazar una a la otra (Faix y col; 1996).

La mitad del extremo amino terminal de cada subunidad de cortexilina (figura 7) posee un dominio de unión a actina, el cual se encuentra conservado en proteínas de la familia a la que forman parte α -actinina y espectrina (Faix y col; 2001). Este dominio es conocido como "de homología con calponina" (*Calponin homology*, por sus siglas en inglés CH), de alrededor de 110 aminoácidos encontrado en proteínas de transducción de señales y citoesqueleto. Están conformadas por dos dominios en tándem, lo cual constituye la región de unión con actina; miembros de varias familias proteicas que se vinculan con los filamentos de actina como ABP-120, distrofina y α -actinina, poseen este tipo de conformación (Bañuelos y col; 1998). Los dominios consisten en cuatro α -hélices conectadas por largos lazos o "loops" y dos o tres hélices cortas (Goldsmith y col; 1997).

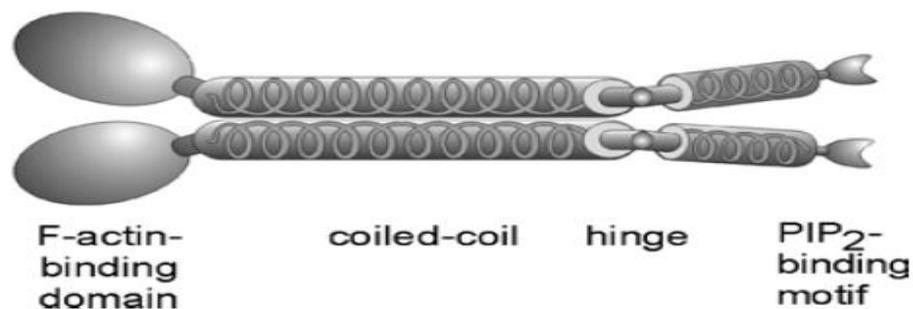


Figura 7. Representación esquemática del homodímero de cortexilina I en *D. discoideum*. En el extremo amino terminal se pueden distinguir los dominios de unión a filamentos de actina (dominios de calponina). Después se encuentra la región *coiled-coil* de heptapéptidos repetidos y por último el extremo carboxilo terminal, donde se distinguen el nonapéptido para la unión con PIP₂ (tomado de Faix, 2002).

Las cortexilinas se pueden distinguir de otros miembros de esta superfamilia ya que cuentan con un dominio "coiled-coil" el cual es responsable de la formación como dímero paralelo (Weber y col; 1998). Este dominio consiste de 18 heptapéptidos repetidos con el patrón **hxxhcxc** (donde **h** son residuos hidrofóbicos como isoleucina, leucina o valina; **c**, se refiere a los aminoácidos cargados, ej. ácido glutámico ó lisina y, **x** se refiere a cualquier residuo); los cuales son responsables del ensamble de las cortexilinas en heterodímeros paralelos (Steinmetz y col; 1998; Mason y Arndt, 2004).

La pérdida de cortexilinas tiene como consecuencia una reducción en la polaridad celular y un incremento en el número de pseudopodia lateral durante quimiotaxis; esto sugiere que las cortexilinas tienen un rol inhibitorio en la producción de pseudópodos laterales de la célula (Cha y Jeon, 2011).

Varios estudios han demostrado que la proteína I de cortexilina, forma un complejo con Rac1 y las IQGAPs, DGAP1 y GAPA. La forma activa de la pequeña GTPasa Rac1 recluta a la proteína DGAP1 en un complejo cuaternario con las dos cortexilinas. En mutantes que carecen de DGAP1, se forma un complejo similar pero con la proteína perteneciente a la familia IQGAP, GAPA (Faix y col; 2001).

El complejo IQGAP-cortexilina está involucrado en la regulación de la mecánica cortical. Se ha sugerido que miosina II y el complejo formado por IQGAP-cortexilina, tienen una importante participación en la regulación de la habilidad de las células para restringir el sitio de ensamble de actina filamentosa y la formación del pseudópodo en el borde delantero de células en movimiento (Jeon y col; 2007). DGAP1 y GAPA actúan como proteínas "scaffold" (andamio) que pueden reclutar y localizar complejos proteicos requeridos para transmitir señales de una Rho GTPasa en la actina del citoesqueleto.

Sin embargo, aún no se sabe cómo DGAP1 o cortexilina, son reclutadas a la región de segmentación durante el proceso citocinesis. Estos datos sugieren que probablemente se requiera de GAP's (*GTPase-activating-proteins*, por sus siglas en inglés) a las regiones polares de células en división o alternativamente GEF's (*Guanine-nucleotide Exchange factors*) al surco de segmentación (Faix, 2002).

Recientemente se identificó una proteína Cortexilina III, que forma parte de los miembros de la subfamilia de proteínas con dominios de homología a calponina como lo hacen sus proteínas hermanas en *D. discoideum*. A diferencia de Cortexilina I y II, esta proteína forma un homodímero inestable, sin embargo, es capaz de formar heterodímeros con ambas cortexilinas antes descritas. Funcionalmente, se encontró que Cortexilina II podría ser un regulador negativo del crecimiento celular, citocinesis, fagocitosis en *D. discoideum* (Liu y col; 2014).

El resultado obtenido por MacFarland y Singh en el 2006, indican que probablemente cortexilina está involucrada en el proceso de patogénesis en *E. histolytica*; sin embargo, aún no se sabe si realiza funciones similares a lo observado en *D. discoideum* o esta realice algún otra función particular importante en el proceso invasivo del parásito.

2. ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, el trabajo de MacFarland y Singh en el 2006 indica que Cortexilina I podría ser una molécula importante para la virulencia del parásito *E. histolytica*. Esto es complementario al trabajo de Marion y colaboradores en el 2006, en el que evaluaron eventos tempranos en el proceso de fagocitosis del parásito. Utilizando perlas magnéticas recubiertas con proteínas encontradas en suero humano, realizaron la purificación de fagosomas tempranos de células silvestres de *E. histolytica*, así como de parásitos que sobreexpresan miosina IB. Análisis de estudios proteómicos de cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS/MS) revelaron diversas proteínas que se unen al citoesqueleto de actina involucradas en el proceso de fagocitosis, señalando que Cortexilina I y II podrían estar participando en los eventos tempranos de la formación del fagosoma.

En el 2010, Carpentieri y colaboradores con la finalidad de encontrar glicoproteínas enriquecidas en la membrana de *E. histolytica*, lograron identificar una serie de proteínas hipotéticas situadas en el uroide del parásito mediante espectrometría de masas. Usando la lectina Concanavalina A que favorece la formación de la estructura de capping, encontraron probables blancos terapéuticos únicos y abundantes, tales como glicoproteínas, proteasas y 17 proteínas hipotéticas, entre las cuales se encuentra Cortexilina I. Estas observaciones indicarían que EhCortexilina I podría estar enriquecida en estructuras como el uroide, sin embargo la función que podría realizar ahí aún es desconocida.

En México, se hizo un análisis de proteómica en el que se evaluó el efecto de kaempferol en eventos patogénicos dirigidos por el citoesqueleto durante la infección por el parásito. Como resultado se observó que el fármaco disminuye la adhesión, sin embargo se encontró un incremento en la migración y actividad fagocítica.

En relación a esto, se logró identificar que proteínas como actina, miosina II y cortexilina II estaba sobre-expresadas en respuesta al tratamiento con kaempferol (Bolaños y col; 2015).

Recientemente, se llevó a cabo un estudio para analizar los cambios en la expresión génica de cepas virulentas de amibas en diferentes contextos ambientales, tanto de una cepa aislada de humanos y mantenida a través de diversos países en hígados animales, así como de una cepa que estuvo en contacto con el colon humano y mantenida en cultivo *in vitro*. El uso de RNAseq reveló que los cambios mayores en el transcriptoma en parásitos virulentos incluyen genes relacionados con respuestas al estrés de la célula, metabolismo de azúcares y rearme del citoesqueleto de actina; interesantemente en este último proceso biológico se indentificó que el gen de EhCortexilina II se encuentra sobre-expresado en parásitos aislados del hígado (Weber y col; 2016).

Esta serie de trabajos indican que probablemente las proteínas cortexilinas estén desempeñando diversos papeles en varios procesos celulares involucrados en la patogénesis del parásito, sin embargo, aún se desconoce que funciones realizan y bajo que contexto celular trabajan dichas proteínas.

3. JUSTIFICACIÓN

Entamoeba histolytica es un protozooario parásito capaz causar amebiasis. El movimiento del parásito es crucial durante el proceso de patogénesis, esto basado en la dinámica y organización del citoesqueleto de actina.

Estudios enfocados a la identificación de proteínas que están involucradas en dicho proceso indican que Cortexilina I, puede estar participando de manera relevante en la patogenia de este parásito. Por lo que, el estudio de esta proteína en *E. histolytica*, nos permitirá un mejor entendimiento de su contribución en diferentes procesos celulares relacionados con sus mecanismos patogénicos.

4. HIPÓTESIS

La proteína EhCortexilina I participa en la dinámica del citoesqueleto de actina en procesos celulares como la adhesión, migración, destrucción de monocapa, los cuales son importantes para la patogénesis de *E. histolytica*.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar mediante estudios celulares y moleculares la participación de la proteína EhCortexilina I en *E. histolytica*

Objetivos particulares

- Identificar la presencia de dominios hipotéticos presentes en EhCortexilina I de *E. histolytica*
- Analizar los complejos proteicos asociados a EhCortexilina I del parásito
- Evaluar la contribución de la proteína EhCortexilina I así como de los dominios detectados, en diferentes procesos celulares tales como proliferación, adhesión, migración y citopatogenicidad.
- Ejecutar estudios celulares de la localización celular de EhCortexilina I y de los dominios que la conforman.
- Determinar si el extremo carboxilo terminal de la proteína interactúa con lípidos
- Determinar si el dominio putativo GBD es funcional para interactuar con GTPasas de la familia Rho.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

6.1. Análisis *in silico* de EhCortexilina I

La secuencia del genoma de *E. histolytica* y de EhCortexilina I se encuentran disponible en las bases de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y AmoebaDB (<http://http://amoebadb.org/amoeba/>). Los alineamientos de secuencias se generaron usando la herramienta bioinformática Clustal W 1.82 (<http://.ebi.ac.uk/clustalw>). Para la detección y el análisis de domios se utilizaron los programas bioinformáticos SMART 7 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), Superfamily 1.75 (<http://supfam.org/SUPERFAMILY/hmm.html>) y Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan). La búsqueda de posibles dominios conservados se llevó a cabo con la herramienta Blast 2.0 disponible en la página de NCBI. El análisis de posibles aminoácidos fosforilados se efectuó con la página disponible en la red NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>). Por último, para la predicción de estructura secundaria y terciaria de la proteína se utilizaron las herramientas bioinformáticas disponibles en los sitios PSIPRED (Protein Sequence Analysis Workbench) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), NetSurfP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/>), Jpred 3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>), CFSSP (<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>), Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) y SWISS-model (<http://swissmodel.expasy.org/>).

6.2 Cultivo celular

6.2.1 Cultivo de *E. histolytica*

La cepa HM1: IMSS de *E. histolytica* fue mantenida en cultivo axénico en medio TYI-S-33 a 37°C (Diamond y col; 1978), el cual fue suplementado con suero fetal bovino adulto al 15% (Microlab) y 3% de mezcla de vitaminas-Tween 80(In vitro).

6.2.2 Cultivo de cepas DH5 α y BL21-DE3 de *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* DH5 α y BL21-DE3 utilizadas para la transformación de vectores de expresión amibianos e inducibles, fueron cultivadas en medio LB (Bactotripton 1%; extracto de levadura 0.5% y NaCl 170mM; pH 7) a 37°C (Sambrok y col; 1989).

6.2.3. Cultivo de línea celular MDCK

La línea celular MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) se cultivó en medio con altas concentraciones de glucosa DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con suero de fetal bovino al 10% (Biowest) y mezcla de antibióticos; penicilina (u/ml) y estreptomocina a una concentración de 50mg/ml (Invitrogen). Las células fueron crecidas en placas de 24 pozos (Corning) en incubadora con CO₂:O₂ (5:95%) a 37°C hasta formar una monocapa homogénea.

6.3 Generación de vectores

6.3.1 Amplificación y clonación de la región 3'-terminal del gen EhCortexilina I en PCR2.1

La región 3'-terminal del gen se amplificó por medio de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) empleando DNA genómico de *E. histolytica* como molde, con los oligonucleótidos 5'C-end-CTXI y 3'C-end-CTXI-HSV los cuales contienen los sitios de restricción para las enzimas KpnI y BamHI y por otro lado con los oligonucleótidos 5'C-end-CTXI-2TK y 3'C-end-CTXI-2TK con los sitios de corte EcoRI y BamHI. El producto de estas amplificaciones se ligó al vector PCR2.1 respectivamente (ver sección 6.8) de acuerdo con lo establecido por Invitrogen. Se transformaron células competentes de *E. coli* cepa DH5 α con la reacción de la ligación y se sembraron en placas de agar con IPTG/X-gal (ver sección 6.10). Se seleccionaron colonias blancas, las cuales contienen el inserto para su posterior análisis (Vieira y Messing, 1982). Se corroboró la presencia del inserto mediante PCR de colonia.

La colonia positiva seleccionada se resembró en 5 ml de medio líquido LB (Luria-Bertani) con ampicilina (0.1 mg/ml) y se incubó a 37°C de 12 a 16 h para hacer una minipreparación de plásmido utilizando kit comercial (QIAGEN) .

Luego se efectuó un análisis de restricción con las enzimas KpnI y BamHI, para subclonar en el vector pExEhNeo y las enzimas EcoRI y BamHI para la subclonación en el vector pGEX-2TK (a 37°C por 1 h 30 min) esto para confirmar la presencia del inserto.

6.3.2 Subclonación en vectores de expresión

Se eligieron clonas del vector PCR2.1 de cada uno de los fragmentos amplificados por PCR para subclonar los fragmentos de la región carboxilo terminal, en el vector con promotores amebianos pExEhNeo (Nickel y Tannich en 1994) y en el vector de inducción pGEX-2TK. Para ello, se digirieron los vectores con las enzimas respectivas para su clonación, de esta manera se liberó el inserto de aproximadamente 1,113 pb. Se hizo una electroforesis con un gel de agarosa al 0.8%, purificándose la banda deseada (ver sección 6.7.2). El DNA obtenido de la purificación se ligó a los vectores pExEhNeo y pGEX-2TK previamente digeridos con KpnI/BamHI y EcoRI/BamHI respectivamente. Se transformaron células competentes DH5 α para la construcción pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV y BL21-DE3 (la cual es activada después de su inducción con IPTG) para la construcción pGEX-2TK/CTXI (317-753) en placas de agar LB-ampicilina (100mg/ml). Las colonias obtenidas se analizaron mediante PCR de colonia; las colonias positivas seleccionadas se resembraron en medio líquido LB con ampicilina para extraer DNA plasmídico mediante kit. El DNA obtenido se analizó mediante restricción con las enzimas de clonación respectivas para cada construcción (37°C por 1 h 30 min) para corroborar que el fragmento se integró correctamente. Confirmada la clonación correcta del inserto, se solicitó su secuenciación. El vector pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV fue replicado en 400 ml de medio LB y posteriormente purificado utilizando el kit Maxi kit (QIAGEN).

6.4 Amplificación de DNA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para amplificar las regiones específicas de DNA, ya sea para su análisis o para su ligación en un vector, se llevaron a cabo reacciones de amplificación por PCR utilizando la enzima DNA polimerasa rTaq (1U) (Amersham). En tubos para PCR se agregaron 10 µl de Buffer PCR 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl y 0.1% gelatin), mezcla de dNTPs 1.5 mM, oligonucleótidos sentido y antisentido (50µM), el DNA templado (100 ng) y MgCl₂ 1.5mM en un volumen final de 100 µl. El termociclador (*Perkin Elmer*) se programó con las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo a 94°C por 2 min; 30 ciclos de desnaturalización (94° por 1 min), hibridación (55° C por 1 min) y extensión (72°C por 2 min); y un ciclo a 72°C por 10 min.

6.5 Electroforesis en geles de agarosa

El DNA de los diversos experimentos fue analizado en geles de agarosa (Agarose low Labsitec) preparados en su mayoría a una concentración de 0.8% con buffer TBE 1X pH 8.3 (Tris base 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM) y además con 0.1 µg/ml de bromuro de etidio, el cual es una molécula que se intercala en el DNA y emite una intensa fluorescencia bajo luz ultravioleta, lo cual permite visualizar el material genético. Los geles de agarosa se dejaron polimerizar entre 20-30 min y se corrieron dentro de una cámara de electroforesis, inmersos en buffer TBE 1X. El voltaje empleado generalmente fue de 100 volts, sin embargo, en algunas muestras se empleó uno menor, durante un tiempo variable. Las muestras de DNA fueron previamente resuspendidas en buffer de carga 1X (azul de bromofenol 0.25%; xilen-cianol 0.25%; glicerol 30%) y corridas a la par con un marcador de peso molecular (Invitrogen 1 Kb DNA ladder). Las imágenes se tomaron con el dispositivo Alpha Innotech.

6.6 Digestiones con enzimas de restricción

Las diferentes reacciones con enzimas de restricción se llevaron a cabo con el buffer de reacción especificado por el fabricante (New England BioLabs) a una concentración final de 1X. Algunas enzimas utilizadas requerían BSA a una concentración final de 1X. Los diversos análisis de restricción para caracterizar la identidad de alguna colonia obtenida o para la obtención de fragmentos específicos se realizaron en un volumen 40 µl digiriendo aproximadamente 1 µg de DNA.

6.7 Obtención y purificación de DNA plasmídico

6.7.1 Purificación de plásmidos

La purificación de los plásmidos empleados se efectuó con el uso del kit comercial QIAGEN, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. De cada construcción se inoculó una de las colonias bacterianas positivas previamente analizada por PCR de colonia en 5 ml de medio LB adicionado con ampicilina, se incubó toda la noche a 37°C con agitación constante. El cultivo se centrifugó a 4 000 rpm por 12 min, se decantó e sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 250 µl de solución P1 (Tris 25mM pH 8; EDTA 50 mM, Glucosa 1% y RNasa A) en hielo. Después se adicionaron 250 µl de buffer P2 (NaOH 0.2M; SDS 1%) y se incubó por 3 min a temperatura ambiente, invirtiendo el tubo de 4-6 veces. Posteriormente, se agregó 350 µl buffer N3 (acetato de sodio 3M pH5.2; hidrocloreuro de guanidina) mezclándose por inversión. La mezcla se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a una columna QIAprep incluida en el kit, que permitió el paso de la muestra a través de la columna por centrifugación (13,000 rpm por 60 seg) y se eliminó el líquido. Esta columna se lavó dos veces con solución PE (etanol 70%) y posteriormente el DNA se eluyó de la columna con agua estéril preincubada a 55°C, durante dos minutos.

6.7.2 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Se utilizó el kit QIAEX II (QIAGEN) para purificar insertos o vectores se corrió la totalidad de la muestra de DNA en un gel de agarosa al 0.8%, posteriormente se visualizó la banda de interés en el transiluminador y se cortó cuidadosamente tomando la mínima cantidad de gel posible. El fragmento obtenido se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml, y se pesaron para adicionarle tres volúmenes de buffer QX1 para productos de arriba de 1 kb; se incubó a 50°C durante 10 min invirtiendo el tubo para disolver y homogeneizar la muestra durante el tiempo de incubación. Una vez que la agarosa se disolvió totalmente las muestras se colocaron en una columna incluida en el kit que tiene una membrana que permite la retención de moléculas de DNA, ésta se colocó dentro del tubo colector y se centrifugó a 14,000 rpm durante 60 seg eliminando el excedente encontrado en el tubo. Después se adicionaron 500 µl del buffer PE para lavar la membrana de sílica, se centrifugó a 14,000 rpm durante 60 seg y se eliminó el exceso de sustancia del tubo colector. Para secar la membrana se volvió a centrifugar a 14,000 rpm durante 1 min, después se obtuvo el DNA de las columnas agregando 50 µl de agua grado molecular, incubando 1 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min.

6.8 Ligaciones de DNA

Las secuencias de DNA se unen covalentemente mediante el uso de la enzima DNA Ligasa del fago T4 (Invitrogen). Para la mezcla de reacción se agregó 1 unidad de la enzima T4 DNA ligasa, la secuencia blanco (100ng), el vector al que se requiere ligar (100ng), y regulador de reacción 10X, el cual fue proporcionado por el fabricante. Para que la reacción tuviera una eficiencia adecuada, se dejó incubando 12-16 h a 16°C.

6.9 Preparación de bacterias competentes

Para realizar los diferentes ensayos de transformación se realizaron células competentes de *E. coli* de las cepas DH5 α y BL21-DE3. Una colonia de cada una de las cepas se creció en 5 ml de medio SOB (Bacto-triptona 2%; extracto de levadura 0.5%; NaCl 10mM; KCl 2.5mM; MgCl₂ y MgSO₄ 1M) a 37°C por 16 h con agitación constante. Se tomaron 2000 μ l de los cultivos y se crecieron en 95 ml de medio SOB más 1 ml de MgCl₂ y MgSO₄ 1M (1:1) y 20 mM de Glucosa. Se incubó a 37°C hasta alcanzar una D.O._{550 nm}=0.4-0.45. Las bacterias se colocaron en hielo por 10 min y centrifugadas 2300 rpm a 4°C. La pastilla celular se resuspendió en TFB₁ frío (C₃H₃KO₂ 30 mM; RbCl₂ ó KCl 100mM; CaCl₂ 10mM; MnCl₂ 50mM y glicerol 15%. La mezcla se mantuvo por 15 min en hielo y centrifugada 2300 rpm por 12 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla bacteriana se resuspendió en 8 ml de solución TFB₂ (MOPS 10 mM; CaCl₂ 75mM; RbCl₂ 10mM y glicerol 15%. Después se realizaron alícuotas de 200 μ l y estas se colocaron sobre hielo seco hasta que se congelaran, para ser almacenadas a -80°C.

6.10 Transformaciones de células competentes

Se transformaron células competentes de *E. coli* cepa DH5 α para el vector PCR2.1 y pExEhNeo y con la cepa BL21-DE3 para las construcciones con los vectores pGEX-2TK con las reacciones de ligación respectivas. Las bacterias se incubaron a 4°C por 30 min con 20 μ l de la ligación generada y posteriormente se les dio un choque térmico de 42°C por 90 seg en un baño precalentado. Posteriormente, las bacterias fueron colocadas sobre hielo por 2 min y se le adicionó 1 ml de medio LB, incubándose por 60 min a 37°C en agitación. Por último, el cultivo se centrifugó a 3,000 rpm por 5 min; la pastilla celular fue resuspendida en 100 μ l de medio LB, la cual fue cosechada en cajas LB con ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml (para vectores PCR2.1 y pGEX-2TK) y 70 μ g/ml (pExEhNeo).

6.11 Análisis de construcciones moleculares mediante PCR de colonia (PCR colony)

Después de la transformación de las distintas cepas bacterianas, las distintas colonias fueron analizadas por PCR para identificar aquellas que contuvieran la construcción molecular esperada. Se seleccionaron colonias bacterianas para ser tomadas con puntas de micropipeta, estas se resuspendieron en 5.75 µl de agua grado molecular contenida en tubos de PCR.

Después se realizó la siguiente mezcla de reacción: Buffer PCR 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl y 0.1% gelatin), mezcla de dNTPs 1.5 mM, oligonucleótidos sentido y antisentido (50µM), MgCl₂ 1.5mM y 0.5 U de DNA polimerasa Taq (Invitrogen). Las muestras fueron aforadas a un volumen de 12.5 µl e incubadas por 30 ciclos en las siguientes condiciones, 94°C por 2 min; 30 ciclos de desnaturalización (94° por 1 min), hibridación (55° C por 1 min) y extensión (72°C por 2 min); y un ciclo a 72°C por 10 min en un termociclador *Perkin Elmer*.

6.12 Electroporación de *E. histolytica* con vector pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV

Trofozoitos de *E. histolytica* fueron transfectados para sobre-expresar la región carboxilo terminal de EhCortexilina con el vector pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV y usando como control una cepa con el vector pExEhNeo por electroporación conforme a lo descrito previamente por Nickel y Tannich en 1994. Un cultivo confluyente de trofozoitos en 120 ml de medio TYI-S-33 fue lavado dos veces con 50 ml de PBS 1X pH 6.8 estéril previamente enfriado, y tres veces con el amortiguador Citomix incompleto frío (KCl 120 mM; KH₂PO₄/K₂HPO₄ 10 mM, pH 7.6; CaCl₂ 1.5 mM; Hepes 25 mM, pH 7.6; EGTA 2 mM; MgCl₂ 5 mM). Una vez realizados los lavados, las amibas se resuspendieron en 500 µl de Citomix completo (KCl 120 mM; KH₂PO₄/K₂HPO₄ 10mM, pH 7.6; CaCl₂ 1.5mM; Hepes 25 mM, pH 7.6; EGTA 2 mM; MgCl₂ 5 mM y ATP 2 mM). El DNA plasmídico obtenido a partir del kit comercial Maxi Kit (QIAGEN) fue resuspendido en un volumen de 50 µl de agua estéril e incubado

cada uno en su totalidad con las amibas tratadas. Las células fueron electroporadas (1200 V, 500 Ω y 25 μ F por 60 μ s) en cubetas de 0.4 cm. Dichas células se cultivaron en 120 ml de medio TYI-S-33 por 48 horas, pasado este tiempo las células fueron seleccionadas con G418 (10 μ gml⁻¹). Por último, las células resistentes al antibiótico post-transfección fueron sometidas a mayores concentraciones de la droga. Tanto la cepa con el vector pExEhNeo, como con la construcción pExEhNeo/CTX1 Δ (1-316)-HSV fueron mantenidas a 25 μ gml⁻¹ de G418.

6.13 Extracción de proteínas totales de *E. histolytica*

Un cultivo confluentes con 5 x10⁶ trofozoitos de *E. histolytica* fue lavado con NaCl 0.89% a 4°C. La pastilla celular fue resuspendida en un volumen de N-etilmaleimida, 100 mM PBS 1X pH 6.8. La muestra se homogeneizó y se llevó a cabo un proceso de congelación acetona-hielo y descongelación en hielo; se realizó esto tres veces. El lisado celular fue colocado en un baño frío agregando 4 ml de ácido acético glacial absoluto y 200 μ l de MgCl₂ 1 M en agitación suave por 30 min. El producto obtenido fue dializado a 4°C contra ácido acético glacial 0.5 M durante 48 h con cuatro cambios cada 12 horas. Posteriormente la muestra fue liofilizada y almacenada a 4°C (Warner y Gorestein, 1977).

6.14 Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Las proteínas obtenidas para los diversos ensayos fueron analizadas por electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida-SDS page al 12% (Laemmli, 1970). La fracción separadora de 30 ml se preparó con Acrilamida-bisacrilamida al 12% (Acrilamida-bisacrilamida 30:0.8; Tris 1M pH 8.8; SDS 10%; persulfato de amonio 10% y TEMED, aforado a 30 ml con agua bidestilada). La parte concentradora del gel se preparó con Acrilamida-bisacrilamida al 4% (Acrilamida-bisacrilamida 30:0.8; Tris 1M pH 6.8; SDS 10%; persulfato de amonio 10% y TEMED, aforado a 20 ml con agua bidestilada). Las muestras fueron preparadas en amortiguador de carga 1X (Tris 1 M pH 6.8; azul de bromofenol

0.001%; glicerol 10%; SDS 2%; 2-mercaptoetanol 10%). Se desnaturalizaron las muestras por calor a 96°C, por 5 min y colocadas en hielo por 120 seg. Los geles se corrieron a 40 volts durante toda la noche, en el buffer de corrida (Tris 25 mM; glicina 75 mM y SDS 10%). Los geles se tiñeron con azul de Coomasie R 0.25% en metanol 50% y ácido acético 7% durante 30 min. Las muestras se destiñeron con una solución de metanol 30% y ácido acético glacial 7%.

6.15 Ensayo tipo Western blot

Para la detección de la proteína recombinante pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV, se realizó la transferencia a partir de geles SDS-PAGE. La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se realizó empleando buffer de transferencia 5X (Tris base 50mM; glicina 40mM; etanol 20%) con pH 8.3. Las condiciones de la transferencia fueron: 80 V, 120 mAmp, durante 2 h en una cámara de transferencia húmeda (*Amersham Pharmacia Biotech*). Después de la transferencia las membranas se dejaron bloqueando con una solución de PBS 1X (NaCl 150 mM; KCl 2.7 mM; Na₂HPO₄ 5 mM; KH₂PO₄ 1.8 mM) y leche descremada al 5% por una hr. Se colocó el anticuerpo primario anti-rabbit HSV en una dilución 1:1,000 en una solución de PBS 1X y leche al 5% toda la noche y en agitación constante. Realizado esto, se hicieron tres lavados con PBS 1X con Tween 20 al 0.05% y se añadió el anticuerpo secundario acoplado a HRP (*Zymed*) en una dilución 1:1,500 en una solución de PBS 1X y leche al 5% por 4 horas a 37°C. Se empleó el sistema ECL Western Blotting Detection Reagents (*GE Healthcare*) para el revelado.

6.16 Ensayo de inmunoprecipitación de la proteína recombinante pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV

Para la identificación de complejos proteicos asociados a la región carboxilo terminal de EhCortexilina I se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando perlas magnéticas, de acuerdo con lo descrito por Xiao y col; 2015. Células transfectantes con el vector pExEhNeo y con la construcción

generada se cultivaron con $25 \mu\text{gml}^{-1}$ de G418 hasta alcanzar la confluencia. Se utilizaron 8×10^6 células, las cuales se centrifugaron a 1500 rpm durante 4 min a 4°C . Las pastillas celulares se lavaron dos veces con PBS 1X pH 6.8, posteriormente se le adicionó buffer de lisis frío (HEPES 20mM pH 7.4., Glicerol 20%, EGTA 1 mM., Tween 20 al 0.1%, IGEPAL al 1%, Tritón X-100 al 1%, CHAPS al 0.5 %, Complete 1X., NEM 20mM., PMSF 1mM., Iodoacetamida 2mM). Se realizaron dos ciclos de congelamiento-descongelamiento en un baño de hielo seco-acetona y descongelándose a 4°C . Se centrifugó la mezcla a 1000 rpm durante 5 min a 4°C , se recuperó el sobrenadante el cual contenía 100 μl de *Beads Protein A Magnetic* (Bio Rad), las cuales previamente fueron equilibradas con buffer de lisis frío. Se dejaron interactuando durante 3 h a 4°C con rotación suave; esto con la finalidad de eliminar interacciones inespecíficas con las perlas. Se obtuvo el sobrenadante el cual se transfirió nuevamente a un vial con perlas magnéticas equilibradas con buffer de lisis y acopladas con 10 μg de anti-HSV obtenido en conejo (Sigma). Se dejó interactuando durante toda la noche a 4°C con rotación suave. Posteriormente se retiró el sobrenadante apartando 100ml y se lavaron tres veces con PBS 1X las perlas recuperadas. A ambas muestras se les adicionó buffer de muestra 2X (Laemmli, 1970), se hirvieron durante 5 min, se centrifugaron a 14000 rpm a 4°C . Se transfirió el sobrenadante de ambas muestras a viales para su análisis en geles SDS-PAGE.

6.17 Análisis celular

6.17.1 Ensayo de proliferación

El número de trofozoitos de la cepa experimental pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV fue determinado cada 24 h durante siete días por conteo usando un hemocitómetro (Neubauer). El número de células de cultivos seleccionados con $25 \mu\text{gml}^{-1}$ de G418 en viales de vidrio de 12 ml con tapa fue cuantificado por triplicado; los datos obtenidos son el promedio de 3 observaciones.

6.17.2 Ensayo de migración de transfectantes pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV

Un cultivo confluyente de transfectantes con el vector pExEhNeo y con la construcción pExEhNeo/CTXIΔ (317-753)-HSV, con aproximadamente 7×10^6 cada uno, fue incubado con medio TYI-S-33 sin suero por tres horas a 37°C. Posteriormente, las amibas fueron despegadas incubando las cajas a 4°C por 10 min y centrifugadas 1500 rpm por 4 min. Las pastillas celulares fueron lavadas dos veces con TBS-CaCl₂ (Tris 50mM pH 7.2; NaCl 150mM y CaCl₂ 1 mM). Los trofozoitos fueron centrifugados a las mismas condiciones anteriormente descritas y la pastilla celular fue resuspendida con TBS- CaCl₂ agregando BSA al 1%. Se usaron cámaras con un filtro de 6.5 mm de diámetro y poros de 8 μm (*Transwell, tissue culture-treated*); en la cámara superior se agregaron 125 μl con 1×10^4 amibas, en la parte inferior del pozo se adicionó medio TYI-S-33 (600 μl) suplementado con suero fetal bovino como quimioattractante. Como control se colocó TYI-S-33 sin suero fetal bovino. Las muestras se incubaron por dos horas a 37°C; pasado este tiempo, las células que migraron y se encontraban en la parte inferior de la cámara se separaron incubando la caja a 4°C por 10 min. Las células que migraron se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 1X por 30 min a 37°C. Se realizó la cuantificación de las células que migraron por medio de una cámara Neubauer.

6.17.3 Efecto citopático de transfectantes pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV

Con la finalidad de evaluar la capacidad de las células transfectantes que sobreexpresan la región carboxilo terminal de EhCortexilina para destruir monocapas celulares, se siguió el protocolo descrito por Orozco y col; 1978. Se utilizó como control la cepa transfectada con el vector pExEhNeo y la experimental, ambas se crecieron en 25 μgml⁻¹ de G418, se cultivaron en cinco tubos de vidrio con medio TYI-S-33. Una vez que alcanzaron la confluencia con aproximadamente 5×10^6 de células, los trofozoitos de ambas cepas

fueron lavados tres veces con medio sin suero. Se centrifugaron las transfectantes a 1500 rpm por 4 min a 4°C, la pastilla celular se resuspendió en 1 ml de medio TYI-S-33 sin suero. Se realizaron conteos de las amibas usando cámara de Neubauer, ajustándose a 1×10^5 , 2.5×10^5 y 5×10^5 células/ml. Se colocó 1 ml de cada una de las cepas sobre una monocapa confluyente de células epiteliales MDCK en una placa de 24 pozos (Corning), la cual fue previamente lavada con PBS 1X pH 6.8 y medio TYI-S-33 sin suero.

Se incubó la placa a 37°C por 1 hora 30 min, monitoreándose la destrucción cada 30 min. Como control negativo del procedimiento, se tomaron tres pozos libres de amibas, incubados con medio sin suero a lo largo del experimento. Una vez que la cepa control alcanzó el 80% de la destrucción de la monocapa, se detuvo el procedimiento colocando la placa a 4°C por 15 min. Se realizaron lavados con PBS 1X pH 7.4 con la finalidad de quitar la mayor parte de los trofozoitos adheridos, esto incubando la placa a -20°C durante 180 seg. Los residuos de la monocapa se fijaron con 500 μ l de Glutaraldehido al 2.5% en PBS 1% a temperatura ambiente por 15 min. Las células remanentes MDCK se tiñeron con azul de metileno al 1% en solución de boratos pH 8.7 (ácido bórico 0.2M; tetraborato de sodio 0.05M); el exceso de colorante se eliminó realizando lavados con solución amortiguadora de boratos. Para la determinación del porcentaje del daño, se realizó la extracción del colorante colocando 1 ml de HCl 0.1N durante 30 min a 37°C. Se recuperó el colorante y se realizó una dilución 1:10 en HCl 0.1N y fue leído en el espectrofotómetro *Infinite F500* (Tecan) a 660nm. Los pozos controles negativos libres de trofozoitos se tomaron como el 0% de destrucción de la monocapa. El valor promedio de los pozos que estuvieron en contacto con la cepa transfectada con el vector pExEhNeo fue tomado como el 100% de la destrucción. A partir del 100% de destrucción fue calculado el porcentaje de destrucción realizado por las transfectantes experimentales.

6.17.4 Ensayo de adhesión a monocapa de células MDCK de transfectantes pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV

Los trofozoitos de ambas cepas (5×10^5) fueron lavados tres veces con medio sin suero preincubado a 37°C. Se centrifugaron las transfectantes a 1500 rpm por 4 min a 4°C, la pastilla celular se resuspendió en 1 ml de medio TYI-S-33 sin suero. Se realizaron conteos de las amibas usando cámara de Neubauer, ajustándose a 1×10^5 células/ml. Se colocó 1 ml de cada una de las cepas sobre una monocapa confluyente de células epiteliales MDCK en una placa de 24 pozos (Corning), la cual fue previamente lavada con PBS 1X pH 6.8 y medio TYI-S-33 sin suero. Se dejó incubado la placa a 37°C durante 20 min, transcurrido el tiempo de incubación se agregó paraformaldehído al 8% preincubado a 37°C. Las células se fijaron por 40 min a 37°C, después de este tiempo se recuperaron los sobrenadantes (con el fijador) en cada una de las condiciones analizadas y se cuantificaron los trofozoitos no adheridos a la placa, con ellos se realizó la relación de las células adheridas considerando a 1×10^5 como total.

6.18 Inmunofluorescencia y microscopia confocal

Para identificar la localización celular de la proteína HSV-tagged EhCTXI Δ (1-316) en los trofozoitos transfectados se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Transfectantes de pExEhNeo y de la construcción obtenida de EhCortexilina I se adherieron a cubreobjetos previamente tratados con fibronectina 100 μ g/ml. Se dejó incubando 5×10^5 células en medio TYI-S-33 sin suero por 30 min a 37°C para que se adhirieran a los cubreobjetos. Algunas muestras se estimularon con eritrocitos serotipo A+ (1×10^8) y se dejaron incubando por 180 seg. Para el caso de las transfectantes estimuladas con Concaivalina A 350 (Molecular Probes) se adicionó la lectina a una concentración de 80 μ g/ml en PBS 1X pH 6.8 durante 20 min a 37°C. Después se realizaron lavados con PBS 1X pH 6.8 preincubado a 37°C para eliminar las células no adheridas. Posteriormente, se fijaron las células con

paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 40 min a 37°C, se realizaron los lavados pertinentes para eliminar la solución de fijado. Una vez fijadas las células, se permeabilizaron las amibas con Tritón X-100 al 0.1% durante 3 min y se adicionó NH₄Cl 50mM y se dejó en incubación a 37°C por 20 min. Los cubreobjetos con las células adheridas se dejaron bloqueando con una solución de PBS 1X; BSA 1% en una cámara húmeda cubierta de la luz, esto por 1 h. Se eliminó la solución de bloqueo y se dejó interactuando durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo producido en conejo anti-HSV (1:150) preparado en PBS 1X-BSA 1%. Se lavó la solución con el anticuerpo primario y se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a FITC a una dilución 1:300 (Zymed) preparado en PBS-BSA 1% durante 1 h a 37°C. Adicionalmente se tiñeron los filamentos de actina con faloidina rodaminada (Invitrogen) durante 20 min a 37°C. Finalmente, las células en los cubreobjetos se lavaron abundantemente por inmersión en PBS 1X y se montaron en portaobjetos con 10 µl de Vectashield con DAPI (y sin DAPI, para el caso de muestras con Concavalina A). Las muestras fueron analizadas con un microscopio confocal.

6.19 Inducción de proteínas recombinantes

Para la inducción de las diferentes Rho GTPasas de amiba (Aguilar-Rojas y col; 2005; Gonzales de la Rosa y col; 2006) y la fracción correspondiente a pGEX-2TK/CTXI (317-753) se crecieron en cultivos bacterianos en 5 ml de 2XYT-Ampicilina (Bacto-triptona 1.6%; extracto de levadura 1%; NaCl 85 mM y ampicilina 100 µgml⁻¹ durante 16 horas a 37°C con agitación constante. Estos cultivos se llevaron a una fracción mayor con medio 2XYT-Ampicilina (1:100) hasta alcanzar un D.O._{590 nm}=0.5-1.0. Al alcanzar la D.O._{590 nm} se agregó IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranos) a una concentración final de 500 µM y fueron incubados durante 4 horas. Después de este tiempo, se centrifugaron en el rotor GSA (Sorval) a 5000 rpm 4°C por 20 min.

6.19.1 Purificación de proteínas recombinantes solubles

El método de purificación soluble se utilizó para las proteínas EhRacG, Ras1 (Aguilar-Rojas y col; 2005), la región correspondiente a EhCTX1Δ (1-316)-GST, así como también el control negativo (cepa transformada con el vector pGEX 2TK). La pastilla celular se resuspendió en 2.5 ml de PBS 1X, al cual se le adicionó PBS 1X; DTT 100mM. La solución se homogeneizó y se dejó reposando en hielo por 5 min. Pasado el tiempo descrito, las muestras se sonicaron tres veces durante un minuto en intervalos de 10 seg, con una amplitud de 40 volts y pausado por un minuto en hielo. Después, las muestras se centrifugaron en el rotor SS34 (Sorval) a 10,000rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se colocó en un tubo nuevo, al cual se le adicionó PBS 1X; Tritón X-100 al 10% y resina Sepharosa 4B-GST (Novagene), la cual fue previamente equilibrada en PBS 1X pH 7.4. Las proteínas se mantuvieron interactuando por 16 horas a 4°C. Pasado este tiempo, la resina fue colocada en una centrífuga clínica y se centrifugó a 1500 rpm, durante 2 min; se realizaron 10 lavados con 10 volúmenes de PBS 1X para eliminar los contaminantes existentes en la muestra. Cada una de las proteínas recombinantes se eluyeron en amortiguador de muestra 1X (Laemmli, 1970), se calentaron a 95°C por 5 min para después colocarse en hielo durante 60 seg. La mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min; los sobrenadantes se analizaron mediante gel SDS-PAGE.

6.19.2 Purificación de proteínas recombinantes con cuerpos de inclusión.

Para las proteínas EhRho1, EhRas1, EhRacA, EhRacB, EhRacC, EhRacD y EhActina se utilizó el método de solubilización de cuerpos de inclusión (Frangioni y Neel, 1993). Por cada litro de medio inducido de bacterias, se adicionaron 500 µl de lisozima 10 µgml⁻¹ (Sigma) manteniéndolo en hielo por 15 min. Después se adicionaron 5 ml de solución STE (Tris-base pH 8 10mM; NaCL 150 mM) para dejarse incubando por 15 min sobre hielo.

Pasado este tiempo, se agregaron STE; DTT 100mM, se incubó la solución por 8 min a 4°C; inmediatamente después se agregó STE; Sarcosil 10%.

Las muestras se sonicaron tres veces durante un minuto en intervalos de 10 seg, con una amplitud de 40 volts y pausado por un minuto en hielo. Después, las muestras se centrifugaron en el rotor SS34 (Sorval) a 10,000rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se colocó en un tubo nuevo, al cual se le adicionó STE; Tritón X-100 al 10% y resina Sepharosa 4B-GST (Novagene), la cual fue previamente equilibrada en PBS 1X pH 7.4. Las proteínas se mantuvieron interactuando por 16 horas a 4°C. Pasado este tiempo, la resina fue colocada en una centrífuga clínica y se centrifugó a 1500 rpm, durante 2 min; se realizaron 10 lavados con 10 volúmenes de PBS 1X para eliminar los contaminantes existentes en la muestra. Cada una de las proteínas recombinantes se eluyeron en amortiguador de muestra 1X (Laemmli, 1970) y se analizaron con el procedimiento anteriormente descrito.

6.19.3 Purificación de EhCdc42 acoplada a polihistidinas.

La purificación de la proteína recombinante EhCdc42 (González de la Rosa y col; 2006) se realizó mediante el protocolo para proteínas con cuerpos de inclusión acopladas a un tracto de histidinas. Se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente para proteínas recombinantes acopladas a GST con algunas modificaciones: la concentración final de IPTG fue de 1mM. Se utilizó buffer de sonicado (Tris 20mM pH 8; NaCl 100mM) para resuspender las bacterias, así como N'Lauril-Sarcosil al 10% en buffer de sonicado antes de realizar el proceso de sonicado. Se purificó la proteína recombinante usando resina de níquel *TALON* (Clontech Laboratories), la cual se equilibró previamente con buffer de sonicado. La muestra se puso a interactuar con la resina y se le adicionó Tritón X-100 al 10% en buffer de sonicado, esto durante 16 horas a 4°C. La resina de níquel se lavó en 10 ocasiones con solución de lavados (Tris 20mM pH 8, NaCl 100mM; 10 mM Imidazol).

6.20 Marcaje radiactivo de proteínas

Las proteínas EhCTX1Δ (1-316)-GST y la correspondiente al vector pGEX-2TK fueron marcadas conforme a lo descrito por Zhao y col; 2001. El marcaje radiactivo se realizó a 32°C en un volumen total de 250 μl de buffer cinasa (HEPES 50mM pH 7.3; MgCl₂ 10 mM; MnCl₂ 2mM) el cual contenía 25 U de PKA, subunidad catalítica (Sigma), 5μCi de [γ -³²P] ATP y aproximadamente 100 μg de proteína acoplada a resina Glutation Sepharosa. Transcurrida una hora de incubación, la mezcla se colocó en una jeringa con fibra de vidrio en la base, permitiendo el paso del líquido con la marca radiactiva libre, pero no de la proteína acoplada. La resina se lavó con 3 ml de buffer cinasa y se transfirió la proteína marcada a un vial. Después se adicionó 200 μl de buffer de elución (Tris 50 mM pH 8; Glutation reducido 30 mM; NaCl 0.2M), se incubó por 8 min a 55°C, se colocó en hielo y se centrifugó la muestra 2000 rpm durante 120 seg.

El sobrenadante se dejó dializando toda la noche a 4°C en una solución de unión (HEPES 50mM pH 7.3; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5mM; 0.5μg/ μl BSA); esto para el caso del ensayo de *dot blot* lipídico. Las proteínas marcadas para el ensayo de *Overlay* proteína-proteína, se obtuvieron de la misma manera, sólo que las muestras se dejaron dializando en buffer de lisis (Tris 50mM pH 8; KCl 50 mM; EDTA 10 mM; Nonident P-40 1%).

6.21 Análisis de interacción proteica.

6.21.1 *Dot blots* lipídicos.

Se utilizaron membranas comerciales que contienen goteados diferentes fosfolípidos *PIP Strips* (Molecular Probes), siguiendo el protocolo del fabricante. Las membranas fueron bloqueadas durante toda la noche a 4°C con TBS-T (Tris 10mM pH 8; NaCl 150mM; Tween 20 0.1%) suplementado con BSA 3%. Después, se desechó la solución de bloqueo y se incubaron las membranas con la proteína radiactiva en solución de unión a 4°C durante toda la noche. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las membranas se lavaron tres veces con 30 ml de TBS-T y se dejaron exponiendo en un casset de exposición cubierto con placas autorradiográficas (GE Healthcare).

6.21.2 Overlay proteína-proteína.

Las proteínas en estudio se analizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12%, uno de ellos se tiñó con azul de Coomassie y los otros fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante toda la noche a 4°C con buffer de lisis (Tris 10mM pH 8; NaCl 150mM; Tween 20 0.1%) suplementado con BSA 10%. Después, se desechó la solución de bloqueo y se incubaron las membranas con la proteína radiactiva en solución de unión a 4°C durante toda la noche. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las membranas se lavaron tres veces con 30 ml de buffer de lisis y se dejaron exponiendo en un casset de exposición cubierto con placas autorradiográficas (GE Healthcare).

7. RESULTADOS

7.1 Análisis *in silico* de EhCortexilina I en *E. histolytica*

La proteína que se une a filamentos de actina Cortexilina I fue caracterizada inicialmente en el organismo con fase ameboide *D. discoideum*, sin embargo, diversos estudios sugieren que dicha proteína podría estar desempeñando un papel relevante en procesos involucrados en la patogenia del *E. histolytica*. Se realizó la búsqueda en la base de datos del genoma del parásito (amoebaDB) la secuencia del gen EHL_191900, el cual codifica para la proteína EhCortexilina I. El tamaño del gen es de 2,376 pb, cuenta con dos regiones intrónicas en la región amino; por lo tanto posee una secuencia codificante de 2,262 pb. El primer intrón abarca desde la región 66-127 pb, mientras que el segundo se encuentra entre los nucleótidos 430 y 484 (Figura 8A). Ambos intrones cuentan con la secuencia correspondiente al sitio donador de splicing "GTTTGTT" y el sitio aceptor de splicing "TAG" y cada uno de ellos está conformado por 60 pb y 54 pb respectivamente, tal como se ha reportado en otras secuencias intrónicas del parásito (Willhoeft y col; 2001).

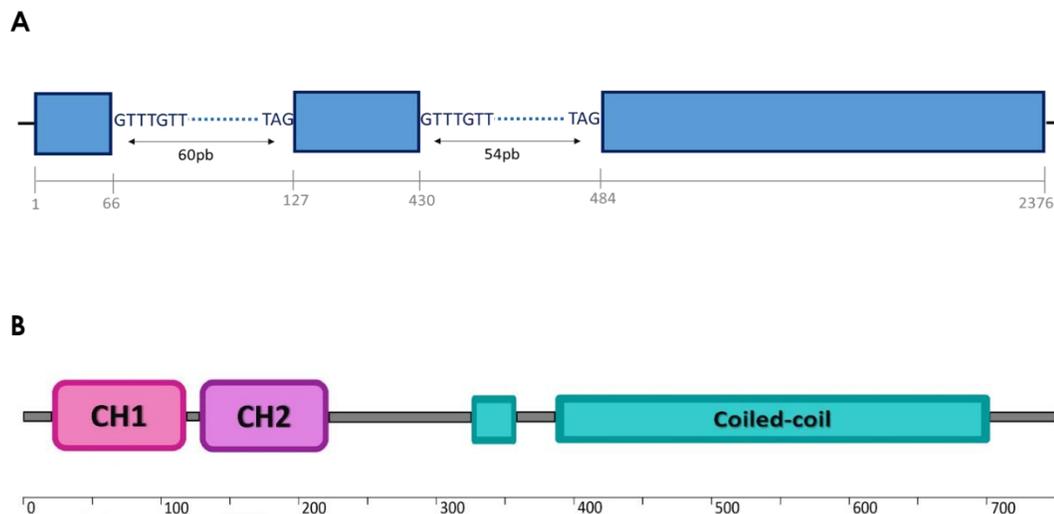


Figura 8. Representación gráfica de las regiones génicas (A) y dominios proteicos de EhCortexilina I (B).

El transcrito generado codifica para una proteína con un peso molecular predicho de 89.2 kDa, conformada por 753 aa (figura 8B) Para confirmar la presencia de dominios probables en la proteína EhCortexilina, se analizó la secuencia de aminoácidos con los programas disponibles en la red Pfam, Superfamily y SMART 7 encontrando que ésta posee dos dominios del tipo CH (*Calponin homology*) en la región amino terminal, tal como lo reportado para la proteína existente en *D. discoideum* (Faix y col;1996) . El dominio denominado CH1 se encuentra en la región comprendida por los aminoácidos 20-119; mientras que el CH2 se localiza entre los residuos 128-223. Hacia la región terminal de la proteína se identificó una región *coiled-coil*, la cual según Faix en el 2001, le permite a la proteína formar heterodímeros paralelos con su proteína hermana Cortexilina II, esto en el caso de *D. discoideum*. Este dominio se localiza entre las regiones comprendidas por los residuos 327-357 y 386-700 aa. Sin embargo, se realizaron más análisis con otras herramientas bioinformáticas (molbiol-tools.ca/Motifs) para tratar de identificar la presencia de otros dominios putativos; interesantemente se encontró un motivo de unión a fosfoinositidos en la región 459-484 aa. Y por último, con el uso de este programa, se logró encontrar la probable presencia de un dominio GBD-FH3 (331-699aa). Este dominio se encuentra en proteínas que se unen a los filamentos de actina como lo son las Forminas (Rivero y col; 2005), interactuando con proteínas que forman parte de la familia de las Rho GTPasas, participando en la regulación de las funciones de la misma en la dinámica del citoesqueleto de actina (Bechtold y col; 2014).

Esta serie de análisis bioinformáticos nos permitió identificar regiones probables presentes en la proteína del parásito que ya se han determinado en *D. discoideum* y otras que no han sido reportadas. Este organismo posee tres proteínas que forman parte de las Cortexilinas (I, II y III) las cuales presuntamente, tienen características y funciones distintivas entre sí (Liu y col; 2014).

Analizando la base de datos de *E. histolytica* logramos identificar tres proteínas que forman parte de la familia de Cortexilinas: EhCortexilina II (EHI_103430; 584 aa); EhCortexilina (EHI_104560; 560aa) y EhCortexilina I (EHI_191900; 753aa), la cual es de nuestro interés por los antecedentes antes mencionados.

Con la finalidad de determinar las diferencias encontradas entre estas proteínas con Cortexilina I de *D. discoideum*; se realizaron una serie de alineamientos con el programa Jalview 2.10.1 para determinar regiones conservadas entre las secuencias aminoacídicas, encontrando que EhCortexilina I tiene un score de identidad con DdCortexilina I del 24.24% y con su proteína hermana EhCortexilina II (584aa) del 24.48%, indicando que existen algunos residuos similares entre ella, pero no son idénticas entre sí. Analizando la homología entre las tres proteínas, observamos que existe cierto grado de conservación entre EhCortexilina I y la proteína de 580 aa's (22.64%); mientras que entre esta última y EhCortexilina II es de 36.86% indicando que entre ellas existen mayor número de residuos conservados. Además, como se puede observar en la figura 9, las diferencias más plausibles recaen en la región carboxilo terminal de EhCortexilina I, que correlaciona con el probable dominio existente GBD-FH3 y sugiere que tal vez dichas proteínas realicen funciones diferentes en el parásito.

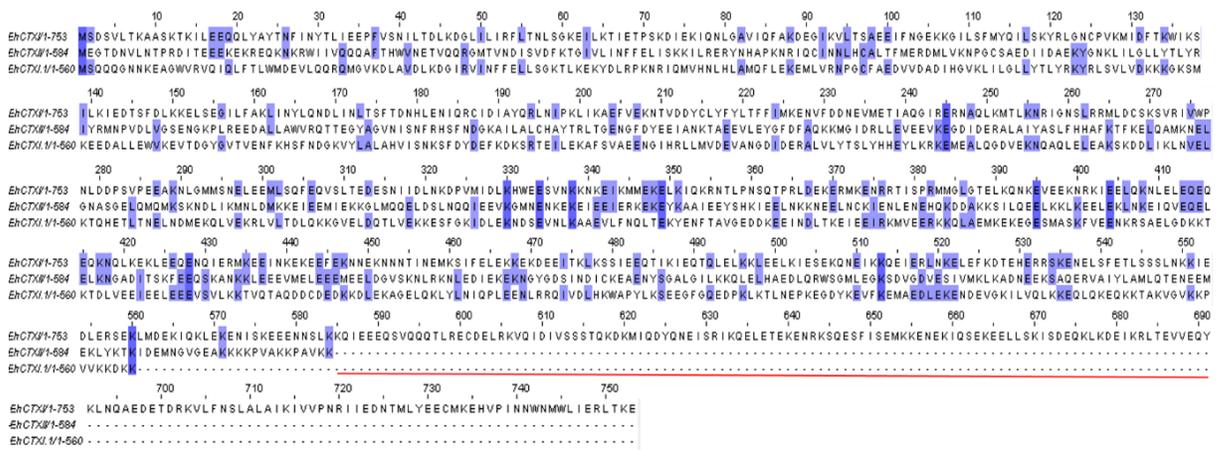


Figura 9. Multialineamiento de proteínas de la familia de Cortexilinas en *E. histolytica*. De azul se muestran los residuos conservados entre las tres proteínas. La línea roja en la parte posterior representa la falta de residuos para comparación con EhCortexilina II y EhCortexilina560.

Sabiendo que las proteínas que forman parte de la familia de Cortexilinas en *E. histolytica* difieren entre sí, nos preguntamos si existen similitudes en las proteínas Cortexilina I encontradas en diferentes especies de *Entamoeba*. Realizando los análisis pertinentes comparamos a la proteína del parásito que infecta monos *E. nuttalli* y la especie no patógena *E. dispar*; las dos primeras proteínas son idénticas entre sí, sin embargo entre ellas y la proteína EdCortexilina I se observa la carencia de una región de 214 aa en la región que corresponde al dominio probable *coiled-coil* y parte del GBD-FH3 (Figura 10).

Esto es interesante ya que *E. dispar* es la especie más cercana a la patógena *E. histolytica*, son morfológicamente idénticas y entre sus genomas no existen grandes diferencias (Weedall y Hall y col; 2011). Lo anterior es de gran relevancia ya que daría un indicio del papel en la patogéncia del parásito de la proteína EhCortexilina I.

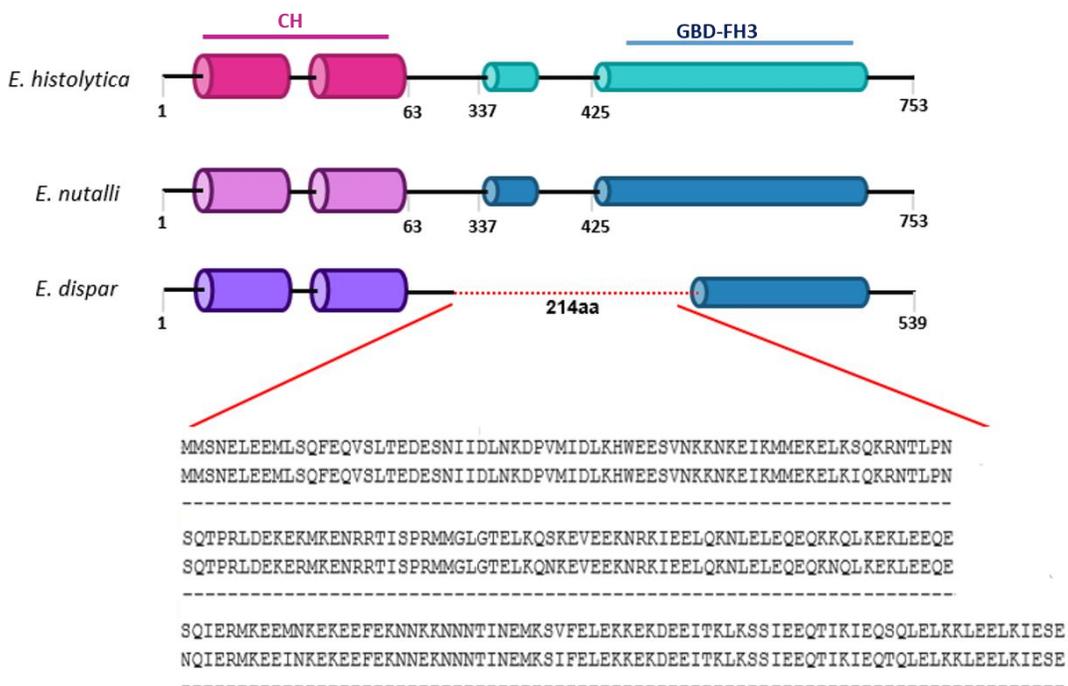


Figura 10. Cortexilina I en diferentes especies de *Entamoeba*. Representación simbólica de las regiones proteicas de Cortexilina I.

Al conocer que existen diferencias importantes entre EhCortexilina I con sus proteínas hermanas y las encontradas en especies de *Entamoeba*, así como su compañera en el organismo *D. discoideum*, decidimos analizar por separado los dominios identificados en la proteína. Como se mencionó anteriormente, se localizaron dos dominios del tipo CH, EhCortexilina, al igual que su proteína ortóloga en *D. discoideum* dominios de homología con calponina del tipo tipo 2, según lo reportado por Stradal y col; 1998; los cuales poseen otras ABP's como α -actinina, espectrina, ABP-120, entre otras y constituyen la región de unión con los filamentos de actina (Bañuelos y col; 1998). Realizando una serie de alineamientos de cada uno de estos dominios en la proteína con Cortexilina I de *D. discoideum* y de α -actinina así como de espectrina de humano, distinguimos que la región CH1 tiene un score de identidad de 31% (Figura 11 A), mientras que el dominio CH2 tiene menor homología, con un 20% (Figura 11B). Por medio de mutagénesis y deleciones fueron mapeados los sitios de unión con F-actina en esta serie de dominios (*Actin-binding sites* ó *ABS*) en las diferentes proteínas que los poseen (Sjöblom y col;2008; Norwood y col; 2000); interesantemente encontramos los tres sitios probables (ABS1;ABS2;ABS3) que han sido reportados en otras proteínas con motivos CH en EhCortexilina I, lo cual indica que probablemente esto dominios le sirvan a la proteína a unirse con los filamentos de actina, al igual que otras que pertenecen a las del mismo tipo (Figura 11)

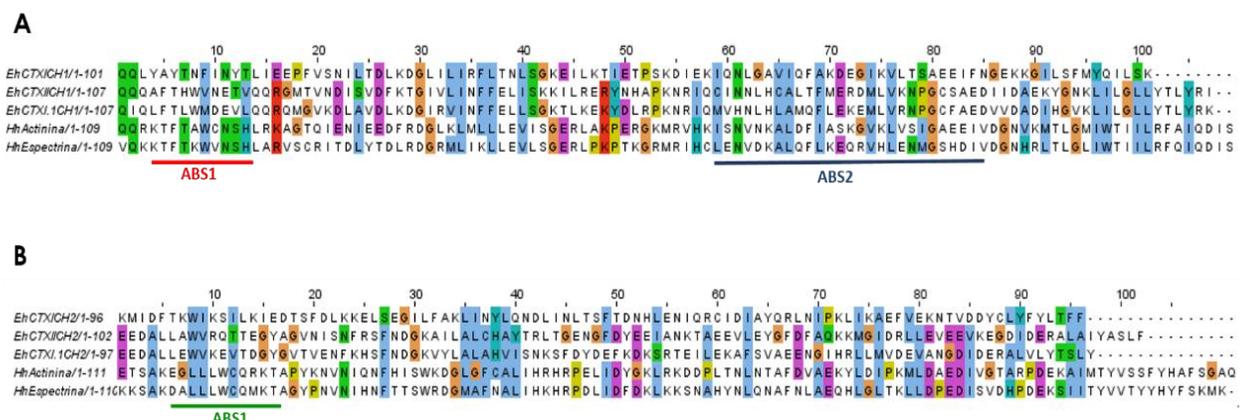


Figura 11. Multialineamientos de dominios de Homología con Calponina CH en Cortexilinas de *E. histolytica* y otras ABP's. A) Alineamiento de dominios CH1 en las diferentes Cortexilinas del parásito y ABP's de humano. B) Alineamiento de dominios CH2 en Cortexilinas y ABPs como α -actinina y espectrina en humano. Los colores indican el valor de similitud, según el programa ClutalW. Las regiones ABS1,2,3 se encuentran indicadas por una barra de color en la parte superior.

Aunado a esto, Singh y Mallela en el 2012 realizaron un modelado de la conformación tridimensional de los dominios CH, en el cual se propone que cada uno de ellos se une a los filamentos de actina formando una estructura tipo “bisagra”; es por ello que realizamos un modelado por homología utilizando los programas SWISS-MODEL (Biasini y col; 2014), Phyre2 (Kelley y col; 2015) y Psipred (Kosciolek y Jones, 2014). Se utilizó como molde la estructura obtenida por Sjcblohm y col; 2008 de la región de homología con calponina en α -actinina de *Homo sapiens*, de la cual obtuvimos un modelo similar que tiene un porcentaje de identidad del 26.9%. El modelo (Figura 12) tiene una conformación similar a la observada anteriormente, además cada uno de los CH está conformado por 4 α -hélices. Esto se corroboró con la estructura secundaria de los dominios en EhCortexilina, encontrando que cada uno posee las cuatro estructuras que el sirven para unirse a los filamentos de actina (Bañuelos y col; 1998).

Hacia la región carboxilo terminal, fuimos capaces de encontrar un sitio de unión a fosfoinositidos, como fosfatidilinositol (4,5) bifosfato. Esta secuencia identificada en la proteína EhCortexilina I se comparó con un péptido lo encontrado por Stock *et al.*, en 1999 en DdCortexilina I, obteniendo un score de identidad del 39.3%, indicando que existen ciertos residuos que se conservan entre ambas, que como se puede observar en la figura 13A, en su mayoría son lisinas las cuales se encuentran en las posiciones 7, 15 y 17 de estas regiones.

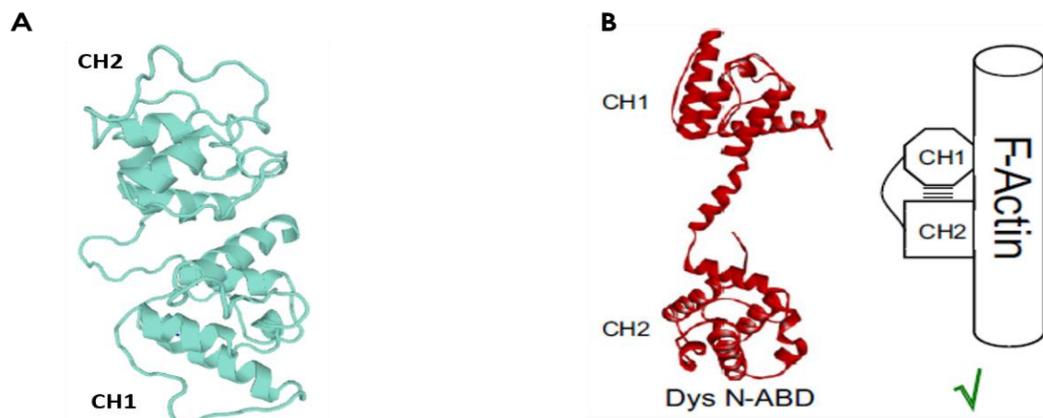


Figura 12. Modelado por homología de dominios de homología con calponina CH em EhCortexilina I(A) Estructura tridimensional de los dominios CH en la proteína distrofina de conformación cerrada con F-actina (B).

De manera relevante, encontramos un dominio hipotético del tipo GBD-FH3, presente en forminas. Las forminas son proteínas que promueven el rápido ensamblaje de filamentos de actina y además permiten la reorganización local de estructuras celulares con funciones muy específicas como la tracción celular y movimiento (Goode y Eck, 2007); la unión de Rho GTPasas en su forma activa al dominio GBD-FH3 de las forminas, induce la formación de fibras de estrés, fibras de actina y del anillo contráctil en en proceso de citocinesis celular (Majumder y Lohia, 2008).

Al realizar los alineamientos usando los dominios presentes en EhForminas 1 y 2, al igual que en la proteína Formina A de *D. dictyostelium* con la región que alberga al GBD-FH3 hipotético de EhCortexilina I (Figura 13B), encontramos que existen un 16% de identidad entre todas estas proteínas, que a pesar de ser un porcentaje bajo, correlaciona con el hecho de que este tipo de dominios es poco conservado y no se encuentra presente en todas las proteínas con homología a forminas (Higgs, 2005).

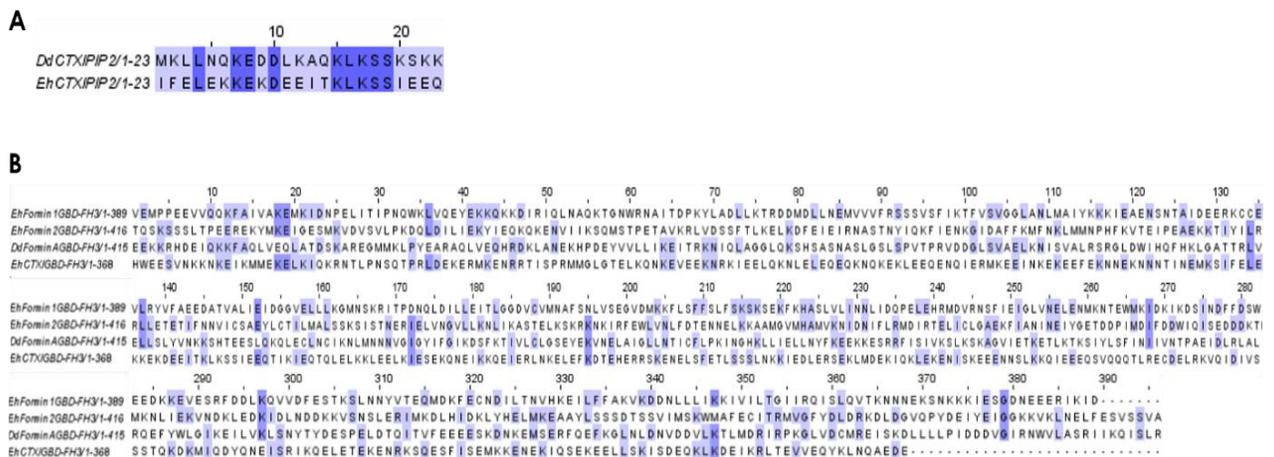


Figura 13. Alineamientos de regiones hipotéticas identificadas en la región carboxilo terminal de EhCTXI. A) Alineamiento de secuencia correspondiente al péptido de unión a fosfoinosítidos B) Multialineamiento de dominios GBD-FH3 en EhForminas y DdFormina A con el dominio hipotético de EhCTXI. De azul obscuro se muestran los aminoácidos muy conservados y de azul claro los que tienen bajo grado de conservación, según el programa Jalview.

Las proteínas que se unen a los filamentos de actina son reguladas a diferentes niveles, esto debido a la serie de dominios que poseen. Uno de los niveles más importantes incluye la regulación por modificaciones postraduccionales, tales como fosforilaciones, ubiquitinaciones, sumoilaciones, etc (Heissler y Sellers, 2016). Con la finalidad de identificar probables sitios de regulación de EhCortexilina I, hicimos una búsqueda de residuos modificados postraduccionamente, encontrando una gran cantidad de aminoácidos que podrían ser fosforilados (Tabla I) con porcentaje de probabilidad entre el 98-99%; además logramos identificar dos sitios probables de sumoilación en la proteína (63-66%), localizados en la región donde se encuentra el dominio CH1 y hacia la región del dominio *coil-coiled* (Tabla II).

Tabla 1. Residuos con probabilidad de ser fosforilados en la proteína EhCortexilina I

Residuo	Posición	Porcentaje de probabilidad
T	13	98%
S	97	99%
S	380	98%
S	461	99%
S	479	98%
S	480	99%
S	534	99%
S	575	99%
S	645	99%
S	662	99%
S	669	99%

Tabla 2. Péptidos con probabilidad de ser sumoilados en las proteína EhCortexilina I

Residuo	Posición	Porcentaje de probabilidad
IKSIL	140	63%
IKIVV	713	65%

7.2 Generación de proteínas recombinantes en vector de expresión amibiano pExEhNeo y de inducción pGEX2TK

Después de realizar el análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de EhCortexilina, se procedió a generar las herramientas para llevar a cabo los objetivos restantes. Como se mencionó en el apartado anterior, el gen de 2,376 pb que codifica para la proteína cuenta con dos regiones intrónicas, lo cual nos dificultó amplificar el gen en su totalidad. Es por ello que se decidió trabajar con la región carboxilo terminal que abarca del nucleótido 1066 al 2376, en la cual se encuentra el dominio *coiled-coil* y el probable GBD-FH3. Se realizó la subclonación en dos vectores para fines diferentes; en un vector de expresión amibiano pExEhNeo (Nickel y Tannich, 1994) y uno que posee la bandera GST, además de un sitio fosforilable por cinasas (*cAMP-dependent protein kinase*) el cual nos permitió realizar un marcaje radiactivo de la proteína fusión. Para realizar las construcciones anteriores, una parte del gen de EhCortexilina fue inicialmente clonada en el vector PCR2.1.

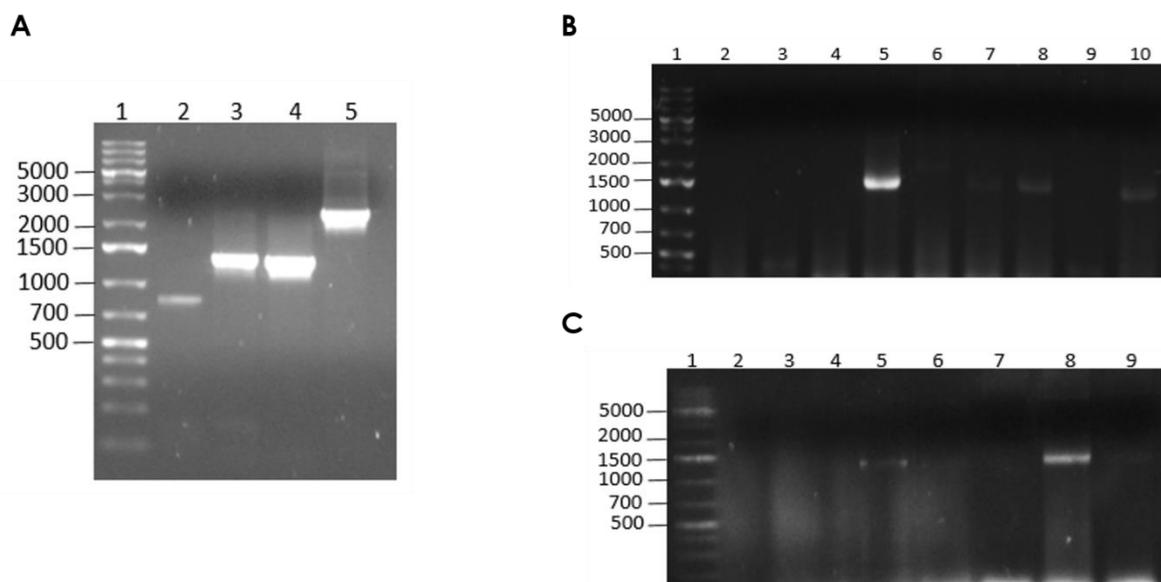


Figura 14. Amplificación por PCR de la región carboxilo terminal de EhCortexilina I (A) y Análisis de PCR de las colonias de EhCTXI Δ (1-316) en PCR2.1 con sitios KpnI/BamHI (B) y para subclonación en vector pGEX-2TK (C). A) El carril 2 muestra la amplificación de la región N-terminal del gen, de aproximadamente 780 pb. En el carril 3 se observa el fragmento de 1113pb correspondiente a los primers con sitios KpnI/BamHI, el carril 4 con oligonucleótidos para subclonación en pGEX-2TK y el carril 5 EhCortexilina a partir de gDNA de 2360pb. B) En los carriles 2-10 se observan las colonias analizadas por PCR para subclonación en pExEhNeo. C) En los carriles 2-10 se observan las colonias analizadas por PCR para subclonación en pGEX-2TK. Marcador de peso molecular Invitrogen 1kb. Geles de agarosa al 0.8%.

Para ello se amplificó por medio de PCR la región C-terminal del gen usando DNA genómico de *E. histolytica* con los oligonucleótidos 5'C-end-CTXI y 3'C-end-CTXI-HSV los cuales contienen los sitios de restricción para las enzimas KpnI y BamHI y por otro lado con los oligonucleótidos 5'C-end-CTXI-2TK y 3'C-end-CTXI-2TK con los sitios de corte EcoRI y BamHI (Figura 14), obteniéndose un fragmento con el tamaño esperado de aproximadamente 1,113 pb (Figura 14A).

Estas regiones obtenidas con las diferentes combinaciones de cebadores, se ligaron al vector PCR2.1 respectivamente, el producto de las ligaciones se utilizó para la transformación de células competentes de *E. coli*.

Se analizaron las colonias bacterianas por medio de PCR de colonia, encontrando que varias de ellas cuentan con el inserto del tamaño esperado en ambos casos (Figura 14 B; C). Se seleccionaron colonias positivas, de las cuales se realizó una extracción de DNA plasmídico para efectuar un análisis de restricción con las enzimas específicas para ambos casos: KpnI/BamHI y EcoRI/BamHI. Dicho análisis nos indicó la presencia del fragmento del tamaño esperado de 1113 pb en cada una de las clonas (Figura 15A).

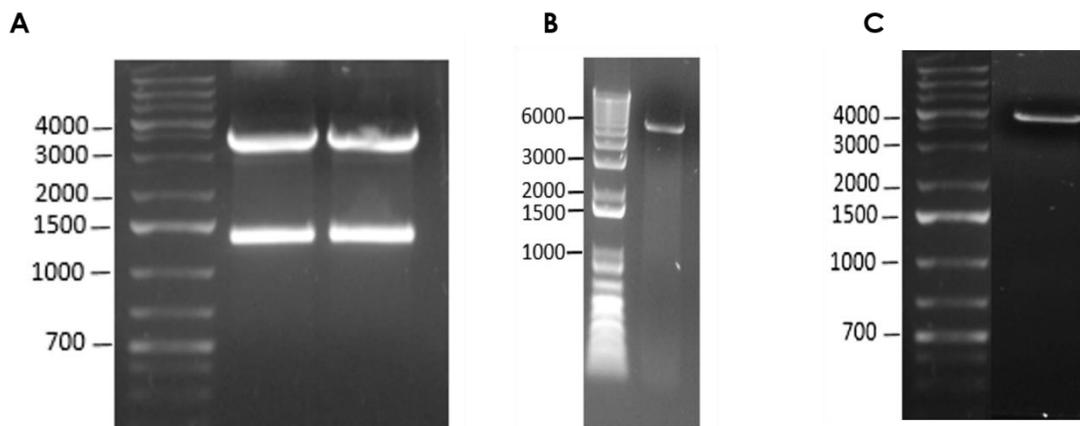


Figura 15. Análisis de restricción de colonias positivas en el vector PCR2.1 (A). Digestión del vector pExEhNeo (B) y pGEX-2TK (C) para subclonaciones. A) En el carril 2 se observa la liberación del fragmento esperado de 1113pb producto de la digestión con las enzimas KpnI/BamHI; en el carril 13 el mismo fragmento pero liberado con las enzimas EcoRI/BamHI. B) Digestión del vector amibiano pExEhNeo de aproximadamente 6000pb con enzimas KpnI/BamHI. C) Análisis de restricción del vector pGEX-2TK con enzimas EcoRI/BamHI de 4000pb aproximadamente. Marcador de peso molecular Invitrogen 1kb. Geles de agarosa al 0.8%.

Los vectores PCR2.1 con la región carboxilo terminal clonada con los sitios específicos, fueron después digeridos con las endonucleasas KpnI/BamHI y EcoRI/BamHI para liberar y purificar los insertos de EhCTX1Δ (1-316) (Figura 15A). Asimismo, los vectores finales pExEhNeo y pGEX-2TK fueron digeridos con las enzimas correspondientes y ambos fueron purificados (Figura 15B y 15C). Inserto y vector se ligaron, y con la mezcla de ligación se transformaron células DH5-α, obteniéndose varias colonia que se analizaron mediante PCR de colonia (figura 16A y 16B); se seleccionaron dos colonias positivas para cada vector y resembró en medio líquido para la extracción de DNA plasmídico. Se realizó una digestión con las enzimas usadas para su respectiva clonación; de esta manera corroboramos que el inserto se hubiera clonado correctamente. Se observaron las dos bandas esperadas una más grande correspondiente al cuerpo del vector y otra correspondiente al fragmento de 1113 pb (Figura 16C). Para corroborar la incorporación correcta del inserto en el vector fue enviado a secuenciar el plásmido.

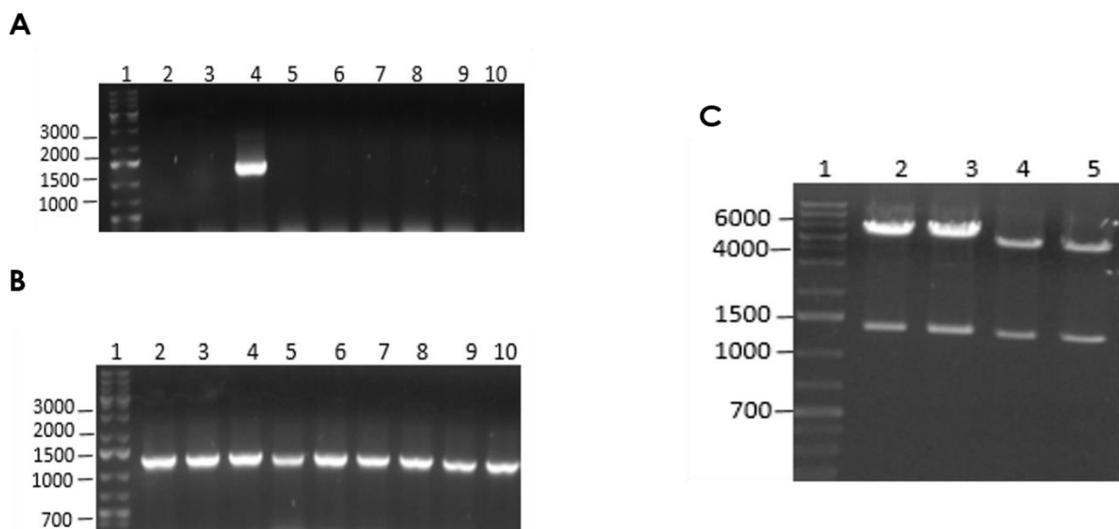


Figura 16. PCR de colonia (Ay B) y análisis de restricción en vectores finales de clonación (C). A) PCR de colonia de la construcción pExEhNeo/CTX1Δ (1-316); carriles 2-9 colonias analizadas. B) PCR de colonia de la construcción GST/CTX1Δ (1-316); carriles 2-9 colonias analizadas. C) Análisis de restricción de colonias positivas obtenidas; carriles 2 y 3 correspondientes a la construcción pExEhNeo/CTX1Δ (1-316), se observa el inserto del tamaño esperado de 1113pb; carriles 4 y 5 GST/CTX1Δ (1-316) con enzimas EcoRI/BamHI para la liberación del inserto del tamaño esperado de 1113pb. Marcador de peso molecular Invitrogen 1kb. Geles de agarosa al 0.8%.

7.3 Transfección y análisis de proteína recombinante pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV

El plásmido pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV se usó para transfectar trofozoitos de la cepa HMI: IMSS de *E. histolytica*, en fase media de crecimiento logarítmico, mediante electroporación. Los cultivos transfectados fueron seleccionados con G418 un análogo de Neomicina, obteniéndose una población estable después de aproximadamente 3 semanas. Se fue aumentando la dosis gradualmente hasta que la población celular no se viera afectada tanto en morfología como en crecimiento, alcanzando así una concentración de 25 μg ; esto con la finalidad de tener células transfectadas con la mayor cantidad de plásmidos episomales. Sin embargo, antes de ello se obtuvieron proteínas totales liofilizadas de células seleccionadas a 10 y 15 μgml^{-1} para poder identificar la presencia de la proteína recombinante pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV. Se realizó un SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie para evaluar la integridad de las proteínas totales (Figura 17A).

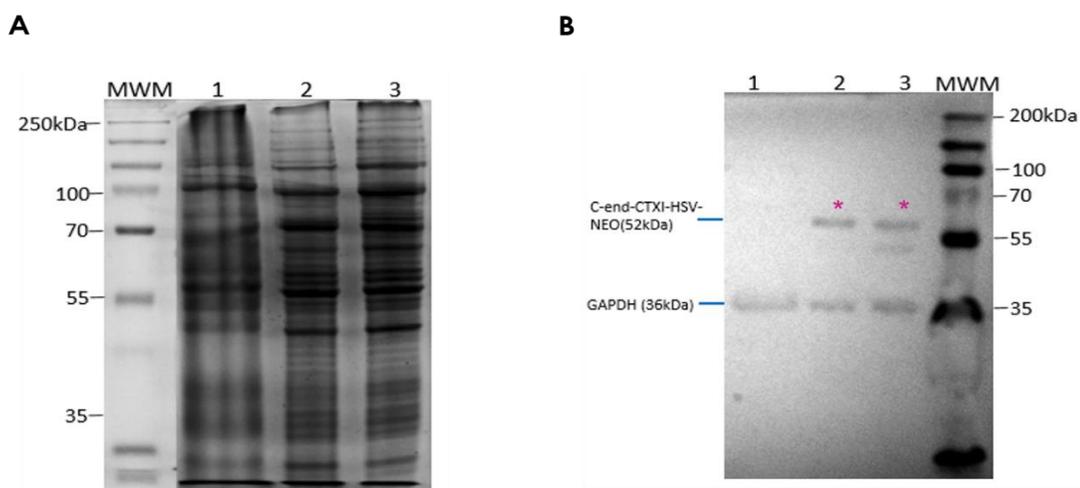


Figura 17. Proteínas totales obtenidas de transfectantes pExEhNeo/CTXI Δ (1-316) (A) y detección de proteína recombinante en células transfectadas (B). A) Carril 1 corresponde a los lisados de células silvestres de cepa HMI: IMSS, carril 2 y 3, proteínas totales obtenidas de parásitos seleccionados a 10 y 15 $\mu\text{g/ml}$. Gel de poliacrilamida al 12%. B) Ensayo Western blot para detección de proteína recombinante con anticuerpo anti-HSV y anti-HRP. Carriles 2 y 3 correspondientes a transfectantes seleccionadas a 10 y 15 $\mu\text{g/ml}$.

Posteriormente se realizó un ensayo tipo western blot utilizando el anticuerpo anti-HSV, el cual reconoce la región correspondiente a la bandera del *Herpes virus* que se adicionó con ayuda de los oligonucleótidos específicos para la clonación en dicho vector, de esta manera podemos detectar a la proteína fusión de EhCortexilina I (317-753).

La inmunodetección del epítotope HSV reveló que la población celular expresa una proteína recombinante de aproximadamente 52 kDa, la cual es acorde con lo esperado, sin embargo adicionalmente identificamos la presencia de otra banda en un peso de aproximadamente 60kDa, lo cual indicaría que esta región puede estar siendo modificada postraduccionalmente por fosforilaciones o sumoilaciones como se identificó en resultados *in silico* (Figura 17B), esto utilizando como control de carga a la molécula GAPDH presente en todos los organismos eucariontes de 36kDa.

7.4 Identificación de complejos proteicos asociados a pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV

Como se identificó en los análisis *in silico*, la proteína EhCortexilina posee un dominio probable GBD-FH3 el cual sirve para la interacción con proteínas de la familia de Rho GTPasas, además aún no se conocen los complejos proteicos que podrían estarse asociando con ésta región, es por ello que se realizó una inmunoprecipitación de la proteína recombinante pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV. Utilizando perlas magnéticas acopladas al anticuerpo α -HSV se confrontaron extractos proteicos totales de células transfectadas con la construcción y con células silvestres de la cepa HMI: IMSS. Las fracciones recuperadas de la inmunoprecipitación, así como las fracciones solubles obtenidas se analizaron en geles SDS-PAGE al 12%, teñido con azul de coomassie.

Después se realizó un ensayo de western blot, al revelar con el anticuerpo específico anti-HSV acoplado con el conjugado HRP en conejo se detectó la presencia de la proteína recombinante del peso esperado de 52 kDa, tanto en la fracción inmunoprecipitada como en la fracción soluble; este evento no se observa en las fracciones correspondientes a la cepa silvestre, ni en las fracciones correspondientes al uso de suero preinmune acoplado a perlas magnéticas (Figura 18), en el que sólo detectamos la presencia de la proteína en la fracción soluble. Con esto podemos concluir que se logró inmunoprecipitar a la proteína unida a otros complejos proteicos, lo cual es suficiente para mandar a su análisis por espectrometría de masas.

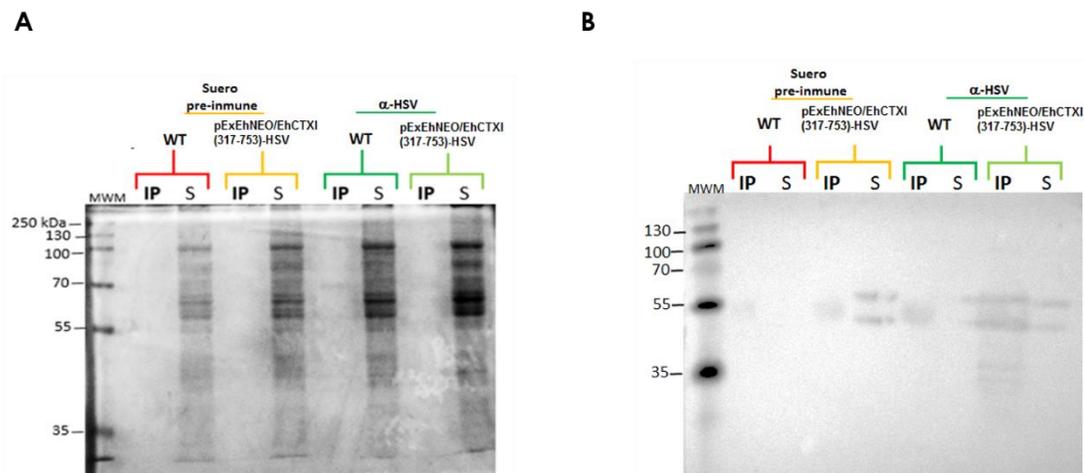


Figura 18. Inmunoprecipitación de la región pExEhNeo/CTXI Δ (1-316) (A) Gel de poliacrilamida al 12% con fracciones inmunoprecipitadas y sobrenadantes de células silvestres y transfectantes con suero preinmune y anti-HSV (B) Western-blot de las fracciones inmunoprecipitadas y sobrenadantes para identificación de proteína recombinante.

7.5 Análisis de la función de la proteína pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV en ensayos celulares

7.5.1 Cinética de proliferación.

Para conocer si la sobreexpresión de la región carboxilo de la proteína EhCortexilina I afecta el crecimiento del parásito, se realizaron curvas de proliferación con cepas transfectadas con el vector pExEhNeo y con la construcción pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV durante siete días.

Como se observa en la figura 19 no hay diferencias significativas en el crecimiento de ambas cepas, es decir, la sobreexpresión de esta región no entorpece el crecimiento de los parásitos en comparación del vector amibiano transfectado. Si analizamos con detenimiento la gráfica, podemos observar que los primeros cuatro días, las células transfectadas con la construcción pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV se ven disminuidas ($< 1 \times 10^6$) a comparación de la cepa control, sin embargo después de este tiempo el número celular aumenta incluso un poco más que la cepa control, alcanzando una densidad celular de aproximadamente 1.5×10^6 , para disminuir en el último día del conteo; lo cual refleja que la población transfectada crece más lento a comparación de la cepa transfectada con el vector pExEhNeo.

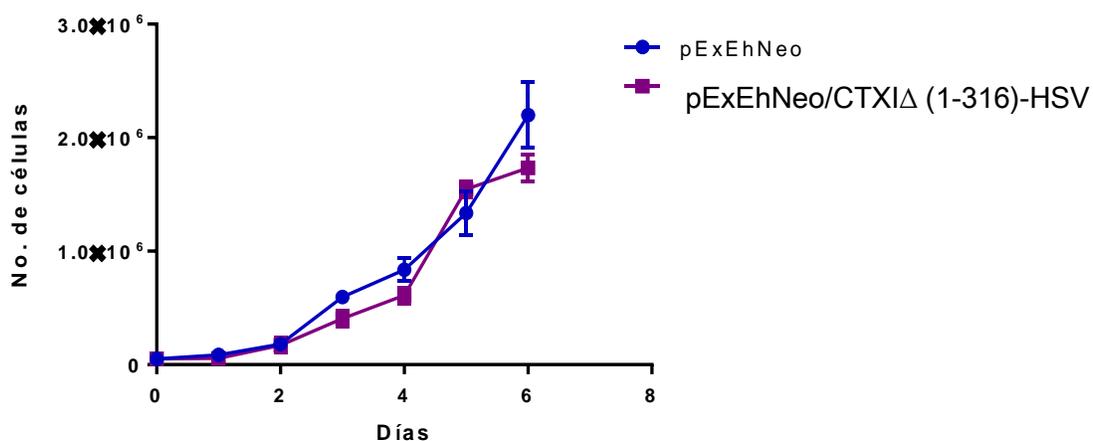


Figura 19. Cinética de proliferación de transfectantes pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV

7.5.2 Migración de células transfectantes pExEhNeo/CTXI (317-753)-HSV

La proteína EhCortexilina I es una ABP que se interactúa con los filamentos de actina para la formación de diferentes estructuras celulares que le permiten a la célula llevar a cabo sus funciones. En el caso de *E. histolytica* la migración es un proceso vital para llevarse a cabo la invasión de tejidos en el hospedero, es por ello que decidimos evaluar si la sobreexpresión de esta región modifica el proceso de migración en los parásitos.

Por medio de una cámara *Transwell* colocamos células transfectadas con la construcción de EhCortexilina (317-753) y con el vector en ayuno en la cámara superior, mientras que en la parte inferior colocamos medio TYI-S-33 suplementado con medio como factor quimioatrayente; este proceso se realizó durante tres horas. Pasado este tiempo, evaluamos las células que habían logrado pasar de la cámara superior a la inferior, encontrando que las células transfectadas con el vector tienen una capacidad de migración inferior en un 50% en comparación con la cepa control (Figura 20); lo cual revela que la sobreexpresión de esta región entorpece el proceso de quimiotaxis.

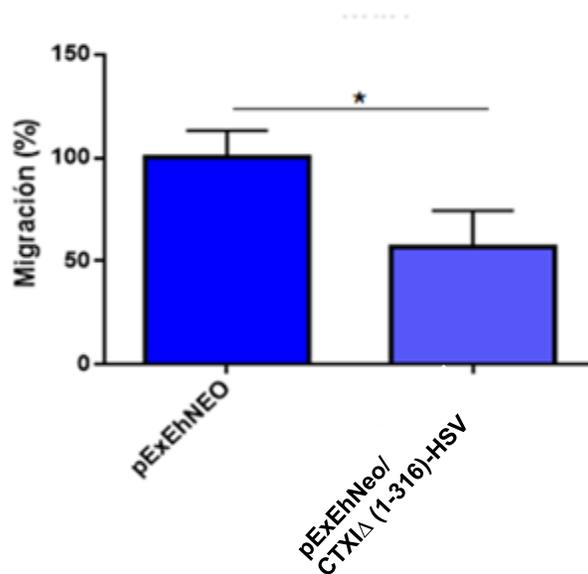


Figura 20. Porcentaje de migración de células transfectadas pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV

7.5.3 Capacidad citopática de transfectantes pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV

El parásito *E. histolytica* como se comentó anteriormente, posee diversos mecanismos que le permiten destruir e invadir tejidos en el hospedero mamífero. Como parte de esto, decidimos evaluar si la sobreexpresión de pExEhNeo/CTXI (317-753)-HSV participa en la capacidad citopática de estas transfectantes. Se pusieron a interactuar ambas cepas, tanto la control como la experimental con una monocapa de células epiteliales de riñón de perro MDCK (Orozco y col; 1986) durante 1h 30 min, esto para comparar la capacidad de destrucción entre ellas.

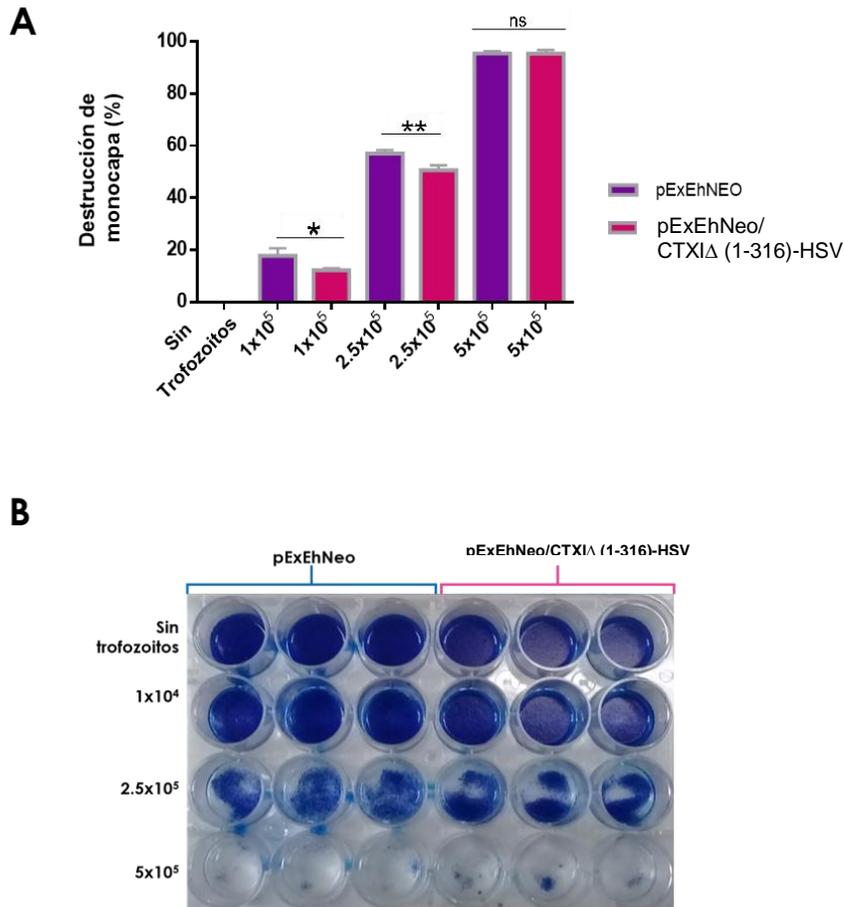


Figura 21. Porcentaje de destrucción de monocapa (A). Células MDCK sembradas en placa de 24 pozos y evaluadas durante el efecto citopático de pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV (B). Tinción con azul de metileno al 1%.

Después de este tiempo, se extrajo el colorante (azul de metileno) de las células remanentes y se midió su absorbancia, tomando como 0% de destrucción la monocapa integra. Encontramos que las células transfectadas con la construcción pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV destruyeron casi la totalidad de la monocapa en una concentración de 5×10^4 (figura 21B), analizando mediante el uso de ANOVA, encontramos que no hay diferencias significativas entre ambas cepas. Sin embargo a una concentración de 2.5×10^4 y 1×10^4 , la cepa control tuvo leve incremento en el porcentaje de destrucción que la control, indicando que ambas cepas tienen la misma capacidad citopatogénica (Figura 21 A).

7.5.4 Adhesión de transfectantes pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV

Por último, para que el parásito pueda realizar el proceso de invasión de tejidos, es de suma importancia que logre adherirse a las células del hospedero mediante moléculas de superficie como lectinas. Es por ello que decidimos analizar el efecto de la sobreexpresión de la región carboxilo terminal de EhCortexilina I en el proceso de adhesión a una monocapa de células epiteliales.

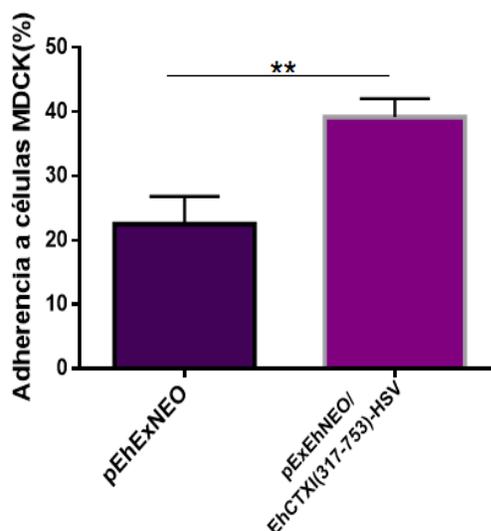


Figura 22. Porcentaje de células transfectantes adheridas a monocapa MDCK

Dejamos interactuar ambas cepas, la control pExEhNeo y la experimental con la monocapa de MDCK durante 20 min, se cuantificaron en cámara de Neubauer los trofozoitos no adheridos y evaluamos el porcentaje de células adheridas, encontrando que las transfectantes con la región CTXI (317-753) se adhieren más, en un 20% en comparación con la cepa control. Esto es interesante ya que este resultado nos muestra que al menos estas células poseen una mayor capacidad de adhesión al sobreexpresar esta región de la proteína (Figura 22).

7.5 Localización celular de pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV

Para determinar la localización celular de la región que comprende a la proteína EhCortexilina (317-753), se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta en diferentes condiciones: sin estímulo (en medio TYI-S-33), con fibronectina, en presencia de eritrocitos y con la lectina Concavalina A. Se utilizó el anticuerpo específico anti-HSV para detectar la proteína fusión en transfectantes con la construcción y con la cepa que contiene el vector pExEhNeo; adicionalmente se tiñeron los filamentos de actina con el uso de faloidina rodaminada, con la finalidad de detectar colocalización entre ambas moléculas.

Al observar las células sin estímulo, se logró detectar la presencia de la proteína recombinante de color verde, a lo largo del citosol (Figura 23). Para el caso de células estimuladas con fibronectina, se distinguieron diversas estructuras celulares como “dots” de actina, placas de adhesión y fibras de estrés (Figura 23); sin embargo no se logró detectar colocalización entre la actina celular y la proteína recombinante. Al estimular con eritrocitos, la proteína recombinante se localizó en el citosol de la célula, aunque también se puede ver un enriquecimiento de la señal de la misma en vesículas fagocíticas; aunque no se ve colocalización con los filamentos de actina teñidos con rodamina, los cuales se ven enriquecidos en la formación de copas fagocíticas en la parte posterior de la célula (Figura 23).

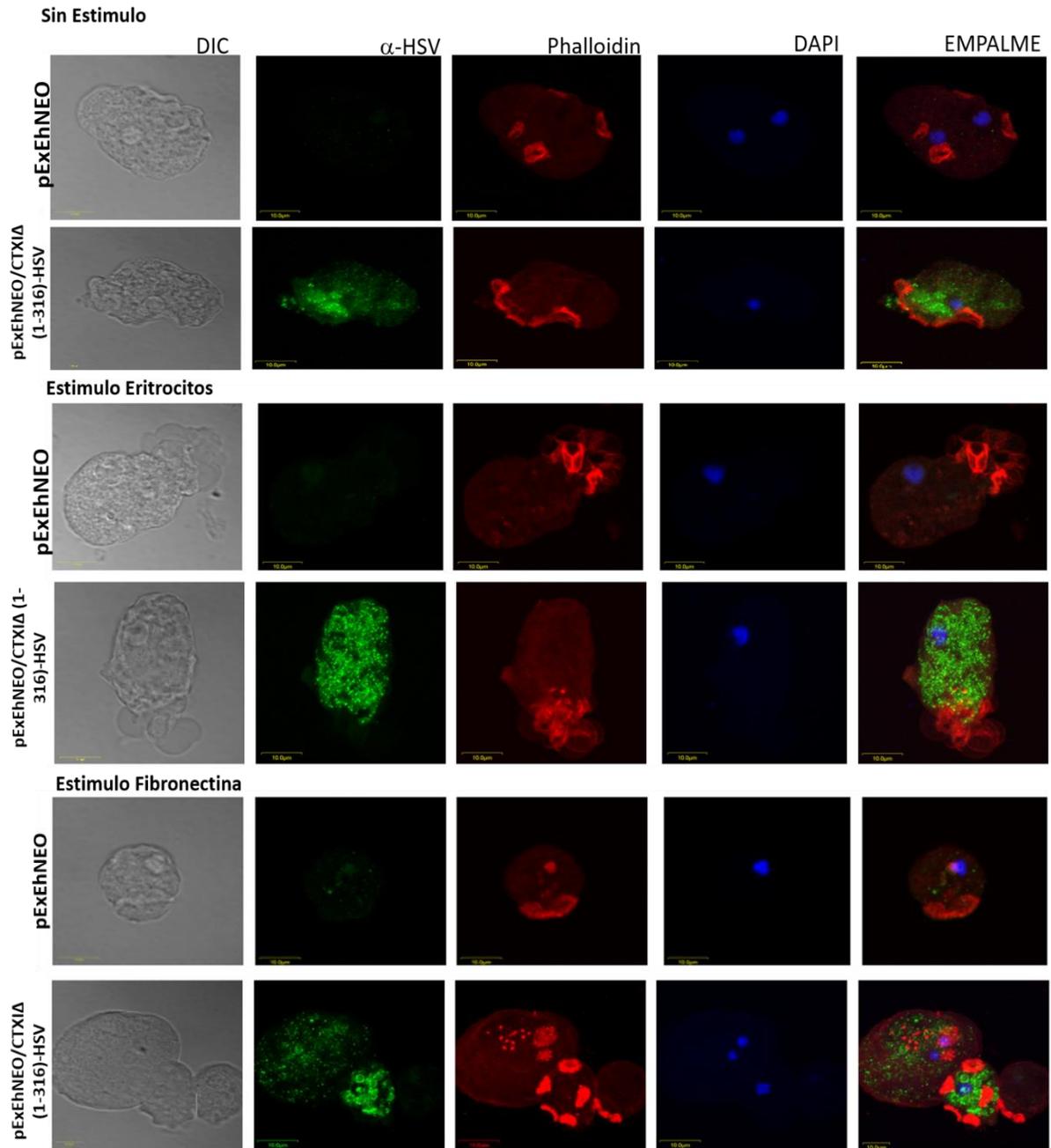


Figura 23. Localización celular de la proteína pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV en diferentes condiciones. De verde se localiza a la proteína fusión teñida con anti-HSV acoplado con FITC; de rojo los filamentos de actina teñidos con faloidina rodaminada, núcleos con DAPI.

Por último, para ver si la proteína recombinante generada se localizaba en la formación de la estructura celular conocida como “uroide” en el proceso de formación del cap, utilizamos la lectina Concavalina A la cual permite el desarrollo de este evento en la célula (figura 24). De color azul, podemos observar el uroide celular e interesantemente, logramos identificar la colocalización con la proteína recombinante pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV, cabe destacar que en ciertos puntos, colocaliza con la actina focalizada en esa región (figura 24).

Esto sugiere que esta región de la proteína recombinante se localiza en el uroide celular, tal como lo sugerido por Carpentieri y colaboradores en el 2010; y en cuerpos vesiculares (Marion y col; 2005).

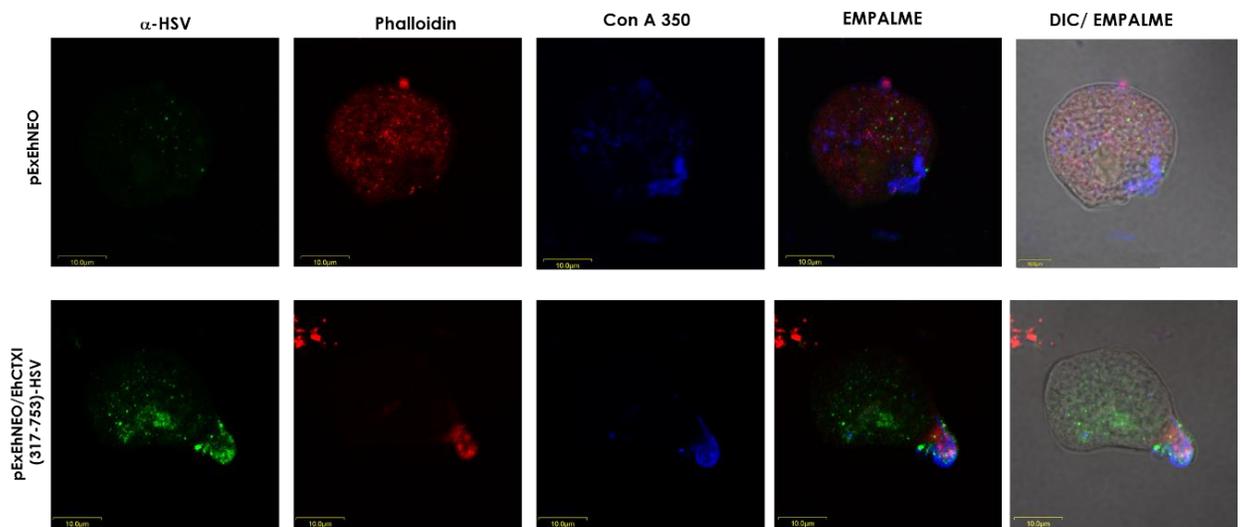


Figura 24. Localización de pExEhNeo/CTXIΔ (1-316)-HSV en la formación de uroide celular. Se observa de color verde (FITC) a la proteína recombinante de EhCortexilina I; de color rojo se encuentran los filamentos de actina teñidos con Rodamina; el uroide celular se localiza de color azul teñido con Con A 350 y por último, se encuentran los empalmes de las imágenes con el campo claro de la célula.

7.6 Interacción de la proteína recombinante GST/CTXIΔ (1-316) con fosfoinosítidos

En el análisis *in silico*, se identificó una región en el extremo carboxilo terminal, que se presume puede interactuar con fosfolípidos, de la manera en que lo hace la proteína Cortexilina I en el organismo *D. discoideum*. Para corroborar esto, se realizó la construcción utilizando un vector inducible el cual tiene la bandera GST y adicionalmente una región fosforilable por una proteína cinasa (cAMP); de esta manera logramos marcar a la proteína recombinante generada (GST/CTXIΔ (1-316) y a la proteína control GST. Las proteínas marcadas (figura 25A) con [γ - 32 P] ATP, se pusieron a interactuar con membranas las cuales tienen fosfoinosítidos marcados durante 16 horas. Al revelar las placas radiográficas encontramos que la región EhCortexilina I (317-753) interactúa mayormente con fosfatidilinositol-3-P y en menor proporción con fosfatidilinositol-5-P (figura 25B), cosa que no logramos identificar con la proteína control GST (figura 25C). Estos datos sugieren fuertemente que esta región es capaz de interactuar con fosfoinosítidos, tal como lo realiza la proteína descrita en *D. discoideum*.

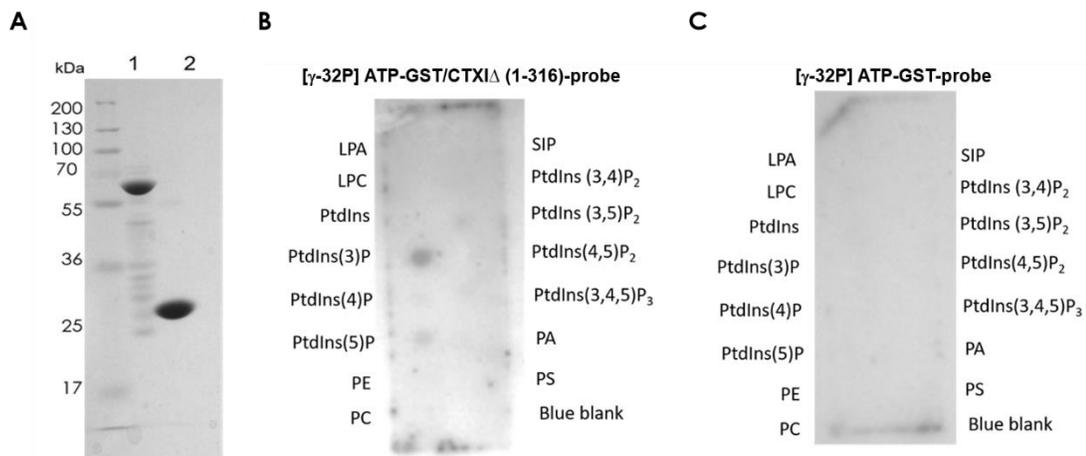


Figura 25. La proteína fusión GST/CTXIΔ (1-316). A) Proteínas recombinantes marcadas radiactivamente con [γ - 32 P] ATP. En el carril 1, se localiza la proteína fusión correspondiente a la construcción GST/CTXIΔ (1-316). En el carril 2 se observa la proteína GST marcada radiactivamente. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. B) Placa radiográfica obtenida de la interacción con la proteína marcada EhCortexilina (317-753) con membrana precargada con fosfolípidos C) Placa radiográfica obtenida de la interacción con la proteína marcada GST con fosfolípidos precargados.

7.7 Interacción de la proteína recombinante GST/CTXIΔ (1-316) con RhoGTPasas.

Como se mencionó anteriormente, la región carboxilo terminal de EhCortexilina I posee un dominio probable GBD-FH3, el cual le sirve a otras proteínas como las forminas para interactuar con proteínas RhoGTPasas unidas a GTP para realizar sus funciones en la célula. Es por eso que para determinar si la región EhCortexilina I (317-753) interactúa con proteínas de la familia RhoGTPasas, se realizaron las inducciones de proteínas disponibles en el laboratorio (Gonzales de la Rosa, 2006) como EhRho1, EhRas1, EhCdc42, EhRacA, EhRacB, EhRacC, EhRacD, EhRacG, EhActina, GST/CTXIΔ (1-316) y como control GST, tal como se describió en la sección 6.19 de *Estrategia experimental*.

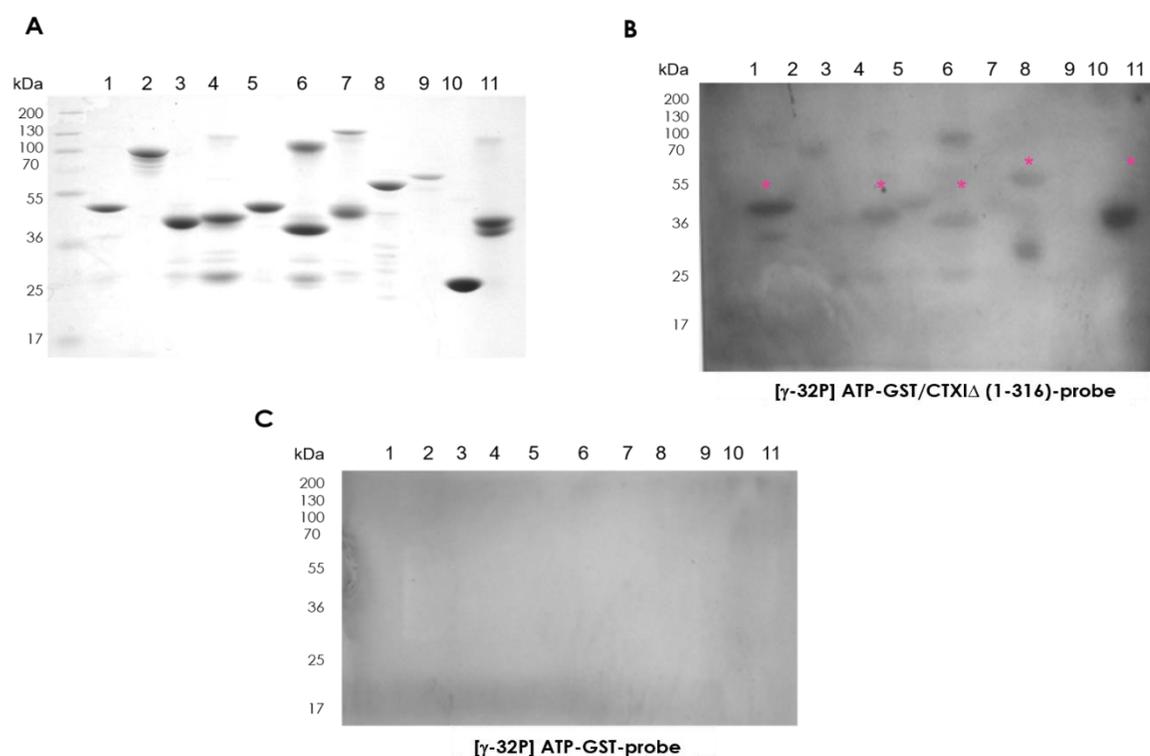


Figura 26. La proteína recombinante GST/CTXIΔ (1-316) interactúa con GTPasas de la familia Rho. A) Inducción y purificación de GTPasas. Carril 1 EhRho1-GST(53kDa), carril 2 EhCdc42 (69kDa), carril 3 EhRas1-GST(51.5kDa), carril 4 EhRacA-GST(50.5kDa), carril 5 EhRacB-GST(50kDa), carril 6 EhRacC-GST(50kDa), carril 7 EhRacD-GST(53kDa), carril 8 GST/CTXIΔ (1-316), carril 9 EhActina (65kDa), carril 10 GST (29kDa) y carril 11 EhRacG-GST(51kDa). Gel de poliacrilamida 12% teñido con azul de Coomassie. B) Placa radiográfica obtenida de la interacción de membrana con GTPasas transferidas con proteína marcada GST/CTXIΔ (1-316). C) Placa radiográfica obtenida de la interacción de membrana con GTPasas transferidas con proteína marcada GST. Los asteriscos indican la presencia de señal positiva.

Estas proteínas se purificaron y se corrieron en un gel de acrilamida al 12% (figura 26A) el cual se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se puso a interactuar con las proteínas marcadas radiactivamente (figura 26A).

Las placas radiográficas muestran que la proteína fusión GST/CTXI Δ (1-316) interactúa con varias proteínas amibianas de la familia Rho1, RacA, RacC, RacG y además consigo misma, es decir, forma dímeros como lo descrito en *D. discoideum* para Cortexilina I (Faix, 2002). Sin embargo, no se distingue una señal positiva en el caso de EhActina, como era esperado, ya que esta región carece de los dominios CH, que le sirven a la proteína para unirse a los filamentos de actina y ni con GST, que es nuestro control negativo (figura 26C). Este resultado es sumamente relevante ya que quiere decir que esta región interactúa con ciertas GTPasas de la familia Rho e indica la presencia de un dominio del tipo GBD-FH3.

8. DISCUSIÓN

Diversos grupos de investigación han reconocido la participación de la proteína EhCortexilina I en diferentes procesos relacionados con la patogénesis del parásito; el más importante sin duda, es el trabajo de MacFarland y Singh en el 2006, en el cual encuentran que el gen que codifica para esta proteína está sobre expresado en la cepa patógena de *E. histolytica*. Dicha investigación sentó las bases para este trabajo y que además, fue complementado con otros análisis efectuados por otros grupos de investigación; en los cuales encuentran probables funciones de la proteína en procesos como la formación de cap (Carpentieri y col; 2010) y en fagocitosis (Marion y col; 2005) siendo así esenciales para el conocimiento del funcionamiento de EhCortexilina I. El objetivo primordial de este trabajo fue el de evaluar la participación de esta proteína en la patogénesis del parásito, lo cual se sugiere por los antecedentes ya mencionados; sin embargo, hay que contemplar que también se identificó la probable participación de EhCortexilina II (EHI_103430) como una proteína del citoesqueleto importante para la virulencia del parásito; esto se determinó por medio del análisis del transcriptoma (RNAseq) de parásitos aislados del hígado de hámsters, los cuales previamente fueron infectados con la cepa virulenta HM1: IMSS de *E. histolytica* (Weber y col; 2016). A pesar de que no es la proteína que estamos en proceso de caracterización, éste antecedente demuestra la relevancia del estudio de proteínas como las Cortexilinas y que, como nuestros resultados sugieren, pueden contribuir con la virulencia del parásito gracias a su multifuncionalidad en *E. histolytica* en diferentes procesos celulares.

Anterior a este trabajo, se desconocía el papel probable de esta proteína, la cual tiene un antecedente bien documentado en el organismo *D. discoideum*. Las funciones de la proteína Cortexilina I conocidas en este organismo se remiten a: localización en el surco de segmentación para la realización del proceso de citocinesis (Weber y col; 1999), mantenimiento del tamaño y morfología celular (Faix y col; 1996) y por ende, participar en el proceso de mecanotransducción (Srivastava y Robinson, 2015); las cuales en

su mayoría son requeridas para la supervivencia de células del organismo y tiene que ver con su interacción con los filamentos de actina. A pesar de contar con un antecedente directo funcional de esta proteína y de que ambos organismos están clasificados en el mismo *phylum*, cada uno cuenta con características propias que le permiten diverger en cuanto a funcionalidad dentro de las proteínas de la misma familia (Song y col; 2005).

La secuenciación del genoma de *E. histolytica* fue un paso importante para la comprensión de la biología de este organismo y su reciente revisión ayudó a refinar sus características genómicas. El tamaño del genoma predicho es de aproximadamente 20Mbp, de los cuales 8,200 son genes que codifican para proteínas con un tamaño de 1260pb; se distinguen por la riqueza de A-T (aproximadamente el 75%) (Weedall y Hall, 2010); y existe un bajo contenido de intrones (aproximadamente el 24% de genes contienen intrones, de los cuales solo un 6% contienen más de dos regiones intrónicas) (Pearson y Singh, 2010). Esto es relevante ya que el gen de EhCortexilina pertenece esta cuarta parte del genoma, con dos regiones intrónicas dentro de su conformación, las cuales tienen una organización diferente a lo reportado para otros organismos. Los intrones del parásito cuentan con un alto contenido de A-T comparado con las secuencias exónicas, además tienen un tamaño de aproximadamente entre 46-115nt. Tienen un sitio donador de splicing consenso "GTTTGTT" y un sitio aceptor "TAG", sin embargo no hay una región de "ramificación" consenso, lo cual hace que este tipo de intrones sea diferente a otros eucariontes superiores, en los que el "branch site" se encuentra bien definido (Willhoeft y col; 2001). Todos estos elementos son conservados en los intrones que posee el gen de EhCortexilina I, colocándolos en la Clase I, la cual es la clasificación más larga de intrones identificados. Estos se localizan en genes anotados pero en regiones inmediatamente proximales a un marco abierto de lectura (*Open Reading Frame ORF*) y su correcta remoción es necesaria para la expresión adecuada de este gen (Davis y col; 2007).

Esto es interesante ya que algunos estudios han mostrado que los intrones han sido propagados durante la evolución del linaje eucarionte y estos pueden dar algunas ventajas funcionando como amortiguador a eventos mutagénicos que ocurren en genomas eucariontes, protegiendo secuencias codificantes de ser afectadas por mutaciones deletéreas que ocurren al azar; sin embargo, en *E. histolytica* así como en otros parásitos aún no se encuentra muy claro como este efecto podría generar ventajas evolutivas a pesar del gran gasto energético que requiere el eliminar dichas regiones de genes codificantes (Jo y Choi, 2015). Se ha propuesto que probablemente estas regiones estarían siendo parte de la regulación de los genes del parásito a nivel transcripcional (Wang y Burge, 2008; Pearson y Singh, 2010).

A pesar del gran progreso con la identificación de varios genes y proteínas relacionadas con las funciones del citoesqueleto de actina en *E. histolytica*, aún existen carencias en el conocimiento acerca de estructuras proteicas, interacciones y mecanismos de regulación (Meza y col; 2006). En el presente trabajo se inició la caracterización molecular, celular y bioquímica de la proteína EhCortexilina I, una nueva ABP de *E. histolytica*. El análisis *in silico* de esta proteína nos permitió detectar la presencia de nuevos dominios no detectados anteriormente en la familia que constituye a las proteínas Cortexilinas, ya que logramos detectar la presencia de un dominio hipotético GBD-FH3 (dominio que se encuentra presente en la familia de las ABP's pertenecientes a la familia de las forminas) el cual no se había identificado en la proteína Cortexilina I de *D. discoideum*; esto nos sugiere que la proteína que estudiamos en el presente trabajo podría participar en la dinámica del citoesqueleto de actina en *E. histolytica* de manera diferente a lo reportado para sus proteínas hermanas en otros sistemas celulares, así como con las proteínas de *E. histolytica* EhCortexilina (EHI_103430) y EhCortexilina II (EHI_104560) las cuales carecen de la región carboxilo terminal donde recae el dominio hipotético GBD-FH3 presente en Cortexilina I de *E. histolytica*. Esto indica que probablemente EhCortexilina I podría participar y ser regulada de una manera similar a las forminas. Además de la identificación de la presencia del dominio GBD-FH3 en Cortexilina I de *E. histolytica*, ésta proteína presenta

un dominio de homología a calponina CH1-CH2 (un dominio de unión a los filamentos de actina o F-actina) conformados por los aminoácidos presentes en los sitios 20 a 223 en la región amino-terminal (Faix, 2002); así como regiones del tipo *coiled-coil* las cuales presuntamente le sirven a las proteínas para su dimerización con sus proteínas hermanas como Cortexilina II (Weber y col; 1999).

Sin embargo al obtener los porcentajes de identidad entre ambas la Cortexilina de *E. histolytica* y la de *D. discoideum* son de bajo score de similitud, lo cual correlaciona con la idea de que estas proteínas pudieran diferir en las funciones que llevan a cabo.

Como se indicó anteriormente en la proteína EhCortexilina I, fuimos capaces de identificar la presencia del dominio hipotético GBD-FH3 que no está presente en ninguna otra proteína que forma parte de la familia de Cortexilinas, considerando a las presentes en *E. histolytica* y *D. discoideum*; tal como se visualizó en el multialineamiento entre todas las proteínas encontradas en el parásito. Lo anterior nos llevó a pensar que, aunque logramos determinar diferencias importantes entre otras proteínas de la misma familia en la misma especie y en la que creíamos proteína "ortóloga" en *D. discoideum*, probablemente entre organismos del mismo género *Entamoeba*, se mantuvieran dichas características tan singulares; a pesar de considerar organismos tanto patógenos como no patógenos. Interesantemente no fue así, ya que encontramos que la especie *E. dispar* carece de una región de 214 aa correspondiente a la región *coiled-coil* y parte del dominio putativo GBD-FH3. Esto es relevante ya que estas especies no difieren genómicamente entre sí, sólo en algunos casos en la que existen cambios de algunos residuos peptídicos (Weedall y Hall, 2011); este hallazgo nos vuelve a sugerir que probablemente la funcionalidad de la proteína difiere incluso entre especies y además, la carencia de esta región de regulación apoya la hipótesis de que la proteína EhCortexilina I está involucrada en el proceso de patogénesis de *E. histolytica*. Varios grupos de investigación mencionan que existe un problema para diferenciar entre

especies de *Entamoeba* ya que morfológicamente son muy similares (Clark, 1995), sin embargo otros estudios en cultivos axénicos revelan que las diferencias entre ambas recaen en la forma mayormente elongada de *E. dispar*, con un pseudopodio único y frontal y un uroide más marcado (Espinosa-Cantellano y col; 1998). Estos elementos son regulados por estructuras de los filamentos de actina, en los que probablemente está participando EhCortexilina I, lo cual hace que exista una conformación diferencial entre ambas especies, sin embargo, podría ser comprobado mediante el uso de un modelo heterólogo de la proteína Cortexilina I de *E. histolytica* el cual podría darnos más respuestas respecto a la participación de esta molecular en múltiples funciones celulares relacionadas con los mecanismos patogénicos de este parásito.

Al encontrar diversos dominios compartidos por varias ABP's, se realizaron una serie de análisis *in silico* para determinar si las regiones hipotéticas identificadas guardan similitudes entre las ya reportadas. La presencia de los dominios de homología con Calponina en la proteína nos indica que esta probablemente se une a los filamentos de actina gracias a esta región; al comparar las secuencias de los dominios CH1 y CH2 con otras proteínas que los poseen como α -actinina nos revela cierto grado de conservación en los residuos que los conforman y que al menos la proteína EhCortexilina I posee los sitios de unión con actina (ABS) similares con los reportados (Norwood y col; 2000) con ciertos residuos diferentes entre sí. En diversas estructuras generadas por cristalografía de estos dominios se han identificado una conformación cerrada entre ambas regiones, esto debido a la exposición de los sitios de unión a actina ABS encontrados en ambos CH's (Sevcik y col; 2004). La exposición de estos sitios en los dominios requiere de rearrreglos para la interacción con los filamentos de actina, lo cual habla de la plasticidad de las proteínas que los poseen (Sjöblom y col; 2008). La naturaleza de los residuos necesarios para la unión con los filamentos de actina es hidrofóbica en ambos dominios (Bañuelos y col; 1999), de igual manera encontrados en la proteína EhCortexilina I. Además el modelo tridimensional por homología de ambos dominios mostró una conformación similar a lo encontrado para sitios de la

misma clase en α -actinina y distrofina (Sjcbloem y col; 2008; Singh y Mallela, 2012), esta serie de resultados en conjunto nos llevan a proponer que el dominio ABD presente en la proteína funciona de manera similar.

Diversas proteínas ABP's como α -actinina que poseen un dominio ABD (CH1-CH2) son reguladas mediante modificaciones postraduccionales presentes en diversos aminoácidos. Ejemplo de esto es la fosforilación en Tyr12 del dominio CH1 en α -actinina por cinasas de adhesiones focales FAK, la cual le sirve a la proteína para su activación en procesos como la mecanotransducción facilitado por el reclutamiento de Src para su asociación con FAK (Craig y col; 2007). EhCortexilina tiene un sitio probable de fosforilación muy similar al mencionado anteriormente, en el aminoácido Thr13, encontrado por análisis bioinformático, revelando que probablemente este tipo de modificaciones regulen las funciones de la proteína al igual que otras que poseen dominios similares. Todo esto debe ser corroborado experimentalmente, sin embargo, como se mencionó en secciones anteriores de este trabajo, el gen que codifica para la proteína EhCortexilina cuenta con dos intrones los cuales separan las regiones codificantes del dominio ABD (CH1-CH2), es por ello que se nos dificultó amplificar el gen en su totalidad; sin embargo es parte de nuestras perspectivas evaluar las funciones moleculares, celulares y bioquímicas de esta región. Las características antes descritas son particularmente provenientes del análisis de la región amino terminal; en cuanto a la región carboxilo-terminal que abarca los aminoácidos 317-753, identificamos la región *coiled-coil* hipotética, la cual le sirve a la proteína para dimerizar con Cortexilina II, esto en el caso de *D. discoideum* (Faix, 2002). Dentro de esta región localizamos un péptido hipotético de unión con fosfoinosítidos "MKSIFELEKKEKDEEITKLKSSIEEQ" el cual posee diversos aminoácidos conservados con respecto a lo reportado por Stock y colaboradores en 1999, los cuales en su mayoría con lisinas en las posiciones 7,15 y 17; además de una leucina en la posición 19, los cuales forman parte de un nonapéptido encontrado en la proteína Cortexilina I en *D. discoideum* que le sirve para interactuar con fosfoinosítidos (Janmey y col; 1992).

Esto es posible ya que los puentes de hidrógeno presentes en el residuo de lisina se pueden unir a los fosfatos presentes en los fosfoinosítidos de manera estable (Lemmon, 2003). Esto nos sugirió que probablemente la proteína EhCortexilina I se esté uniendo a fosfoinosítidos, tal como lo realizan otras ABP's, los cual comprobamos mediante ensayos de interacción con el uso de membranas pre-cargadas con diferentes moléculas de fosfolípidos. Encontramos que esta región de la proteína se une a fosfatidilinositol-3-P y en menor proporción a fosfatidilinositol-5-P. Cabe destacar que Cortexilina I en *D. discoideum* es capaz de interactuar con lípidos como fosfatidilinositol 4,5-bifosfato [PI (4,5) P₂] y fosfatidilinositol 3, 4,5-trifosfato [PI (3, 4,5) P₃] los cuales se conoce que regulan la actividad de las ABP's y juegan un papel importante en procesos celulares dependientes de actina como citocinesis, endocitosis, fagocitosis y migración celular. Estos fosfolípidos usualmente promueven la polimerización de actina suprimiendo las actividades de proteínas que inducen el desensamblaje de actina y la activación de proteínas que inducen su ensamblaje (Miki y col; 1996). Sin embargo, estos lípidos difieren a lo encontrado con la proteína amebiana EhCortexilina I, ya que se une preferencialmente a PtdIns (3) P, el cual está restringido por la localización de sus cinasas efectoras, permitiendo la interacción con otras proteínas para ser reclutados selectivamente a compartimientos específicos de la membrana, como endosomas tempranos y otras vesículas endocíticas (Kutateladze, 2006). Proteínas citoplasmáticas reconocen a este fosfoinosítido gracias a la señalización por el dominio FYVE (Burd y Emr, 1998; Gaullier y col; 1998). Un ejemplo de esto es la proteína EEA1 (*early endosome antigen 1*), la cual posee el dominio FYVE que le permite ser reclutada a endosomas tempranos a través de la unión con PtdIns(3)P y la pequeña GTPasa Rab5 para la fusión de endosomas y para el transporte vesicular (Rubino y col; 2000). El panel de interacción proteína lípidos también mostró una leve señal de unión con PtdIns (5) P, el cual es un mediador como respuesta a estrés celular en el núcleo y además, participa en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina mediante proteínas como Rac1 (Viaud y col; 2014), sin embargo se conoce poco acerca de las funciones que realiza.

Además se ha visto que proteínas como α -actinina son reguladas por los fosfoinosítidos localizados en la membrana, inhibiendo su interacción con los filamentos de actina (Corgan y col; 2004). Sin embargo, aún no se han reportado ABP's que puedan unirse a este tipo de fosfolípidos en particular, lo cual es de gran relevancia. Este hallazgo sugiere que probablemente EhCortexilina I podría realizar sus funciones en procesos involucrados con endosomas en la célula mediante la interacción con estos lípidos ó probablemente estaría siendo regulada por su unión con los mismos y reclutada en sitios específicos de la membrana celular para llevar a cabo sus funciones, probablemente con ayuda de la participación de GTPasas de la familia Rho. Esto correlaciona con lo encontrado mediante el ensayo de *overlay* con proteínas de la familia de RhoGTPasas con las cuales interactúa dicha región en la que, como se mencionó anteriormente, se detectó un dominio hipotético GBD-FH3. Este dominio está presente en algunas forminas, las cuales son ABP's y en algunos casos denominadas "*Diaphanous*", las cuales tienen la habilidad de interactuar con RhoGTPasas en su forma activa a través de su dominio GBD que sobrelapa con el dominio FH3 (Waller y Alberts, 2003), y que además está involucrado en la unión con otras proteínas (Evangelista y col; 2003). Mediante análisis bioinformáticos identificamos un porcentaje bajo de identidad del 16% comparando con forminas amibianas, sin embargo es bien conocido que este dominio se encuentra poco conservado en las proteínas que lo poseen (Rivero y col; 2005). En el ensayo de *overlay* con proteínas disponibles en nuestro laboratorio de RhoGTPasas encontramos que esta región interactúa con proteínas como EhRho1, EhRac A, EhRac C y EhRac G. Esto es de suma importancia, ya que en Cortexilina I de *D. discoideum* se requiere de la participación de proteínas "andamio" como DGAP1 que forma parte de la familia de IQGAP, la cual posee un dominio GRD (*RasGAP homology domain*) que le permite interactuar con proteínas como Rac1 para llevar a cabo sus funciones en el proceso de citocinesis (Faix, 2002); cosa que al parecer no posee EhCortexilina I, debido a que nuestros resultados revelan que se une directamente a las proteínas antes mencionadas.

Esto es común en proteínas que poseen el dominio GBD-FH3 como mDia, la cual es capaz de formar complejos con Cdc42 para la formación de filopodios o con Rho1 para la motilidad de endosomas con la participación de la proteína Src y también se ha visto en unión con Rho1 después de ser activada por su efector ROCK para la formación de fibras de estrés; es decir, este dominio sirve para la unión con diferentes proteínas de la familia Rho GTPasas en diferentes contextos celulares (Waller y Alberts, 2003).

EhRho1 es una proteína que se localiza en el citosol, pero esta puede ser transportada hacia las membranas vesiculares al ser activada, además forma parte del complejo con Miosina II para funciones de actinmiosina y contracción celular, así como formación del cap (Franco-Barraza y col; 2006); esto último correlaciona con la presencia de dicha región en inmunofluorescencia indirecta usando como estímulo a la lectina Concanavalina A para formación del uroide, en el que existe una colocalización. Probablemente EhCortexilina I al unirse a EhRho1, EhRac A, EhRac C ó Rac G, las cuales también se ha visto su participación en la formación del cap (Arias-Romero y col; 2007; Hernández-Flores y col; 2016; Guillén y Sansonetti, 1997), mientras interactúa los filamentos de actina, propicia que se formen fibras de estrés y la intersección con otras vías de señalización para la formación del uroide celular. Además podría participar en procesos involucrados con tráfico vesicular, debido a que observamos una acumulación de ésta región proteica de EhCortexilina I en vesículas, donde también se ha observado a la forma activa de EhRho1. Sin embargo, existe la posibilidad de que existan reguladores o moléculas río arriba de este proceso, es por ello que con la inmunoprecipitación del complejo realizada se pretende buscar proteínas intermediarias que podrían participar dentro de la compleja vía de señalización para la formación del uroide con la participación de las proteínas ya descritas.

Es importante señalar que esta serie de análisis bioquímicos con el uso de proteínas recombinantes de la familia de Rho GTPasas se realiza usando a las proteínas en su forma desnaturizada, lo cual querría decir que los sitios de

unión con el dominio hipotético GBD-FH3 se encuentren disponibles para su interacción con las GTPasas, aunque no con uniones tan estables como las tendría con su forma unida a GTP. En el caso de proteínas del tipo DRF (*Diaphanous-related formins*) son autoinhibidas por un estado restringido a través de la unión de la región N- ó C-terminal, esto hace que el dominio central para la polimerización de actina quede inactivo. Después de interactuar con las GTPasas unidas a GTP, el dominio de autoregulación es desplazado del sitio de reconocimiento en la región N-terminal y se vuelve activo para polimerizar los filamentos de actina (Kühn y Geyer, 2014) Probablemente al usar formas activas de las proteínas, exista una preferencia de interacción con el dominio GBD-FH3 encontrado en EhCortexilina, para llevar a cabo sus funciones dentro de la célula y le permita unirse a los filamentos de actina. Además dentro de esta región se requiere limitar los residuos correspondientes al dominio GBD-FH3 por medio de ensayos de mutagénesis y deleciones; al igual que el motivo de unión a fosfoinosítidos.

Al evaluar la sobreexpresión de esta región tan interesante EhCortexilina (317-753) en transfectantes del parásito en los diferentes procesos celulares logramos identificar que no participa en procesos de división celular a diferencia de su proteína ortóloga en *D. discoideum*, pero si afecta su porcentaje de migración y de adhesión. Esto podríamos explicarlo ya que este dominio *coiled-coil* es compartido por una variedad de proteínas en el parásito, como las miosinas, etc. Miosina IB de *E. histolytica* está involucrada en procesos de migración en la formación del complejo actinmiosina (Arhets y col; 1998), en el que probablemente la sobreexpresión de la región carboxilo terminal de EhCortexilina I esté interfiriendo con la función que realiza la proteína Miosina IB, en la motilidad de la célula para la formación de pseudópodos (Voigh y col; 1999); que aunque no se abate, se ve disminuida. Sin embargo, logramos ver un aumento en el porcentaje de adhesión, lo cual fue corroborado mediante microscopia confocal usando inmunoglobulinas acopladas a fluorocromos en las que observamos una mayor presencia de placas de adhesión en células estimuladas con fibronectina; esto se puede relacionar con la presencia de una polarización de mayor número de

moléculas de superficie en el proceso de formación del cap celular (Tavares y col; 2000).

La lectina Gal/GalNAc y otras moléculas de superficie, participan en la dinámica de interacción con células epiteliales; las cuales se encuentran distribuidas asimétricamente a lo largo de la membrana plasmática después de su activación, encontrándose preferencialmente en la parte posterior en la formación del uroide celular (Guillén, 1996); indicando que esta proteína es importante en varios procesos relevantes en la patogénia del parásito y en mecanismos de evasión al sistema inmune del hospedero.

A grandes rasgos, si consideramos este evento central en la participación de la proteína EhCortexilina I, probablemente lleve a cabo sus funciones en conjunto con otras moléculas como miosina II y ABP-120 que interactúan con los filamentos de actina, los cuales se reclutan a la región del uroide. Además que, como logramos identificar, podría interaccionar con la proteína EhRacG involucrada en el proceso de capping, al ser estimulada con Concavalina A (Figura 27).

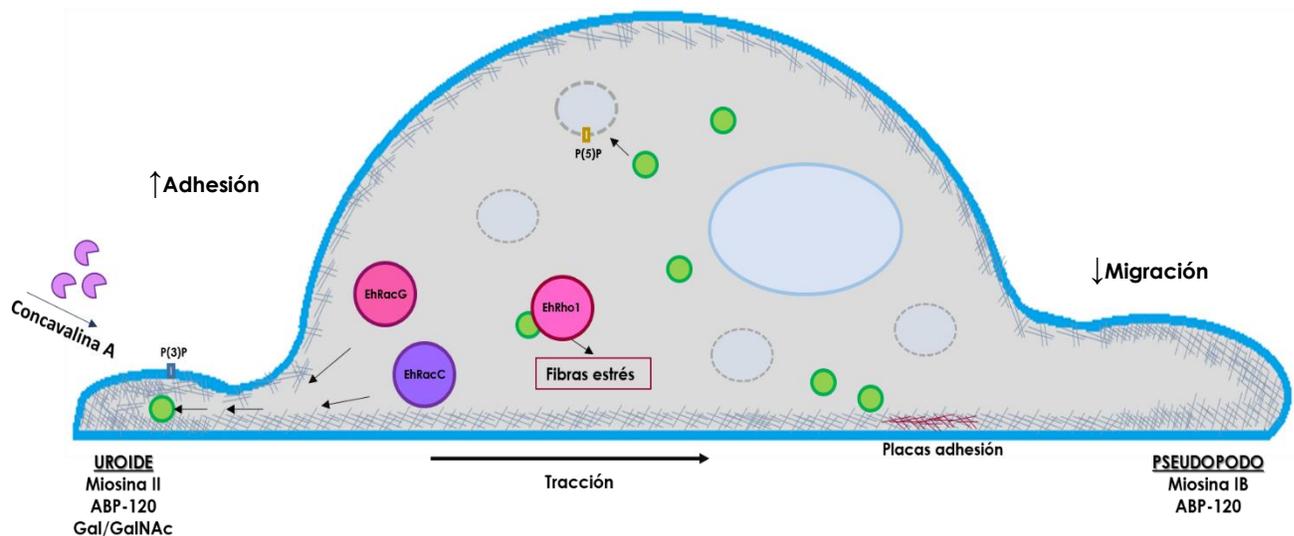


Figura 27. Modelo propuesto de EhCortexilina I- Δ (1-316) en *E. histolytica*. La proteína pExEhNeo/CTXI Δ (1-316)-HSV es reclutada al uroide bajo el estímulo de Concavalina A, probablemente interactuando con EhRac G y Rac C, las cuales están involucradas en el proceso de capping. Además esta proteína que se encuentra a lo largo del citoplasma y cuerpos vesiculares, podría unirse a fosoinositidos en la membrana como P (3) P y P (5)P. Por otro lado, al unirse a EhRho1 podría participar en la formación de fibras de estrés y en la tracción, por el complejo actinomiocina. Sin embargo, la sobreexpresión de la proteína impacta en la migración celular, posiblemente interfiriendo con la función de miosina IB, en la formación de pseudopodos en la célula.

Es importante mencionar que también hallamos otras proteínas con las que interactúa la región carboxilo terminal, lo cual aparentemente indica que la proteína está involucrada en otros procesos como la formación de fibras de estrés con ayuda de EhRho 1 y aún debemos considerar su unión con PtdIns(3) P y PtdIns (5) P, los cuales ayudarían a su localización preferencial en ciertas regiones de la membrana, probablemente después de un estímulo celular; lo cual aún requerimos comprobar experimentalmente

Nuestros resultados en conjunto sugieren que EhCortexilina I tiene dominios diferentes a lo conocido por sus proteínas hermanas en *E. histolytica* y para su contraparte en *D. discoideum*. Nosotros logramos identificar un dominio probable GBD-FH3 que normalmente se encuentra en proteínas como las forminas. Las características comunes que poseen las proteínas que forman parte de esta familia son una serie de dominios de homología con formina 1 y 2 (*formin homology domains* ó FH por sus siglas en inglés). Estos dominios ricos en prolina tienen la capacidad de unirse a monómeros de actina en el extremo creciente (FH1) y el dominio FH2 induce la polimerización por la estabilización de dímeros de actina. De esta manera, las forminas permanecen adheridas al extremo barbado de los filamentos de actina y además previenen la unión de proteínas de *capping* durante la elongación. Algunas proteínas que pertenecen al subgrupo de forminas denominadas *Diaphanous*, contienen el dominio GBD-FH3 para la regulación de otros dominios de autoinhibición presentes en la proteína como DID (*Diaphanus Inhibitory Domain* también conocido como FH3) por medio de su interacción con RhoGTPasas (Bechtold y col; 2014). A pesar de que EhCortexilina I cuenta con un dominio hipotético de este tipo, no podríamos clasificarla como una proteína del tipo DFR (*Diaphanous-related formin*), ya que carece de los dominios FH; siendo así, EhCortexilina I es una ABP's que forma parte de la familia de proteínas que poseen dominios de homología con calponina.

Esta familia a su vez, se subdivide en proteínas que poseen dos dominios ABD (cuatro dominios CH consecutivos), un dominio ABD (CH1-CH2) y aquellas que poseen un dominio CH. Muchas de estas proteínas se ensamblan como dímeros para entrecruzar filamentos de actina, por ejemplo, espectrina y α -actinina; esta última forma un homodímero antiparalelo (Bañuelos y col; 1999). Por medio del ensayo de overlay proteína-proteína encontramos que esta proteína es capaz de formar dímeros por medio del dominio *coiled-coil* en la región carboxilo terminal y además posee un dominio ABD (CH1-CH2), por lo cual podríamos clasificarla en esta familia de proteínas junto con α -actinina. Esto es interesante ya que α -actinina está involucrada en la formación de estructuras como adhesiones focales y fibras de estrés; eventos en los que creemos que EhCortexilina I podría estar participando en *E. histolytica* (Blanchoin y col; 2014). Aunque de cierta manera, EhCortexilina I es una proteína mixta con un dominio interesante que probablemente participa en la regulación de la misma, en diferentes contextos funcionales, lo cual incrementa la importancia de estudiarla.

El estudio de proteínas específicas de los parásitos, abren un campo de posibilidades como buenos candidatos a blancos terapéuticos de las cuales se tiene que estudiar y evaluar sus funciones mediante su caracterización en diferentes aspectos celulares, moleculares y bioquímicos dentro de la patogénia del parásito, con la finalidad de encontrar moléculas específicas de *E. histolytica* que puedan funcionar para un diseño de compuestos dirigidos contra el mismo.

Dentro de este trabajo destaca una idea importante, la cual es que ésta proteína EhCortexilina I es específica del parásito, siendo así, un probable candidato a blanco terapéutico; sin embargo, evaluando esto en el contexto evolutivo existe un transfondo interesante. Dos proteínas que parecieran ortólogas entre dos organismos pertenecientes al mismo *phyllum*, como lo son *D. discoideum* y *E. histolytica*, poseen propiedades diferentes y, relevantemente, se encuentran involucradas en otro tipo de procesos celulares.

Evolutivamente se cree que gran cantidad de genes se modifican por procesos de transferencia horizontal, sin embargo, resulta curioso que en eucariontes superiores no existan ortólogos de los mismos. Varias teorías se han propuesto al respecto, en el que la pérdida de genes puede ser consecuencia de un proceso de acumulación de mutaciones durante la pseudogenización que prosigue de un evento de pérdida de la función de un gen (Albalat y Cañestro, 2016). Teniendo esto en mente, probablemente la proteína EhCortexilina I, lleva a cabo funciones similares a otras proteínas como las miosinas, las cuales se encuentran en todos los eucariontes superiores como proteína compensatoria dentro del parásito. De igual manera, realizando análisis de BLAST, identificamos que la proteína más parecida en humano a EhCortexilina I es α -actinina, por los dominios que comparten ambas, lo cual de alguna manera apoya estas teorías evolutivas de pérdida de funcionalidad en eventos mutacionales.

9. CONCLUSIONES

- La sobreexpresión de la región carboxilo terminal de la proteína EhCortexilina I afecta procesos importantes como la migración y la adhesión.
- Se identificó que los trofozoitos de *E. histolytica* estimulados con Con A permiten el reclutamiento de la proteína recombinante pExEhNeo/CTX1Δ (1-316)-HSV en la región del uroide celular.
- Se logró determinar que pGEX-2TK/CTX1Δ (1-316) se une a fosfatidilinositol-3-P y fosfatidilinositol-5-P, lo cual no se ha observado en otras ABP's.
- La región pGEX-2TK/CTX1Δ (1-316) es capaz de unirse a GTPasas como EhRho1, EhRac A, EhRac C y EhRacG.

10. PERSPECTIVAS

- Determinar el impacto de la proteína EhCortexilina I en la estabilidad de los filamentos de actina.
- Analizar por espectrometría de masas la identidad de las proteínas asociadas a EhCortexilina I
- Evaluar el impacto de la sobreexpresión de la proteína EhCortexilina I y de la región que contiene los dominios de homología con Calponina en células de *E. histolytica*, en diferentes procesos celulares así como su localización celular.
- Delimitar el dominio GBD-FH3 y el motivo de unión a fosfoinositidos en la región carboxilo terminal de la proteína.
- Determinar si el dominio GBD-FH3 recluta a las GTPasas de la familia Rho en su forma activa.
- Confirmar los residuos de unión a fosfoinositidos mediante mutagénesis sitio dirigida.
- Realizar el silenciamiento del mensajero de EhCortexilina I a partir del uso de RNA de interferencia ó antisentidos y evaluar la contribución de esta proteína en la viabilidad celular y organización del citoesqueleto de actina, con la finalidad de identificar la funcionalidad de esta proteína.

11. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Rojas, A., J. Almaraz-Barrera Mde, M. Krzeminski, M. Robles-Flores, R. Hernandez-Rivas, N. Guillen, R. C. Maroun and M. Vargas (2005). "*Entamoeba histolytica*: inhibition of cellular functions by overexpression of EhGEF1, a novel Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor." *Exp Parasitol* 109(3): 150-162.
- Albalat, R. and C. Canestro (2016). "Evolution by gene loss." *Nat Rev Genet* 17(7): 379-391.
- Ali, I. K. (2015). "Intestinal amebae." *Clin Lab Med* 35(2): 393-422.
- Ali, I. K., C. G. Clark and W. A. Petri, Jr. (2008). "Molecular epidemiology of amebiasis." *Infect Genet Evol* 8(5): 698-707.
- Andra, J., R. Herbst and M. Leippe (2003). "Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes." *Dev Comp Immunol* 27(4): 291-304.
- Arhets, P., P. Gounon, P. Sansonetti and N. Guillen (1995). "Myosin II is involved in capping and uroid formation in the human pathogen *Entamoeba histolytica*." *Infect Immun* 63(11): 4358-4367.
- Arhets, P., J. C. Olivo, P. Gounon, P. Sansonetti and N. Guillen (1998). "Virulence and functions of myosin II are inhibited by overexpression of light meromyosin in *Entamoeba histolytica*." *Mol Biol Cell* 9(6): 1537-1547.
- Arias-Romero, L. E., C. H. de la Rosa, J. Almaraz-Barrera Mde, J. D. Diaz-Valencia, A. Sosa-Peinado and M. Vargas (2007). "EhGEF3, a novel Dbl family member, regulates EhRacA activation during chemotaxis and capping in *Entamoeba histolytica*." *Cell Motil Cytoskeleton* 64(5): 390-404.
- Banuelos, S., M. Saraste and K. Djinojic Carugo (1998). "Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin binding." *Structure* 6(11): 1419-1431.
- Barron-Gonzalez, M. P., L. Villarreal-Trevino, D. Resendez-Perez, B. D. Mata-Cardenas and M. R. Morales-Vallarta (2008). "*Entamoeba histolytica*: cyst-like structures in vitro induction." *Exp Parasitol* 118(4): 600-603.
- Bechtold, M., J. Schultz and S. Bogdan (2014). "FHOD proteins in actin dynamics--a formin' class of its own." *Small GTPases* 5(2): 11.
- Begum, S., J. Quach and K. Chadee (2015). "Immune Evasion Mechanisms of *Entamoeba histolytica*: Progression to Disease." *Front Microbiol* 6: 1394.
- Benetton, M. L., A. V. Goncalves, M. E. Meneghini, E. F. Silva and M. Carneiro (2005). "Risk factors for infection by the *Entamoeba histolytica*/E. dispar complex: an epidemiological study conducted in outpatient clinics in the city of Manaus, Amazon Region, Brazil." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99(7): 532-540.
- Biasini, M., S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. Gallo Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli and T. Schwede (2014). "SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information." *Nucleic Acids Res* 42(Web Server issue): W252-258.
- Binder, M., S. Ortner, H. Erben, O. Scheiner, G. Wiedermann, R. Valenta and M. Duchene (1995). "The basic isoform of profilin in pathogenic *Entamoeba histolytica*. cDNA cloning, heterologous expression, and actin-binding properties." *Eur J Biochem* 233(3): 976-981.

- Blanchoin, L., R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes and J. Plastino (2014). "Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility." *Physiol Rev* 94(1): 235-263.
- Bolanos, V., A. Diaz-Martinez, J. Soto, L. A. Marchat, V. Sanchez-Monroy and E. Ramirez-Moreno (2015). "Kaempferol inhibits *Entamoeba histolytica* growth by altering cytoskeletal functions." *Mol Biochem Parasitol* 204(1): 16-25.
- Bourguignon, L. Y. and S. J. Singer (1977). "Transmembrane interactions and the mechanism of capping of surface receptors by their specific ligands." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(11): 5031-5035.
- Burd, C. G. and S. D. Emr (1998). "Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains." *Mol Cell* 2(1): 157-162.
- Calderon, J., M. de Lourdes Munoz and H. M. Acosta (1980). "Surface redistribution and release of antibody-induced caps in entamoebae." *J Exp Med* 151(1): 184-193.
- Carpentieri, A., D. M. Ratner, S. K. Ghosh, S. Banerjee, G. G. Bushkin, J. Cui, M. Lubrano, M. Steffen, C. E. Costello, B. O'Keefe, P. W. Robbins and J. Samuelson (2010). "The antiretroviral lectin cyanovirin-N targets well-known and novel targets on the surface of *Entamoeba histolytica* trophozoites." *Eukaryot Cell* 9(11): 1661-1668.
- Cha, I. and T. J. Jeon (2011). "Dynamic localization of the actin-bundling protein cortexillin I during cell migration." *Mol Cells* 32(3): 281-287.
- Chacin-Bonilla, L. (2013). "[An update on amebiasis]." *Rev Med Chil* 141 (5): 609-615.
- Clark, C. G. (1995). "Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, *Entamoeba insolita* Geiman and Wichterman 1937 and *Entamoeba ranarum* Grassi 1879." *J Eukaryot Microbiol* 42(5): 590-593.
- Clark, C. G. and L. S. Diamond (1992). "Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa by riboprinting." *Arch Med Res* 23(2): 15-16.
- Corgan, A. M., C. Singleton, C. B. Santoso and J. A. Greenwood (2004). "Phosphoinositides differentially regulate alpha-actinin flexibility and function." *Biochem J* 378(Pt 3): 1067-1072.
- Cossart, P. (2004). "Bacterial invasion: a new strategy to dominate cytoskeleton plasticity." *Dev Cell* 6(3): 314-315.
- Craig, D. H., B. Haimovich and M. D. Basson (2007). "Alpha-actinin-1 phosphorylation modulates pressure-induced colon cancer cell adhesion through regulation of focal adhesion kinase-Src interaction." *Am J Physiol Cell Physiol* 293(6): C1862-1874.
- Cunningham, C. C. (1992). "Actin structural proteins in cell motility." *Cancer Metastasis Rev* 11(1): 69-77.
- Davis, C. A., M. P. Brown and U. Singh (2007). "Functional characterization of spliceosomal introns and identification of U2, U4, and U5 snRNAs in the deep-branching eukaryote *Entamoeba histolytica*." *Eukaryot Cell* 6(6): 940-948.
- Diamond, L. S., D. R. Harlow, B. P. Phillips and D. B. Keister (1978). "*Entamoeba histolytica*: iron and nutritional immunity." *Arch Invest Med (Mex)* 9 Suppl 1: 329-338.
- dos Remedios, C. G., D. Chhabra, M. Kekic, I. V. Dedova, M. Tsubakihara, D. A. Berry and N. J. Nosworthy (2003). "Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments." *Physiol Rev* 83(2): 433-473.

- Edman, U., I. Meza and N. Agabian (1987). "Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*." Proc Natl Acad Sci U S A 84(9): 3024-3028.
- Espinosa-Cantellano, M., A. Gonzales-Robles, B. Chavez, G. Castan on, C. Arguello, A. Lazaro-Haller and A. Martinez-Palomo (1998). "Entamoeba dispar: ultrastructure, surface properties and cytopathic effect." J Eukaryot Microbiol 45(3): 265-272.
- Evangelista, M., S. Zigmund and C. Boone (2003). "Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments." J Cell Sci 116(Pt 13): 2603-2611.
- Faix, J. (2002). "The actin-bundling protein cortexillin is the downstream target of a Rac1-signaling pathway required for cytokinesis." J Muscle Res Cell Motil 23(7-8): 765-772.
- Faix, J., M. Steinmetz, H. Boves, R. A. Kammerer, F. Lottspeich, U. Mintert, J. Murphy, A. Stock, U. Aebi and G. Gerisch (1996). "Cortexillins, major determinants of cell shape and size, are actin-bundling proteins with a parallel coiled-coil tail." Cell 86(4): 631-642.
- Faix, J., I. Weber, U. Mintert, J. Kohler, F. Lottspeich and G. Marriott (2001). "Recruitment of cortexillin into the cleavage furrow is controlled by Rac1 and IQGAP-related proteins." EMBO J 20(14): 3705-3715.
- Faust, D. M. and N. Guillen (2012). "Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis." Microbes Infect 14(15): 1428-1441.
- Flores-Robles, D., C. Rosales, J. L. Rosales-Encina and P. Talamas-Rohana (2003). "*Entamoeba histolytica*: a beta 1 integrin-like fibronectin receptor assembles a signaling complex similar to those of mammalian cells." Exp Parasitol 103(1-2): 8-15.
- Forgacs, G., S. H. Yook, P. A. Janmey, H. Jeong and C. G. Burd (2004). "Role of the cytoskeleton in signaling networks." J Cell Sci 117(Pt 13): 2769-2775.
- Franco-Barraza, J., H. Zamudio-Meza, E. Franco, M. del Carmen Dominguez-Robles, N. Villegas-Sepulveda and I. Meza (2006). "Rho signaling in *Entamoeba histolytica* modulates actomyosin-dependent activities stimulated during invasive behavior." Cell Motil Cytoskeleton 63(3): 117-131.
- Frangioni, J. V. and B. G. Neel (1993). "Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins." Anal Biochem 210(1): 179-187.
- Gaullier, J. M., A. Simonsen, A. D'Arrigo, B. Bremnes, H. Stenmark and R. Aasland (1998). "FYVE fingers bind PtdIns(3)P." Nature 394(6692): 432-433.
- Goldsmith, S. C., N. Pokala, W. Shen, A. A. Fedorov, P. Matsudaira and S. C. Almo (1997). "The structure of an actin-crosslinking domain from human fimbrin." Nat Struct Biol 4(9): 708-712.
- Gonzalez De la Rosa, C. H., L. E. Arias-Romero, M. de Jesus Almaraz-Barrera, R. Hernandez-Rivas, A. Sosa-Peinado, A. Rojo-Dominguez, M. Robles-Flores and M. Vargas (2007). "EhGEF2, a Dbl-RhoGEF from *Entamoeba histolytica* has atypical biochemical properties and participates in essential cellular processes." Mol Biochem Parasitol 151(1): 70-80.
- Goode, B. L. and M. J. Eck (2007). "Mechanism and function of formins in the control of actin assembly." Annu Rev Biochem 76: 593-627.
- Guillen, N. (1993). "Cell signalling and motility in *Entamoeba histolytica*." Parasitol Today 9(10): 364-369.

- Guillen, N. (1996). "Role of signalling and cytoskeletal rearrangements in the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*." Trends Microbiol 4(5): 191-197.
- Guillen, N., P. Boquet and P. Sansonetti (1998). "The small GTP-binding protein RacG regulates uroid formation in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*." J Cell Sci 111 (Pt 12): 1729-1739.
- Guillen, N. and P. Sansonetti (1997). "Rac G, a small GTPase, regulates capping of surface receptors in *Entamoeba histolytica*." Arch Med Res 28 Spec No: 129-131.
- Haque, R., C. D. Huston, M. Hughes, E. Hout and W. A. Petri, Jr. (2003). "Amebiasis." N Engl J Med 348(16): 1565-1573.
- Haque, R., D. Mondal, P. Duggal, M. Kabir, S. Roy, B. M. Farr, R. B. Sack and W. A. Petri, Jr. (2006). "*Entamoeba histolytica* infection in children and protection from subsequent amebiasis." Infect Immun 74(2): 904-909.
- Heissler, S. M. and J. R. Sellers (2016). "Various Themes of Myosin Regulation." J Mol Biol 428(9 Pt B): 1927-1946.
- Hernandez-Flores, A., M. J. Almaraz-Barrera, D. Lozano-Amado, J. Correa-Basurto, A. Rojo-Dominguez, E. Luna-Rivera, M. Schnoor, N. Guillen, R. Hernandez-Rivas and M. Vargas (2016). "A new nucleocytoplasmic RhoGAP protein contributes to control the pathogenicity of *Entamoeba histolytica* by regulating EhRacC and EhRacD activity." Cell Microbiol 18(11): 1653-1672.
- Higgs, H. N. (2005). "Formin proteins: a domain-based approach." Trends Biochem Sci 30(6): 342-353.
- Huston, C. D. (2004). "Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis." Trends Parasitol 20(1): 23-26.
- Janmey, P. A., J. Lamb, P. G. Allen and P. T. Matsudaira (1992). "Phosphoinositide-binding peptides derived from the sequences of gelsolin and villin." J Biol Chem 267(17): 11818-11823.
- Jeon, T. J., D. J. Lee, S. Merlot, G. Weeks and R. A. Firtel (2007). "Rap1 controls cell adhesion and cell motility through the regulation of myosin II." J Cell Biol 176(7): 1021-1033.
- Jo, B. S. and S. S. Choi (2015). "Introns: The Functional Benefits of Introns in Genomes." Genomics Inform 13(4): 112-118.
- Kelley, L. A., S. Mezulis, C. M. Yates, M. N. Wass and M. J. Sternberg (2015). "The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis." Nat Protoc 10(6): 845-858.
- Kosciolatek, T. and D. T. Jones (2014). "De novo structure prediction of globular proteins aided by sequence variation-derived contacts." PLoS One 9(3): e92197.
- Kuhn, S. and M. Geyer (2014). "Formins as effector proteins of Rho GTPases." Small GTPases 5: e29513.
- Kutateladze, T. G. (2006). "Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition and membrane docking by the FYVE domain." Biochim Biophys Acta 1761(8): 868-877.
- Labruyere, E. and N. Guillen (2006). "Host tissue invasion by *Entamoeba histolytica* is powered by motility and phagocytosis." Arch Med Res 37(2): 253-258.

- Labruyere, E., C. Zimmer, V. Galy, J. C. Olivo-Marin and N. Guillen (2003). "EhPAK, a member of the p21-activated kinase family, is involved in the control of *Entamoeba histolytica* migration and phagocytosis." *J Cell Sci* 116(Pt 1): 61-71.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lemmon, M. A. (2003). "Phosphoinositide recognition domains." *Traffic* 4(4): 201-213.
- Liu, X., S. Shu, S. Yu, D. Y. Lee, G. Piszczek, M. Gucek, G. Wang and E. D. Korn (2014). "Biochemical and biological properties of cortexillin III, a component of Dictyostelium DGAP1-cortexillin complexes." *Mol Biol Cell* 25(13): 2026-2038.
- Lopez-Romero, E. and J. C. Villagomez-Castro (1993). "Encystation in *Entamoeba invadens*." *Parasitol Today* 9(6): 225-227.
- MacFarlane, R. C. and U. Singh (2006). "Identification of differentially expressed genes in virulent and nonvirulent *Entamoeba* species: potential implications for amebic pathogenesis." *Infect Immun* 74(1): 340-351.
- Majumder, S. and A. Lohia (2008). "*Entamoeba histolytica* encodes unique formins, a subset of which regulates DNA content and cell division." *Infect Immun* 76(6): 2368-2378.
- Mann, B. J. (2002). "Structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin." *Int Rev Cytol* 216: 59-80.
- Marie, C. and W. A. Petri, Jr. (2014). "Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica*." *Annu Rev Microbiol* 68: 493-520.
- Marion, S. and N. Guillen (2006). "Genomic and proteomic approaches highlight phagocytosis of living and apoptotic human cells by the parasite *Entamoeba histolytica*." *Int J Parasitol* 36(2): 131-139.
- Marion, S., N. Guillen, J. C. Bacri and C. Wilhelm (2005). "Acto-myosin cytoskeleton dependent viscosity and shear-thinning behavior of the amoeba cytoplasm." *Eur Biophys J* 34(3): 262-272.
- Martínez P.A.(1986). "Biología de *Entamoeba histolytica*" Amebiasis. Edit. Panamericana SA. México. D.F. 17-41.
- Mason, J. M. and K. M. Arndt (2004). "Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications." *ChemBiochem* 5(2): 170-176.
- Meza, I., P. Talamas-Rohana and M. A. Vargas (2006). "The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: structure, function, and regulation by signaling pathways." *Arch Med Res* 37(2): 234-243.
- Miki, H., K. Miura and T. Takenawa (1996). "N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases." *EMBO J* 15(19): 5326-5335.
- Mortimer, L. and K. Chadee (2010). "The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*." *Exp Parasitol* 126(3): 366-380.
- Mortimer, L., F. Moreau, S. Cornick and K. Chadee (2015). "The NLRP3 Inflammasome Is a Pathogen Sensor for Invasive *Entamoeba histolytica* via Activation of alpha5beta1 Integrin at the Macrophage-Amebae Intercellular Junction." *PLoS Pathog* 11(5): e1004887.
- Nakada-Tsukui, K., K. Tsuboi, A. Furukawa, Y. Yamada and T. Nozaki (2012). "A novel class of cysteine protease receptors that mediate lysosomal transport." *Cell Microbiol* 14(8): 1299-1317.

- Nickel, R. and E. Tannich (1994). "Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(15): 7095-7098.
- Norwood, F. L., A. J. Sutherland-Smith, N. H. Keep and J. Kendrick-Jones (2000). "The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy." *Structure* 8(5): 481-491.
- Orozco, E., A. Martinez-Palomo and R. Lopez-Revilla (1978). "[An in vitro model for the quantitative study of *E. histolytica* virulence]." *Arch Invest Med (Mex)* 9 Suppl 1: 257-260.
- Orozco, E., M. A. Rodriguez, C. F. Murphy, R. A. Salata and J. I. Ravdin (1986). "[Mitogenic and lectin activity of mutants of *Entamoeba histolytica* deficient in virulence]." *Arch Invest Med (Mex)* 17 Suppl 1: 167-172.
- Paavilainen, V. O., E. Bertling, S. Falck and P. Lappalainen (2004). "Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins." *Trends Cell Biol* 14(7): 386-394.
- Pearson, R. J. and U. Singh (2010). "Approaches to characterizing *Entamoeba histolytica* transcriptional regulation." *Cell Microbiol* 12(12): 1681-1690.
- Petri, W. A., Jr. and B. J. Mann (1993). "Molecular mechanisms of invasion by *Entamoeba histolytica*." *Semin Cell Biol* 4(5): 305-313.
- Petri, W. A., Jr., R. Haque and B. J. Mann (2002). "The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*." *Annu Rev Microbiol* 56: 39-64.
- Pollard, T. D. and J. A. Cooper (1986). "Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions." *Annu Rev Biochem* 55: 987-1035.
- Pumarola A. (1991). "Microbiología y parasitología médica". Salvat. 2:916.
- Ralston, K. S. (2015). "Chew on this: amoebic trophocytosis and host cell killing by *Entamoeba histolytica*." *Trends Parasitol* 31(9): 442-452.
- Ralston, K. S. and W. A. Petri, Jr. (2011). "Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*." *Trends Parasitol* 27(6): 254-263.
- Ralston, K. S., M. D. Solga, N. M. Mackey-Lawrence, Somlata, A. Bhattacharya and W. A. Petri, Jr. (2014). "Trophocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion." *Nature* 508(7497): 526-530.
- Raymond-Denise, A., P. Sansonetti and N. Guillen (1993). "Identification and characterization of a myosin heavy chain gene (mhcA) from the human parasitic pathogen *Entamoeba histolytica*." *Mol Biochem Parasitol* 59(1): 123-131.
- Rios, A., V. I. Hernandez-Ramirez, M. Moguel, A. I. Zarate Bahena, J. L. Rosales-Encina, M. A. Vargas and P. Talamas-Rohana (2008). "Participation of Rho, ROCK-2, and GAP activities during actin microfilament rearrangements in *Entamoeba histolytica* induced by fibronectin signaling." *Cell Biol Int* 32(8): 984-1000.
- Rivero, F., T. Muramoto, A. K. Meyer, H. Urushihara, T. Q. Uyeda and C. Kitayama (2005). "A comparative sequence analysis reveals a common GBD/FH3-FH1-FH2-DAD architecture in formins from Dictyostelium, fungi and metazoa." *BMC Genomics* 6: 28.

- Rosales-Encina, J. L., I. Meza, A. Lopez-De-Leon, P. Talamas-Rohana and M. Rojkind (1987). "Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*." J Infect Dis 156(5): 790-797.
- Rubino, M., M. Miaczynska, R. Lippe and M. Zerial (2000). "Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes." J Biol Chem 275(6): 3745-3748.
- Sabanero, M. and I. Meza (1982). "[Localization of actin in trophozoites of *Entamoeba histolytica* (HMI)]." Arch Invest Med (Mex) 13 Suppl 3: 37-42.
- Samie, A., R. L. Guerrant, L. Barrett, P. O. Bessong, E. O. Igumbor and C. L. Obi (2009). "Prevalence of intestinal parasitic and bacterial pathogens in diarrhoeal and non-diarrhoeal human stools from Vhembe district, South Africa." J Health Popul Nutr 27(6): 739-745.
- Samie, A., L. C. Obi, P. O. Bessong, S. Stroup, E. Houpt and R. L. Guerrant (2006). "Prevalence and species distribution of *E. histolytica* and *E. Dispar* in the Venda region, Limpopo, South Africa." Am J Trop Med Hyg 75(3): 565-571.
- Schuster, F. L. and G. S. Visvesvara (2004). "Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease." Vet Parasitol 126(1-2): 91-120.
- Sevcik, J., L. Urbanikova, J. Kost'an, L. Janda and G. Wiche (2004). "Actin-binding domain of mouse plectin. Crystal structure and binding to vimentin." Eur J Biochem 271(10): 1873-1884.
- Singh, S. M. and K. M. Mallela (2012). "The N-terminal actin-binding tandem calponin-homology (CH) domain of dystrophin is in a closed conformation in solution and when bound to F-actin." Biophys J 103(9): 1970-1978.
- Sjoblom, B., A. Salmazo and K. Djinovic-Carugo (2008). "Alpha-actinin structure and regulation." Cell Mol Life Sci 65(17): 2688-2701.
- Sjoblom, B., J. Ylanne and K. Djinovic-Carugo (2008). "Novel structural insights into F-actin-binding and novel functions of calponin homology domains." Curr Opin Struct Biol 18(6): 702-708.
- Song, J., Q. Xu, R. Olsen, W. F. Loomis, G. Shaulsky, A. Kuspa and R. Suckgang (2005). "Comparing the Dictyostelium and Entamoeba genomes reveals an ancient split in the Conosa lineage." PLoS Comput Biol 1(7): e71.
- Srivastava, V. and D. N. Robinson (2015). "Mechanical stress and network structure drive protein dynamics during cytokinesis." Curr Biol 25(5): 663-670.
- Stanley, S. L., Jr. (2003). "Amoebiasis." Lancet 361(9362): 1025-1034.
- Steinmetz, M. O., A. Stock, T. Schulthess, R. Landwehr, A. Lustig, J. Faix, G. Gerisch, U. Aebi and R. A. Kammerer (1998). "A distinct 14 residue site triggers coiled-coil formation in cortexillin I." EMBO J 17(7): 1883-1891.
- Stock, A., M. O. Steinmetz, P. A. Janmey, U. Aebi, G. Gerisch, R. A. Kammerer, I. Weber and J. Faix (1999). "Domain analysis of cortexillin I: actin-bundling, PIP(2)-binding and the rescue of cytokinesis." EMBO J 18(19): 5274-5284.
- Stock, A., M. O. Steinmetz, P. A. Janmey, U. Aebi, G. Gerisch, R. A. Kammerer, I. Weber and J. Faix (1999). "Domain analysis of cortexillin I: actin-bundling, PIP(2)-binding and the rescue of cytokinesis." EMBO J 18(19): 5274-5284.
- Stradal, T., W. Kranewitter, S. J. Winder and M. Gimona (1998). "CH domains revisited." FEBS Lett 431(2): 134-137.
- Tavares, P., P. Sansonetti and N. Guillen (2000). "Cell polarization and adhesion in a motile pathogenic protozoan: role and fate of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin." Microbes Infect 2(6): 643-649.

- Tavares, P., P. Sansonetti and N. Guillen (2000). "The interplay between receptor capping and cytoskeleton remodeling in *Entamoeba histolytica*." Arch Med Res 31(4 Suppl): S140-142.
- Teixeira, J. E., B. T. Heron and C. D. Huston (2008). "C1q- and collectin-dependent phagocytosis of apoptotic host cells by the intestinal protozoan *Entamoeba histolytica*." J Infect Dis 198(7): 1062-1070.
- Vargas, M., P. Sansonetti and N. Guillen (1996). "Identification and cellular localization of the actin-binding protein ABP-120 from *Entamoeba histolytica*." Mol Microbiol 22(5): 849-857.
- Vargas, M., H. Voigt, P. Sansonetti and N. Guillen (1997). "Molecular characterization of myosin IB from the lower eukaryote *Entamoeba histolytica*, a human parasite." Mol Biochem Parasitol 86(1): 61-73.
- Vazquez, J., E. Franco, G. Reyes and I. Meza (1995). "Characterization of adhesion plates induced by the interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with fibronectin." Cell Motil Cytoskeleton 32(1): 37-45.
- Viaud, J., F. Lagarrigue, D. Ramel, S. Allart, G. Chicanne, L. Ceccato, D. Courilleau, J. M. Xuereb, O. Pertz, B. Payrastre and F. Gaits-Iacovoni (2014). "Phosphatidylinositol 5-phosphate regulates invasion through binding and activation of Tiam1." Nat Commun 5: 4080.
- Vieira, J. and J. Messing (1982). "The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers." Gene 19(3): 259-268.
- Voigt, H., J. C. Olivo, P. Sansonetti and N. Guillen (1999). "Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes." J Cell Sci 112 (Pt 8): 1191-1201.
- Wallar, B. J. and A. S. Alberts (2003). "The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton." Trends Cell Biol 13(8): 435-446.
- Wang, Z. and C. B. Burge (2008). "Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code." RNA 14(5): 802-813.
- Warner, J. R. and C. Gorenstein (1977). "The synthesis of eucaryotic ribosomal proteins in vitro." Cell 11(1): 201-212.
- Warner, J. R. and C. Gorenstein (1977). "The synthesis of eucaryotic ribosomal proteins in vitro." Cell 11(1): 201-212.
- Wassmann, C., A. Hellberg, E. Tannich and I. Bruchhaus (1999). "Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase." J Biol Chem 274(37): 26051-26056.
- Watanabe, K., H. Gatanaga, A. Escueta-de Cadiz, J. Tanuma, T. Nozaki and S. Oka (2011). "Amebiasis in HIV-1-infected Japanese men: clinical features and response to therapy." PLoS Negl Trop Dis 5(9): e1318.
- Weber, C., M. Koutero, M. A. Dillies, H. Varet, C. Lopez-Camarillo, J. Y. Coppee, C. C. Hon and N. Guillen (2016). "Extensive transcriptome analysis correlates the plasticity of *Entamoeba histolytica* pathogenesis to rapid phenotype changes depending on the environment." Sci Rep 6: 35852.
- Weber, I., G. Gerisch, C. Heizer, J. Murphy, K. Badelt, A. Stock, J. M. Schwartz and J. Faix (1999). "Cytokinesis mediated through the recruitment of cortexillins into the cleavage furrow." EMBO J 18(3): 586-594.

- Weedall, G. D. and N. Hall (2011). "Evolutionary genomics of *Entamoeba*." *Res Microbiol* 162(6): 637-645.
- Weedall, G. D. and N. Hall (2011). "Evolutionary genomics of *Entamoeba*." *Res Microbiol* 162(6): 637-645.
- Wilihoeft, U., E. Campos-Gongora, S. Touzni, I. Bruchhaus and E. Tannich (2001). "Introns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*." *Protist* 152(2): 149-156.
- Wilson, I. W., G. D. Weedall and N. Hall (2012). "Host-Parasite interactions in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: what have we learned from their genomes?" *Parasite Immunol* 34(2-3): 90-99.
- Winder, S. J. and K. R. Ayscough (2005). "Actin-binding proteins." *J Cell Sci* 118(Pt 4): 651-654.
- Xiao, Y., D. Pollack, E. Nieves, A. Winchell, M. Callaway and M. Vigodner (2015). "Can your protein be sumoylated? A quick summary and important tips to study SUMO-modified proteins." *Anal Biochem* 477: 95-97.
- Zhao, Z., L. Lim and E. Manser (2001). "Blot overlays with ³²P-labeled fusion proteins." *Methods* 24(3): 194-200.
- Zlobl, T. L. (2001). "Amebiasis." *Prim Care Update Ob Gyns* 8(2): 65-68.

ANEXO

Secuencias de oligonucleótidos utilizados.

5'C-end-CTXI: CGGGGTACCCCGATGATTGATCTTAACAAAGATCCA

3'C-end-CTXI-HSV:

CGCGGATCCGCGTAAATCCTCTGGGTCTTCAGGAGCGAGTTCTGGCT
GGCTCTCTTTGTTAACCGTTCAATAAGCCACAT'

5'C-end-CTXI-2TK: CGCGGATCCGCGATGATTGATCTTAACAAAGATCCA

3'C-end-CTXI-2TK: CCGGAATCCGGTACTCTTTGTTAACCGTTCAAT