



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE  
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Identificación y caracterización del ácido liso *bis*-fosfatídico en  
*Entamoeba histolytica* y su participación en la endocitosis

T E S I S

que presenta

M. EN C. SILVIA CASTELLANOS CASTRO

para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directora de tesis: ESTHER OROZCO OROZCO

México, D.F.

DICIEMBRE, 2015

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), en el laboratorio 2 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (DIPM) bajo la dirección de la Dra. Esther Orozco.

## AGRADECIMIENTOS

A la tutora de esta tesis:

**Dra. Esther Orozco Orozco.** DIPM, CINVESTAV-IPN.

Al grupo asesor de esta tesis:

**Dr. Jorge Cerbón Solórzano.** Bioquímica, CINVESTAV-IPN.

**Dra. Mavil López Casamichana.** División Científica, SEGOB.

**Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres.** DIPM, CINVESTAV-IPN.

**Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez.** DIPM, CINVESTAV-IPN.

Al **Dr. Carlos Martín Cerda Rojas** por su valiosa colaboración y asesoría en las cromatografías y espectrometría de masas. Química, CINVESTAV-IPN.

Al personal de los laboratorios centrales del CINVESTAV-IPN por su apoyo con los experimentos de espectrometría de masas, citometría de flujo y microscopía confocal:

**IBT. Lorena Ramírez reyes**

**M.enC. Víctor Hugo Rosales**

**M.enC. José Iván Galván Mendoza**

A los auxiliares de laboratorio por su colaboración y soporte técnico durante el desarrollo de este trabajo:

**Mtro. Tomas Sánchez Maldonado.** DIPM, CINVESTAV-IPN.

**Dra. Guillermina García Rivera.** DIPM, CINVESTAV-IPN.

**Alejandrina Reyes.** DIPM, CINVESTAV-IPN.

**QFB. Verónica Reyes Olivares.** Química, CINVESTAV-IPN.

Al **M.enC. Eduardo Carrillo Tapia** por su colaboración con las imágenes de microscopía confocal y **Alfredo Padilla Barbieri** por su trabajo de diseño. Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM.

A los compañeros de laboratorio por su colaboración durante el desarrollo de este trabajo:

**Dra. Rosario Javier Reyna, M.enC. Jonnatan Pais Morales y M.enC. Sarita Montaña.**

A todos los estudiantes y egresados del laboratorio 2 del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular con los que compartí espacio, tiempo y experiencias durante el desarrollo de esta tesis.

A la familia Castellanos Castro por el apoyo incondicional.

Tesis dedicada a:

*Todos aquellos que no han tenido la oportunidad de estudiar.*

*Todos aquellos que por sus condiciones de vida están más expuestos a las diferentes parasitosis y enfermedades infecciosas.*

*Mis padres Gilberto Castellanos † y Silvia Castro*

## Índice

INTRODUCCIÓN .....	1
1. Epidemiología de la amibiasis.....	1
2. Cuadro clínico de pacientes con amibiasis .....	3
3. Ciclo de vida.....	4
4. Patogenicidad de <i>E. histolytica</i> .....	6
5. Los lípidos de <i>E. histolytica</i> .....	18
6. Tráfico vesicular en <i>E. histolytica</i> .....	21
7. Las proteínas de la familia Alix.....	24
8. La vía endocítica .....	29
9. Formación de los cuerpos multivesiculares y la maquinaria ESCRT.....	34
10. Participación de los lípidos en la vía endocítica .....	44
11. El ácido liso <i>bis</i> -fosfatídico (LBPA) .....	51
12. El LBPA y la proteína ALIX. Formación de vesículas intraluminales del endosoma tardío .....	62

13. La participación del LBPA en la degradación de moléculas.....	64
14. El LBPA y el colesterol.....	66
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	71
OBJETIVO GENERAL.....	71
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	71
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	72
1. Identificación del LBPA en lípidos de <i>E. histolytica</i> . ....	72
2. Determinación de las especies moleculares del EhLBPA de amiba.....	72
3. Localización celular del LBPA de <i>E. histolytica</i> .....	73
i) Distribución celular del LBPA de <i>E. histolytica</i> en condiciones basales....	73
ii) Distribución celular del LBPA de <i>E. histolytica</i> durante eventos de endocitosis .....	73
4. Análisis de la interacción del LBPA de <i>E. histolytica</i> con la proteína EhADH. ....	74
MATERIALES Y METODOS .....	77

1. Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	77
2. Obtención de extractos totales de trofozoítos .....	78
3. Extracción de lípidos totales .....	78
4. Cuantificación de fósforo total de fosfolípidos .....	79
5. Ensayos de ELISA.....	79
6. Cromatografía en capa fina.....	81
7. Dot blot.....	82
8. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	83
9. Espectrometría de masas.....	85
10. Tinción de vesículas ácidas .....	87
11. Ensayos de pinocitosis <i>in vitro</i> .....	87
12. Obtención de eritrocitos .....	88
13. Ensayos de eritrofagocitosis <i>in vitro</i> .....	88
14. Inmunofluorescencia indirecta .....	89



15. Cuantificación de fluorescencia .....	90
16. Ensayos de microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	91
17. Ensayos de inmunoprecipitación.....	92
18. <i>Docking</i> molecular.....	94
19. Análisis estadístico .....	95
RESULTADOS .....	97
Identificación del LBPA.....	97
1. El LBPA está presente en lípidos de <i>E. histolytica</i> .....	97
2. Identificación de las especies moleculares de LBPA de <i>E. histolytica</i> ...	105
Existen al menos seis especies moleculares de LBPA en los trofozoítos ..	105
EL LBPA de <i>E. histolytica</i> más abundante es de subclase 38:3(18:1/20:2) .....	116
3. Localización celular del LBPA .....	120
El LBPA se encuentra en las vesículas ácidas de trofozoítos .....	120
4. Distribución celular del LBPA durante eventos endocíticos .....	126

El LBPA co-localiza con pinosomas y fagosomas .....	126
El LBPA se encuentra en fagosomas que contienen eritrocitos.....	135
5. Asociación del LBPA con la proteína EhRab7A .....	141
6. El LBPA interactúa con la proteína EhADH en condiciones basales y durante eventos de fagocitosis.....	144
La interacción <i>in silico</i> entre EhADH y LBPA implica el dominio Bro1 y el extremo carboxilo de la proteína EhADH.....	154
DISCUSIÓN .....	162
Identificación del LBPA y determinación de sus especies moleculares .....	165
Localización de LBPA en trofozoítos.....	172
Distribución celular del LBPA durante los procesos endocíticos .....	174
El LBPA está asociado a la proteína EhADH en condiciones basales y durante la fagocitosis .....	180
CONCLUSIONES.....	184
PERSPECTIVAS.....	185

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 186

## Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida .....	8
Figura 2. proteínas de la familia ALIX .....	27
Figura 3. La vía endocítica.....	32
Figura 4. Maquinaria ESCRT en la formación de cuerpos multivesiculares.....	42
Figura 5. Estructura de los distintos tipos de glicerofosfolípidos.....	55
Figura 6. Estructura del PG y el LBPA.....	57
Figura 7. Estrategia experimental.....	75
Figura 8. Inmunodetección del LBPA en muestras de distintos fosfolípidos por ensayos de ELISA.....	99
Figura 9. El LBPA forma parte de los fosfolípidos de <i>E. histolytica</i> .....	103
Figura 10. Análisis por LS-ESI-MS del estándar (S,S)-2,2'-bisoleoyl-LBPA ..	110
Figura 11. Patrón de fragmentación del (S,S)-2,2'-bisoleoyl-LBPA.....	112
Figura 12. Existen al menos seis especies moleculares de LBPA en <i>E.</i> <i>histolytica</i> .....	114

Figura 13. el LBPA se localiza en el interior de vesículas citoplasmáticas....	122
Figura 14. Inmunolocalización celular del LBPA por microscopía confocal ...	124
Figura 15. Inmunolocalización del LBPA durante la endocitosis .....	129
Figura 16. Inmunolocalización del LBPA durante la pinocitosis .....	131
Figura 17. Cuantificación de fluorescencia intracelular correspondiente a LBPA y dextran-FITC durante la pinocitosis.....	133
Figura 18. Inmunolocalización del LBPA durante la eritrofagocitosis .....	137
Figura 19. Inmunolocalización celular del LBPA durante la fagocitosis detectada por microscopía confocal.....	139
Figura 20. co-localización del LBPA y EhRAb7A durante la eritrofagocitosis	142
Figura 21. Co-localización del LBPA, EhADH y Lysotracker Red.....	146
Figura 22. Cuantificación de la asociación de los anticuerpos 6C4, anti-EhADH y el Lysotracker Red durante la fagocitosis.....	148
Figura 23. Interacción del LBPA de E. histolytica y EhADH en condiciones basales y durante la fagocitosis.....	152

Figura 24. Sitios de interacción predichos entre LBPA y EhADH mediante docking molecular .....	158
Figura 25. La mutación in silico del dominio Bro1 abate la interacción de EhADH y LBPA .....	160

## Índice de tablas

Tabla 1. Condiciones experimentales del HPLC .....	84
Tabla 2. Especies moleculares de LBPA en <i>E. histolytica</i> .....	118
Tabla 3. Aminoácidos de EhADH que interaccionan con el LBPA .....	155

## ABSTRACT

Phospholipids are essential for vesicle fusion and fission and both are fundamental events for *Entamoeba histolytica* phagocytosis. Our aim was to identify the lysobisphosphatidic acid (LBPA) in trophozoites and investigate its cellular fate during endocytosis. LBPA was detected by TLC in a 0.5  $R_f$  spot of total lipids, which co-migrated with the LBPA standard. The 6C4 antibody, against LBPA recognized phospholipids extracted from this spot. Reverse phase LC-ESI-MS and MS/MS mass spectrometry revealed six LBPA species of  $m/z$  772.58 to 802.68. LBPA was associated to pinosomes and phagosomes. Intriguingly, during pinocytosis, whole cell fluorescence quantification showed that LBPA dropped 84% after 15 min incubation with FITC-Dextran, and after 60 min, it increased at levels close to steady state conditions. Similarly, during erythrophagocytosis, after 15 min, LBPA also dropped in 36% and increased after 60 and 90 min. EhRab7A protein appeared in some vesicles with LBPA in steady state conditions, but after phagocytosis co-localization of both molecules increased and in late phases of erythrophagocytosis they were found in huge phagosomes or multivesicular bodies with many intraluminal vacuoles, and surrounding ingested erythrocytes and phagosomes. The 6C4 and anti-EhADH (EhADH is an ALIX



family protein) antibodies and LysoTracker merged in about 50% of the vesicles in steady state conditions and throughout phagocytosis. LBPA and EhADH were also inside huge phagosomes. These results evidenced that *E. histolytica* LBPA is associated to pinosomes and phagosomes during endocytosis and suggested differences of LBPA requirements during pinocytosis and phagocytosis. Docking analysis predicted that QEDSKPKK and FYKI polypeptides (94-101 and 224-227 residues, respectively) of EhADH Bro1 domain are involved in the interaction with LBPA, because *in silico* mutation of these polypeptides abolished interaction. These results evidenced the dynamic role of LBPA during endocytosis and showed quantitative differences between pinocytosis and phagocytosis requirements of this phospholipid.

## RESUMEN

Los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* son fagocitos profesionales. La fisión y fusión de la vesículas son eventos fundamentales durante la endocitosis y el fosfolípido ácido liso bis-fosfatídico (LBPA) desempeña un papel importante en estos eventos. El objetivo de este trabajo fue identificar el LBPA de *E. histolytica* e investigar su localización celular durante la endocitosis. En lípidos totales de trofozoítos separados por TLC, se encontró un compuesto con un Rf de 0.50 (fracción "A") que co-migró con el estándar de LBPA. Por otro lado, el anticuerpo contra LBPA de mamífero (6C4), reconoció los fosfolípidos extraídos de la fracción "A". Mediante análisis de LC-ESI-MS fase reversa y MS/MS, se detectaron seis especies moleculares de LBPA de 772.58 a 802.68 *m/z*. La cantidad de fluorescencia intracelular del anticuerpo 6C4 disminuyó un 84% de 0 a 15 minutos de pinocitosis y se restableció a la cantidad mostrada en condiciones basales a los 60 min. Durante la eritrofagocitosis, la disminución del LBPA fue de 36% de 0 a 15 minutos y aumentó un 60% más que en condiciones basales a los 60 y 90 minutos. Utilizando como marcador de endosomas tardíos a la proteína EhRAb7, la co-localización con el anticuerpo 6C4 se observó en cuerpos multivesiculares con varias vacuolas intraluminales, alrededor de eritrocitos ingeridos y en los fagosomas durante tiempos largos de la eritrofagocitosis. De 15 a 120 min de endocitosis, el LBPA co-localizó en 42 y 62% de los pinosomas marcados con dextran-FITC. También, se demostró la asociación del LBPA de *E. histolytica* con la proteína EhADH (miembro de

la familia ALIX) y el LysoTracker, el cual es considerado un marcador de vesículas ácidas; se detectó la co-localización de las tres moléculas en un 50% de las vesículas teñidas y dentro de los fagosomas durante la fagocitosis. Mediante *docking* molecular, se predijo que los polipéptidos QEDSKPKK y FYKI (ubicados en los residuos 94-101 y 224-227, respectivamente) del dominio Bro1 de EhADH, están implicados en la interacción con LBPA, porque la mutación *in silico* de estos polipéptidos abolió la interacción. Estos resultados evidencian el rol dinámico de LBPA durante la endocitosis y mostraron diferencias cuantitativas entre los requerimientos celulares de este fosfolípido durante la pinocitosis y fagocitosis.

# INTRODUCCIÓN

## 1. Epidemiología de la amibiasis

La amibiasis es la infección en humanos causada por el protozoario *Entamoeba histolytica*. Este parásito habita y se multiplica en el intestino grueso y en ocasiones, penetra la mucosa intestinal y se disemina por vía sanguínea a otros órganos, principalmente al hígado y con menos frecuencia al pulmón, cerebro, bazo, riñón, piel y órganos genitales. El mecanismo invasivo es multifactorial y los eventos moleculares que lo producen son desconocidos en su mayoría (Martínez-Palomo 1982).

La amibiasis es una infección cosmopolita y se extiende principalmente en regiones con deficiencias sanitarias, pobreza y malos hábitos higiénicos. Esta enfermedad es más frecuente en regiones tropicales. La contaminación por materia fecal del agua potable y de riego, así como de los alimentos y la diseminación de quistes infectivos por pacientes asintomáticos, son algunos de los factores ambientales más importantes en la transmisión de la amibiasis (Tay 1998).

Actualmente, esta parasitosis es considerada un problema de salud pública ya que afecta a aproximadamente 50 millones de personas por año, y causa hasta 100,000 muertes anuales alrededor del mundo (Ackers and Mirelman 2006). La prevalencia de infección amibiana puede ser hasta del 50% en ciertas regiones de países en desarrollo como América Latina, Asia y África (Smith y Guillen, 2010) .

Esta es una enfermedad que se presenta durante todo el año y la incidencia aumenta durante la primavera y el verano (Trevino Garcia-Manzo, et al. 1994). La mayor prevalencia de la infección intestinal es en niños menores de un año y de edad escolar (Ximénex, et al., 2007). En México, la amibiasis se considera una enfermedad endémica, ya que refleja el rezago en las condiciones higiénicas de la población. Sin embargo, en años recientes se ha observado una tendencia al decremento en el número de casos (Dirección General de Epidemiología-SSA, 2015). En 1997, la Organización Mundial de la Salud, reportó que el 8.3% de la población mexicana era portadora del parásito. El número de casos de absceso hepático amibiano se estimó en 6.77 casos por cada 100,000 habitantes en el año de 1998. Para el año 2002 se reportaron 1,124 muertes por amibiasis en la República Mexicana (Dirección General de Epidemiología-SSA, 2002). En los últimos años, la

tasa de morbilidad ha disminuido considerablemente debido a las campañas antiparasitarias y a la urbanización de las comunidades rurales; sin embargo, el número de nuevos casos de amibiasis llevan a considerar a esta parasitosis como un problema de salud pública vigente; ya que tan solo en el mes de mayo de 2014, se reportaron más de 70,000, siendo el estado de Oaxaca el de mayor incidencia (Dirección General de Epidemiología-SSA, 2014).

## **2. Cuadro clínico de pacientes con amibiasis**

La infección por *E. histolytica* puede ser asintomática cuando sólo se presenta el paso de quistes por el organismo del individuo infectado y los trofozoítos, son incapaces de invadir los epitelios. Los pacientes sintomáticos presentan dolor abdominal ligero, diarrea y algunas veces, disentería. En infantes, se puede presentar el caso de amibiasis fulminante, en el cual hay fiebre, dolor abdominal severo y disentería intensa (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo; 2000). Se sabe que muchas personas aparentemente infectadas con *E. histolytica* nunca presentan síntomas y eliminan quistes espontáneamente. Sin embargo, se estima que el 10% de

los pacientes desarrolla amibiasis invasiva. Se ha propuesto que existen dos especies de *Entamoeba* morfológicamente semejantes pero genéticamente diferentes: *E. histolytica* (patógena) y *E. dispar* (no patógena) (Jacobs, et al. 1998).

El diagnóstico de la amibiasis intestinal se basa en el cuadro clínico y epidemiológico y se confirma mediante la demostración de quistes de *E. histolytica* en heces. El tratamiento consiste en una terapia con antiparasitarios, como el metronidazol y en medidas higiénicas que eviten su propagación (González-Ruiz, 1990).

### **3. Ciclo de vida**

*E. histolytica* presenta dos formas durante su ciclo de vida: el quiste y el trofozoíto (Figura 1). El quiste es la forma infectiva y consiste en una estructura redondeada cuyo tamaño es de 10 a 16  $\mu\text{m}$ , posee de uno a cuatro núcleos y presenta una cubierta gruesa que le otorga propiedades de resistencia, especialmente en climas húmedos (Figura 1 a) (Gómez et al., 2007). El trofozoíto tiene un diámetro de 20 a 40  $\mu\text{m}$  y es móvil debido a que tiene la capacidad de formar pseudópodos; su núcleo presenta un

cariosoma compacto central además de cromatina en gránulos uniformes en tamaño y localización (Figura 1c) (Haque, et al. 2003).

La infección por *E. histolytica* sucede con la ingestión de quistes maduros los cuales contaminan los alimentos y el agua o por medio de manos que tuvieron contacto con heces fecales. Debido a su cubierta externa el quiste no se daña por la acción de enzimas o bien del microambiente que existe en el estómago, pero sí llega a ser reblandecido por los jugos gástricos y pancreáticos. El quiste recorre el tubo digestivo y su desenquistamiento ocurre en el intestino delgado. De un quiste, salen cuatro trofozoítos que se multiplican inmediatamente por fusión binaria y pueden tomar uno de varios caminos:

a) Producir quistes que se eliminan con las heces. El enquistamiento es un proceso aparentemente estimulado por condiciones luminales no ideales para los trofozoítos. Dentro del quiste, continúa el metabolismo y la división nuclear hasta formar cuatro núcleos. Los quistes se eliminan por las heces y pueden sobrevivir días o semanas en el medio externo (Tanyuksel and Petri 2003).



- b) Los trofozoítos pueden ser expulsados del intestino y morir inmediatamente en el medio externo. Esto sucede durante la colitis aguda.
- c) Los trofozoítos permanecen en la luz intestinal (infección no invasiva), en donde el paciente es portador asintomático y eliminador de quistes.
- d) Los trofozoítos pueden atravesar la pared intestinal, llegar al torrente sanguíneo e invadir el hígado, los pulmones, el cerebro y otros órganos (enfermedad extra intestinal) (Haque, et al. 2003); (Valenzuela, et al. 2007).

#### **4. Patogenicidad de *E. histolytica***

La habilidad del trofozoíto de *E. histolytica* para invadir tejidos, así como para evadir la respuesta inmune del huésped, depende de su adaptación al medio y de la expresión de los factores de virulencia.

El tejido principal que destruye *E. histolytica* en su paso por el cuerpo humano es el epitelio del intestino grueso y en menor grado hígado, pulmón, cerebro y piel (Olivos-Garcia, et al. 2009). Las lesiones se caracterizan por una zona central de necrosis, con parásitos conservados

en la periferia y rodeados por un infiltrado inflamatorio de tipo linfocitario y mononuclear (Faust, et al. 2011).

El primer paso en la patogénesis de *E. histolytica* es la adhesión del trofozoíto a la célula huésped (Orozco, et al. 1983); (Laughlin and Temesvari 2005). Poco después de la adhesión, la célula blanco muere (citólisis por contacto) por varios mecanismos, de los cuales sólo se han descrito dos: la permeabilización de ésta por la acción de las proteínas formadoras de poros (amebaporos) que secreta la amiba (Leippe, et al. 2005), y por la inducción de apoptosis (Boettner, et al. 2005).

Otros factores de virulencia que secreta *E. histolytica* son las cisteína proteasas (CPs), las cuales degradan la matriz extracelular provocando la separación lateral de los enterocitos, facilitando la invasión a otros tejidos por la amiba (Ackers and Mirelman 2006). La fagocitosis también juega un papel importante en la patogenia de *E. histolytica*, ya que; las cepas mutantes de amibas deficientes de fagocitosis son incapaces de producir abscesos hepáticos en modelos animales (Orozco, et al. 1983); (Rodriguez and Orozco 1986).

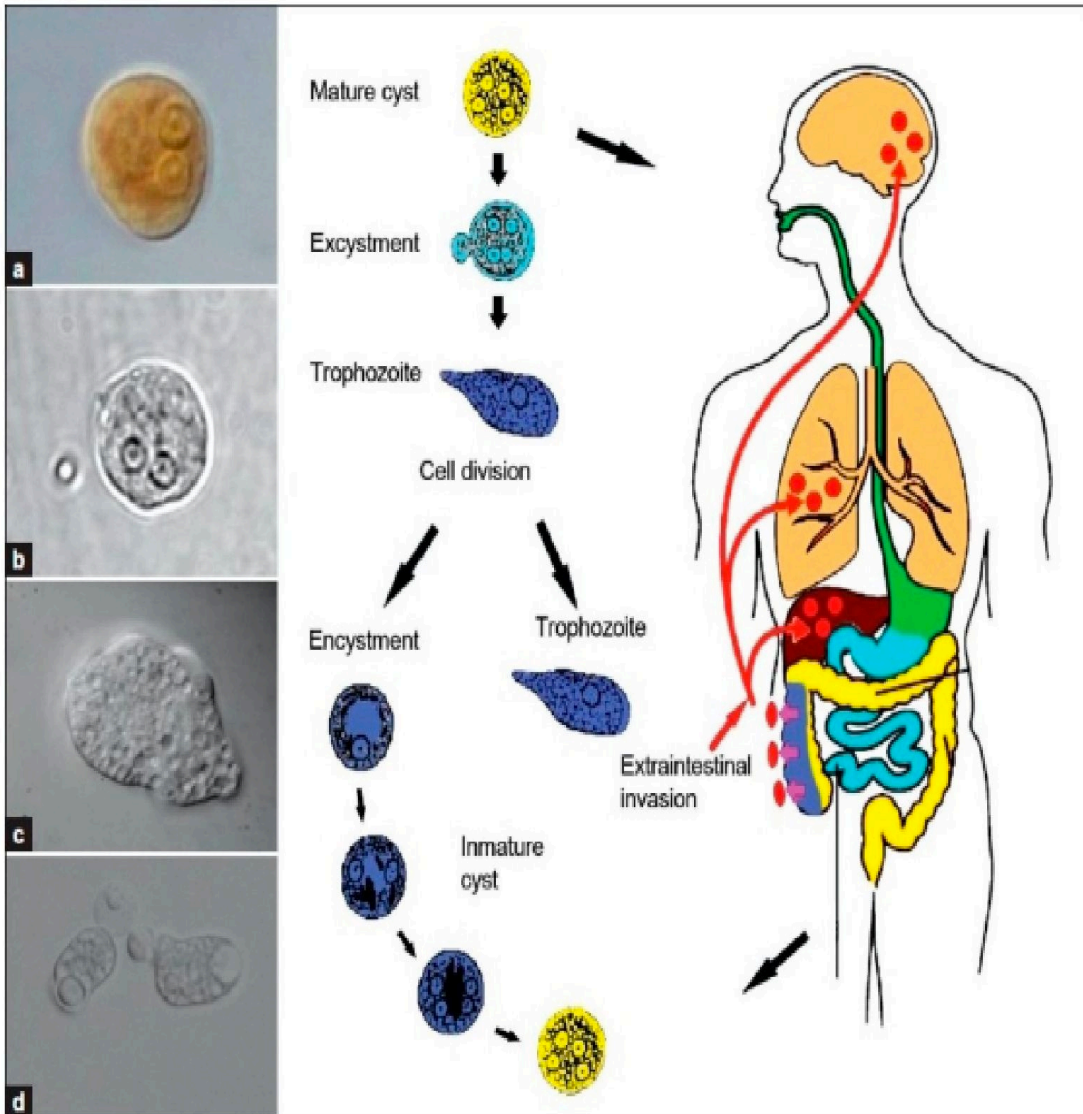


Figura 1. **Ciclo de vida de *E. histolytica***. La infección se inicia con la ingesta de quistes en agua o comida contaminada. El quiste (a) viaja a través del aparato digestivo y lleva a cabo el proceso de exquistación (b) en el intestino dando lugar a los trofozoítos (c), los cuales se reproducen asexualmente en el colon (d). El trofozoíto puede seguir su camino por el colon e iniciar el proceso de enquistamiento para ser posteriormente expulsado en las heces; o bien, puede iniciar el proceso infeccioso y dañar la pared del intestino. En algunos casos, el trofozoíto alcanza la vía hematológica y origina daño en otros órganos, principalmente en hígado.

### *i) Adhesión*

Los trofozoítos de *E. histolytica* tienen la capacidad de unirse a las células del huésped que infectan, al igual que a materiales inertes como plástico (Sengupta, et al. 2009). Después de viajar por el intestino, los trofozoítos colonizan la mucosa del intestino a través del mecanismo de adherencia regulado por lectinas, las cuales se localizan en la superficie celular de los parásitos. La lectina más estudiada es la Gal/GalNac que se une a residuos de galactosa/N-acetil-galactosamina (Gal/GalNac) presentes en la glicoproteína mucina (Allen et al., 1998; (Petri 2002). La lectina Gal/GalNac está compuesta por un heterodímero de 260 kDa formado por una subunidad pesada (170 kDa) y una subunidad ligera (35/31 kDa) unidas por un puente disulfuro, así como por una subunidad intermedia de 150 kDa que se une a la subunidad pesada (Petri, Joyce, et al. 1987; Petri, Smith, et al. 1987) (Tachibana, et al. 2009).

Otra molécula que participa de manera importante en el proceso de adhesión es la adhesina EhADH, que forma parte del complejo EhCPADH (Arroyo and Orozco 1987); (García-Rivera, et al. 1999).

En 1987, Arroyo y Orozco identificaron el complejo EhCPADH en la superficie de los trofozoítos a partir del estudio comparativo entre trofozoítos mutantes deficientes en adhesión y trofozoítos virulentos y el uso de anticuerpos monoclonales (anti-EhCPADH). Las cepas mutantes presentaron baja eficiencia en adhesión a los glóbulos rojos, deficiencia en eritrofagocitosis y en la capacidad de destruir monocapas de células en cultivo. Con estos resultados se concluyó que este complejo está involucrado en el mecanismo de agresión de trofozoítos de *E. histolytica*. En 1999, García-Rivera y colaboradores clonaron y secuenciaron los genes que codifican para este complejo y encontraron dos genes separados por una región no codificante de 188 pb. El primer gen, *Ehcp112*, codifica para una cisteína-proteasa de 50 kDa y el segundo, *Ehadh112*, para una adhesina de 75 kDa (García-Rivera, et al. 1999). Se sugiere que la expresión de ambos genes puede estar co-regulada, ya que el promotor del gen de la adhesina se encuentra en la región 3' del gen la proteasa. Ambos genes se encuentran flanqueados por el gen *EhrabB* (Rodríguez and Orozco 1986); de tal forma, que los tres genes se empalman en una región de 4500 pb conocida como el locus de virulencia VI (Flores-Soto, et al. 2005).

La proteína EhADH contiene tres segmentos transmembranales putativos y cuatro posibles sitios de glicosilación en su extremo amino terminal (García-Rivera et al., 1999), además de un dominio Bro1 en su extremo amino terminal que la ubica en la familia de las proteínas Alix/AIP1 (Bañuelos, et al. 2005); (Banuelos, et al. 2012). En otros sistemas se sabe que éste sitio de fosforilación junto con el dominio Bro1 participan en la transducción de señales y en la endocitosis.

Además de estas proteínas, se han identificado otras moléculas que participan en los mecanismos de adhesión de los trofozoítos, tal es el caso de una lectina inhibida por oligosacáridos de N-acetil-glucosamina, que tiene un peso molecular de 220 kDa (Rosales-Encina, et al. 1987) ;así como la proteína rica en serinas (SHREP) de 52 kDa (Stanley, et al. 1990) y las proteínas de 90, 70, 50 y 25 kDa identificadas por ensayos de ligando (Rodríguez, et al. 1989; Rodríguez, et al. 1989).

## *ii) Citólisis*

Se ha demostrado que los trofozoítos liberan al medio enzimas proteolíticas capaces de destruir monocapas de fibroblastos, colágena, elastina, fibrinógeno y laminina, (Keene, et al. 1990) los cuales son elementos de la matriz extracelular que los trofozoítos deben penetrar para invadir tejidos.

Algunos ejemplos de las enzimas secretadas son EHCP1, EhCP2 y EhCP5, cuya vía secretora está relacionada con la proteína EhRabB11B (Mitra, et al. 2007) y EhCP112 (Ocadiz et a., 2005).

Los trofozoítos de *E. histolytica* también son capaces de matar e ingerir células del huésped en cuestión de minutos de una manera dependiente de contacto. Se han descrito algunos mecanismos efectores citotóxicos que son secretados de forma regulada y dependiente del contacto:

- Cisteína proteasas: estas proteínas son abundantes en *E. histolytica* y actúan en una amplia variedad de sustratos del huésped, además de tener una función en la invasión del tejido y la degradación del moco del epitelio del colon (Ralston and Petri 2011).
- Una de las cisteína-proteasas más estudiadas es la EhCP112 que forma parte del complejo EhCPADH descrito anteriormente. La EhCP112 contiene 446 aminoácidos (aa) y está involucrada en la destrucción celular (García-Rivera *et al.*, 1999). Mediante análisis *in silico* se predijo un dominio RGD de unión a integrinas en su secuencia, un dominio transmembranal y un péptido señal ubicado en los primeros 19 aminoácidos con un sitio de corte entre los residuos



10 y 20 (García.Rivera y col., 1999). Se ha demostrado que EhCP112 tiene actividad proteolítica en geles co-polimerizados con colágena I, fibronectina, hemoglobina y en monocapas de células MDCK (Ocadiz, et al. 2005). Además, se ha demostrado que el silenciamiento de EhCP112 por RNA interferente afecta significativamente la virulencia *in vitro* de *E. histolytica* (Ocadiz-Ruiz et al., 2013).

- Amebaporos: se han descrito tres genes que codifican para tres proteínas formadoras de poros A, B y C, cuya secuencia es similar a proteínas permeabilizadoras de membrana, como NK-lisina y la granulicina de mamíferos (Ralston y Petri, 2011). Los amebaporos forman canales iónicos en la membrana de la célula huésped, por su asociación en oligómeros, similar al componente C9 del complemento y a la perforina de linfocitos T citotóxicos (Leippe 1992).
- Fosfolipasa A: es una enzima ubicada en la membrana plasmática de los trofozoítos y requiere calcio para su actividad. Se ha demostrado que tiene actividad durante el proceso de lisis de las células blanco (Long-Krug, et al. 1985).

- Inducción de apoptosis: se ha visto que posterior al contacto con la amiba, la célula huésped sufre cambios morfológicos y fenotípicos característicos de la apoptosis (Ragland, et al. 1994). Por otro lado, se demostró que los trofozoítos son capaces de inducir apoptosis de una manera dependiente de Fas y Fas I, activando las caspasas 8 y 9, independientemente de la vía de la caspasa 3.(Sateriale and Huston 2011).
- Componentes de vesículas ácidas: el citoplasma de los trofozoítos se caracteriza por tener gran cantidad de vesículas, de las cuales algunas tienen contenidos ácidos (pH 5.4) y participan en la citotoxicidad (Ralston y Petri, 2011).

### ***iii) Fagocitosis***

Los trofozoítos de *E. histolytica* son fagocitos profesionales, ya que tienen una gran capacidad de internalizar una variedad de material particulado e incluso bacterias, células epiteliales y glóbulos rojos (Rabinovitch 1995). Este proceso endocítico tiene un papel importante en el crecimiento y constituye uno de los factores clave en la virulencia de *E. histolytica* (Marion, Laurent, et al. 2005); (Okada and Nozaki 2006). Amibas mutantes

deficientes en su capacidad fagocítica, son defectuosas en la destrucción de cultivos celulares de mamíferos *in vitro*, así como en la formación de abscesos hepáticos *in vivo*, lo cual resalta la importancia de este proceso (Orozco et al., 1983; Orozco et al., 1985; (Rodriguez and Orozco 1986).

Después de la adhesión de los trofozoítos a la célula blanco, el contacto entre receptores y ligandos desencadenan la transducción de señales que induce el remodelamiento del citoesqueleto de la amiba de manera que ésta genera pseudópodos para rodear a la célula blanco, y posteriormente internalizarla y formar el fagosoma (Granin *et al.*, 2001). Los fagosomas se fusionan secuencialmente con otros organelos como los endosomas tardíos y los lisosomas formando los fagolisosomas. Durante este proceso, los fagosomas pierden y adquieren gradualmente proteínas y lípidos (Pitt, et al. 1992).

El proceso de fagocitosis en *E. histolytica* está orquestado por varias moléculas que interaccionan entre sí para regular y efectuar éste proceso (Okada y Nozaki, 2006). También, se involucran algunas estructuras celulares como los microfilamentos amibianos (Guerrant, et al. 1981), componentes del citoesqueleto como miosina 1B y espectrina (Marion, Guillen, et al. 2005); (Voigt, et al. 1999), reguladores de la estructuración

del mismo como GTPasas Rho y RacG (Godbold and Mann 1998); (Haque, et al. 2003), cinasas como EhPAK que controlan la motilidad y fagocitosis de la amiba (Labruyere, et al. 2003), moléculas que regulan la endocitosis como EhRab5, EhRab7 y EhRabB (Saito-Nakano, et al. 2004); (Welter, et al. 2002); (Rodriguez and Orozco 2000) y también, el complejo EhCPADH (Arroyo y Orozco, 1987).

Mediante ensayos de inmunolocalización en una cinética de fagocitosis se demostró que antes de la adhesión del trofozoíto a los eritrocitos, el complejo se localiza uniformemente distribuido en la superficie de las células y en vacuolas citoplasmáticas. Después del contacto del trofozoíto con la célula blanco, las moléculas del complejo EhCPADH rodean a la célula blanco y se internalizan junto con ella en el fagosoma. Finalmente, en tiempos largos de fagocitosis, el complejo se observa nuevamente en la membrana plasmática, lo cual sugiere un reciclaje de éstas moléculas (García-Rivera et al., 1999).

En general, los factores de virulencia de *E. histolytica* implican una dinámica remodelación de sus membranas, tanto la plasmática, como la de sus organelos; sin embargo, el metabolismo de lípidos en este parásito es poco estudiado.

## 5. Los lípidos de *E. histolytica*

Se ha demostrado que la relación lípido/proteína en los trofozoítos es de 1:5; esta alta concentración de fosfolípidos puede ser debido a la capacidad de los trofozoítos de *E. histolytica* para formar membranas (Sawyer, et al. 1967). Con experimentos bioquímicos usando glucosa marcada, se demostró que *E. histolytica* es capaz de sintetizar y elongar ácidos grasos; así como de metabolizar los tomados del medio de cultivo. La composición de ácidos grasos de las membranas de *E. histolytica*, consiste en 59.7% de saturados y el 37.0% de insaturados; la longitud de las cadenas varía, desde 12 hasta 24 carbonos, siendo el más abundante un saturado de 16. También, se han detectado compuestos de 22 carbonos poli-insaturadas sin determinar el número de insaturaciones y varios ácidos grasos que no fue posible identificar, los cuales fueron denominados como W, X, Y y Z (Sawyer et al., 1967).

Se sabe que los trofozoítos son capaces de sintetizar durante seis y ocho horas los fosfolípidos fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA), esfingomielinas (SM), así como las ceramidas etanolaminafosfato (CEP) y ceramida-aminoetilfosfonato (CAEP) (Cerbón y Flores., 1980). Mediante

técnicas de fraccionamiento celular y cromatografía en capa fina de doble dimensión, se encontró la presencia de todos estos fosfolípidos en la plasmática de trofozoítos, así como en las membranas de las vesículas internas. También, con estos experimentos se aislaron dos fosfolípidos no identificados, los cuales se denominaron X y Y (Aley, et al. 1980). Las membranas de las vesículas internas de los trofozoítos cuentan con altas concentraciones de fosfatidilcolina (Aley et al., 1980), en contraste, la membrana plasmática está enriquecida con, fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PI(3,4,5)-P<sub>3</sub>) (Byekova, et al. 2010), fosfatidiletanolamina y las ceramidas CAEP y CEP (Aley et al., 1980; Cerbon y Flores., 1980).

Esta alta proporción de CAEP es inusual en membranas de células de mamífero. A diferencia de otros fosfolípidos, las ceramidas CEP y CAEP tienen dos grupos que aceptan o donan protones; lo cual sugiere que estas moléculas tienen mayor capacidad de interacción con otros fosfolípidos y proteínas. También, CAEP es un fosfolípido resistente a la hidrólisis de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, por lo que resulta importante su presencia en la membrana plasmática del parásito para los mecanismos citotóxicos que desarrollan los trofozoítos, y a su vez, como elemento de autoprotección contra las potentes hidrolasas que secreta.

Por otro lado, en la membrana plasmática de los trofozoítos, el ratio colesterol:fosfolípidos es de 0.87 y en las membranas de las vesículas internas es de 0.30 (Aley *et al.*, 1980). Sin embargo, se sabe que *E. histolytica* tiene un metabolismo limitado para sintetizar el colesterol; el cual es tomado del medio de cultivo por los trofozoítos e incorporado a sus membranas para realizar sus funciones celulares y de virulencia. Existen evidencias experimentales sobre el aumento de varios procesos bioquímicos celulares relacionados con la virulencia de la amiba, cuando los trofozoítos se cultivan con altas cantidades de colesterol (Bos and van de Griend 1977); (Katiyar, *et al.* 1987). Este mismo fenómeno se observa cuando las células se alimentan con liposomas de fosfatidilcolina/colesterol (Serrano-Luna, *et al.* 2010).

Con toda esta información, se ha inferido que *E. histolytica* tiene una vía metabólica que le permite sobrevivir, multiplicarse y aumentar su virulencia al tomar los nutrientes del huésped. Los mecanismos de endocitosis involucran una participación dinámica de los lípidos. Se ha demostrado que las balsas lipídicas resistentes a detergentes, las cuales son ricas en colesterol y se ubican en la membrana plasmática de los trofozoítos, son

importantes en la endocitosis de fluidos, proceso conocido como pinocitosis (Laughlin, et al. 2004).

Además, se sabe que los compuestos fosforilados del fosfatidilinositol (PI), tales como el PI(3,4,5)-P<sub>3</sub> y el fosfatidilinositol 3-fosfato (PI(3)P), son esenciales esencial para la fagocitosis, uno de los principales factores de virulencia de *E. histolytica*. Ambos fosfolípidos se acumulan en los pseudópodos y bocas fagocíticas que proyectan los trofozoítos alrededor de los eritrocitos sugiriendo su participación en la formación del fagosoma (Powell, et al. 2006); (Byekova *et al.*, 2009).

En general, la pinocitosis y la fagocitosis son mecanismos endocíticos que involucran una remodelación dinámica de membranas y eventos de tráfico vesicular; sin embargo, la participación de los lípidos en el tráfico vesicular de *E. histolytica* ha sido poco estudiada.

## **6. Tráfico vesicular en *E. histolytica***

En una célula eucarionte, el sistema endomembranoso consiste en el conjunto de membranas en el citoplasma que divide a la misma en compartimientos estructurales y funcionales u organelos. Este sistema está



compuesto por la membrana nuclear, el retículo endoplasmático, aparato de Golgi, endosomas y lisosomas, y es responsable de la biosíntesis y transporte de lípidos y proteínas (Field and Dacks 2009).

El tráfico de proteínas a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi es un mecanismo relacionado con la patogénesis debido a la gran cantidad de factores secretados por parásito para generar la muerte celular, la invasión de tejidos y el promover la inflamación en el huésped (Smith y Guillen, 2010). Sin embargo, estos dos compartimientos celulares que involucran el tráfico vesicular no han sido bien caracterizados en *E. histolytica*.

Por otro lado, el movimiento característico de los trofozoítos, depende del movimiento interno de vesículas hacia la membrana plasmática; un proceso que se propone participa en la formación de pseudópodos, proporcionando una fuente de membrana de superficie celular o bien, una fuente de moléculas que participan en la adhesión celular, necesarias para la unión a las células blanco. También, la secreción de cisteína proteasas en lisosomas y fagosomas para desintegrar sustancias internalizadas por la amiba, está relacionada con el evento de tráfico vesicular (Okada *et al.*, 2006)

En relación a la fagocitosis, el tráfico membranal es esencial para la maduración del fagosoma, y este proceso está regulado por proteínas de tipo Rab. Las proteínas Rab son GTPasas que actúan como interruptores para controlar la fusión de vesículas con las membranas blanco, a través de cambios conformacionales entre las formas activa (unida a GRTP) e inactiva (unida a GDP) (Takai, et al. 2001).

Como se describió anteriormente, la proteína EhRabB forma parte del locus de virulencia VI y también se ha visto localizada en el tráfico vesicular de la amiba, ya que es translocada durante el proceso de eritrofagocitosis (Rodriguez y Orozco, 2000); al igual que la proteína EhADH, la cual, contiene un dominio Bro1 y es miembro de la familia Alix (García Rivera *et al.*, 1999; Banuelos *et al.*, 2012).

En el genoma de *E. histolytica* se han identificado alrededor de 90 proteínas Rab putativas con homología a algunas de humano y entre ellas. Se han descrito al menos nueve isotipos de Rab7, las cuales fueron identificados en la fracción endosomal y en fagosomas aislados (Okada et al. 2006; Saito-Nakano *et al.*, 2004). Además, EhRab5 y EhRab7 son esenciales para la fagocitosis eficiente en la amiba y a su vez, existen varios isotipos para cada una de ellas que podrían estar participando en conjunto durante los

eventos endocíticos. La proteína EhRab7A, regula la fusión de vesículas con endosomas tardíos y aparato de Golgi (Nakada-Tsukui et al. 2005); EhRab7B controla la fusión de vesículas con los lisosomas (Saito-Nakano, et al. 2005; Saito-Nakano, et al. 2007; Saito-Nakano, et al. 2004). Se ha demostrado que el 20% de vesículas teñidas con anticuerpos anti-EhRab7B co-localiza con EhRab7A (Saito-Nakano et al. 2007).

## 7. Las proteínas de la familia Alix

El dominio Bro1 se encontró primeramente en el extremo amino terminal de la proteína Bro1p de *Sacharomyces cerevisiae*. La proteína Bro1p es una molécula adaptadora que participa en la formación de los cuerpos multivesiculares (Gruenberg and Stenmark 2004). Bro1p recibe su nombre por darle a las células resistencia al choque osmótico (de las siglas en inglés *BCK1-like resistance to osmotic shock*). *bck1* es un gen que codifica para una proteína homóloga a la proteína cinasa C (PKC) (Nickas and Yaffe 1996).

Las proteínas Alix son homólogas a la proteína Bro1p en células de mamíferos, reciben este nombre por las singlas en inglés *ALG-2 interacting*

*protein X*. También se conocen como AIP1 por las siglas ALG-2 interacting protein 1. La proteína ALG-2 (*apoptosis linked gene 2*) de ratón se une al calcio y es requerida por los receptores de las células T y el receptor FAS para inducir la muerte celular (Vito, et al. 1999). ALG-2 está clasificada dentro de la familia de las calpaínas o de la familia de las PEF (*penta-EF-hand*) (Maki, et al. 2002). Las calpaínas son cisteín proteasas dependientes de  $Ca^{+2}$  y están involucradas en varias reacciones fisiológicas y patológicas relacionadas con la movilización del ion calcio

Las proteínas homólogas a Bro1p se han identificado en varios organismos y los dominios que conforman su estructura son altamente conservados a lo largo de la escala evolutiva (Figura 2). En el extremo amino terminal tienen un dominio Bro1. Aproximadamente hacia el aminoácido 320, se encuentra un sitio de fosforilación para Scr cinasas, ambos participan en la transducción de señales. A lo largo de su secuencia se presentan dos o más dominios *coiled coil* que participan en la interacción con otras proteínas. El extremo carboxilo terminal de este tipo de proteínas es un sitio blanco de interacciones con diferentes moléculas y en algunas, se encuentra un dominio rico en prolinas (Odorizzi, 2006). Este dominio no está presente en EhADH (Bañuelos, et al. 2005); sin embargo, se extremo C terminal se

considera como el dominio de adhesión a células blanco (Martínez-López, et al. 2004) y además, esta proteína se localiza en organelos semejantes a los MVB (Banuelos, et al. 2012).

Se sabe que las proteínas Bro1p, Rim20p, PalA, ALIX, Dd-ALIX (todas ellas homólogas) se asocian con los endosomas y con el complejo ESCRT-III (por sus siglas en inglés Endosomal Sorting Complex Required for Transport), el cual es parte de la maquinaria necesaria para la formación de cuerpos multivesiculares (MVB) del inglés (multivesicular bodies) durante la vía endocítica.

## Proteínas de la familia ALIX

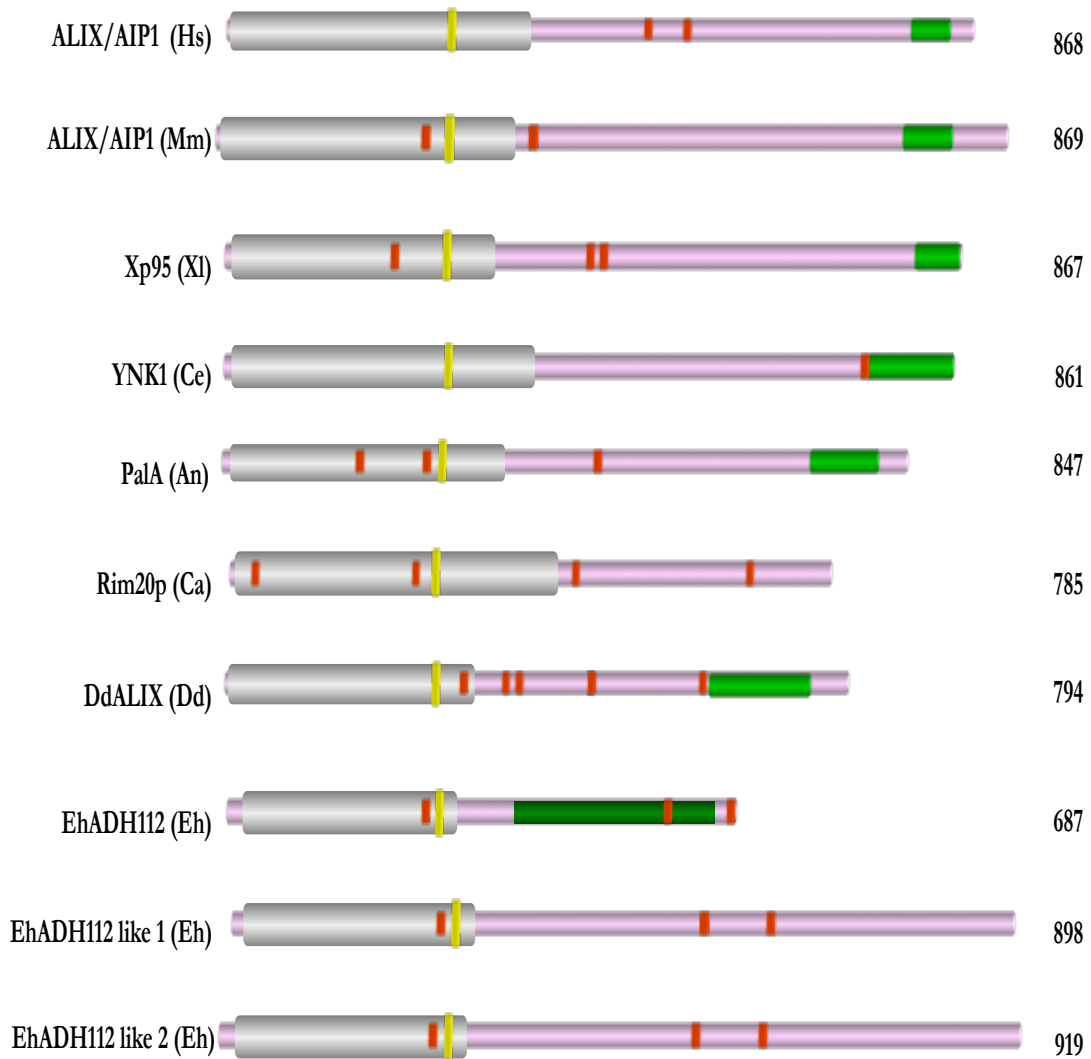


Figura 2. Estructura conservada de los miembros de la familia ALIX. Las características estructurales se indican: Dominio Bro1 (gris) hacia el amino terminal. Sitio consenso de fosforilación (KNNNNIYM) (naranja). Regiones *coiled-coil* (rojo). En el extremo carboxilo terminal algunas proteínas tienen un dominio rico en prolinas (PXXP) (verde). En verde oscuro, el dominio de adhesión de EhADH112. Cada proteína está denotada por su nombre particular y enseguida, se abrevia la especie del organismo donde se encontró: Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; An, *Aspergillus nidulans*, Ca, *Candida albicans*; Dd; *Dictyostelium discoideum*; Eh, *Entamoeba histolytica*. (modificado de (Bañuelos, et al. 2005).

## 8. La vía endocítica

La endocitosis en general, es un proceso necesario para la supervivencia celular, ya que es el mecanismo por el cual la célula capta nutrientes del medio, se estimula la señalización intracelular, se lleva a cabo el remodelamiento lipídico de las membranas, se mantiene la polaridad celular y en células de mamífero, ocurre la presentación de antígeno (Gruenberg and Stenmark 2004).

La endocitosis es el fenómeno mediante el cual las células pueden internalizar porciones de su membrana lipídica junto con las proteínas embebidas con ella o moléculas del espacio extracelular, comúnmente llamadas moléculas cargo (Figura 3).

Dicha internalización, puede ser a través de varias vías, incluyendo las rutas de entrada mediante vesículas que se fusionan con el endosoma temprano, las cuales pueden ser recubiertas de clatrina, caveolina o bien, vesículas sin cubierta (Conner and Schmid 2003).

La membrana plasmática cuenta con una composición lipídica rica en fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PI(4,5)P<sub>2</sub>); la cual, se remodela de manera dinámica durante la endocitosis. Al formarse el endosoma temprano, este



fosfolípido se desfosforila formándose el PI3P. El endosoma temprano tiene un pH de 6.2 que favorece la separación de los receptores constitutivos de sus ligandos. En este paso, algunas moléculas son recicladas directamente hacia la membrana plasmática a través de endosomas de reciclaje (RE) (Maxfield and McGraw 2004).

La mayoría de los receptores de membrana que participan en la señalización, necesitan ser reguladas negativamente, es decir, ser internalizados para suspender su actividad de transducción de señales. Estos receptores son ubiquitinados para ser internalizados en pequeñas vesículas en el lumen del endosoma. En este estado, los endosomas intermedios son conocidos como cuerpos multivesiculares (MVB). La formación de los MVB está orquestada por el complejo de proteínas ESCRT (Gruenberg and Stenmark 2004). Los MVB tienen un diámetro de 0.4-0.5  $\mu\text{m}$  aproximadamente; el diámetro de las vesículas intraluminales es de 50-800 nm. La composición de sus membranas tiene altas cantidades de PI(3)P (Gruenberg and Maxfield 1995). Estos organelos se acidifican rápidamente hasta lograr un pH aproximadamente de 5.5 mientras viajan a través de los microtúbulos para llegar a los endosomas tardíos, los cuales se localizan en la región perinuclear.

Los endosomas tardíos son organelos de 0.5-1.0  $\mu\text{m}$  con un pH entre 5.0-5.5, pleomórficos y tienen regiones en forma de cisternas tubulares, zonas multivesiculares de distintas subpoblaciones vesiculares y dominios de composición lipídica específica, como es el caso de la zona multivesicular rica en el fosfolípido ácido liso bis-fosfatídico (LBPA) (Gruenberg 2001); (Gruenberg 2003); (Russell, et al. 2006). Estos organelos también tienen la función de direccionar a las moléculas hacia el aparato de Golgi para reciclaje o hacia el lisosoma para degradación (Maxfield and McGraw 2004); (Gruenberg 2001).

El lisosoma tiene la función principal de degradar los lípidos y proteínas celulares. Para llevar a cabo tal función, estos organelos contienen gran cantidad de hidrolasas que son transportadas en forma inactiva a través de la vía biosintética y son activadas proteolíticamente una vez que llegan a esta estructura. En algunas células, el endosoma tardío se fusiona con la membrana plasmática; por ejemplo, las células dendríticas maduras que transportan el complejo de histocompatibilidad tipo II, que liberan las vesículas luminales (en este caso llamadas exosomas) del endosoma hacia el espacio extracelular (Trombetta and Mellman 2005). También, los linfocitos T citotóxicos que secretan lisosomas (Stinchcombe, et al. 2004).

# La vía endocítica

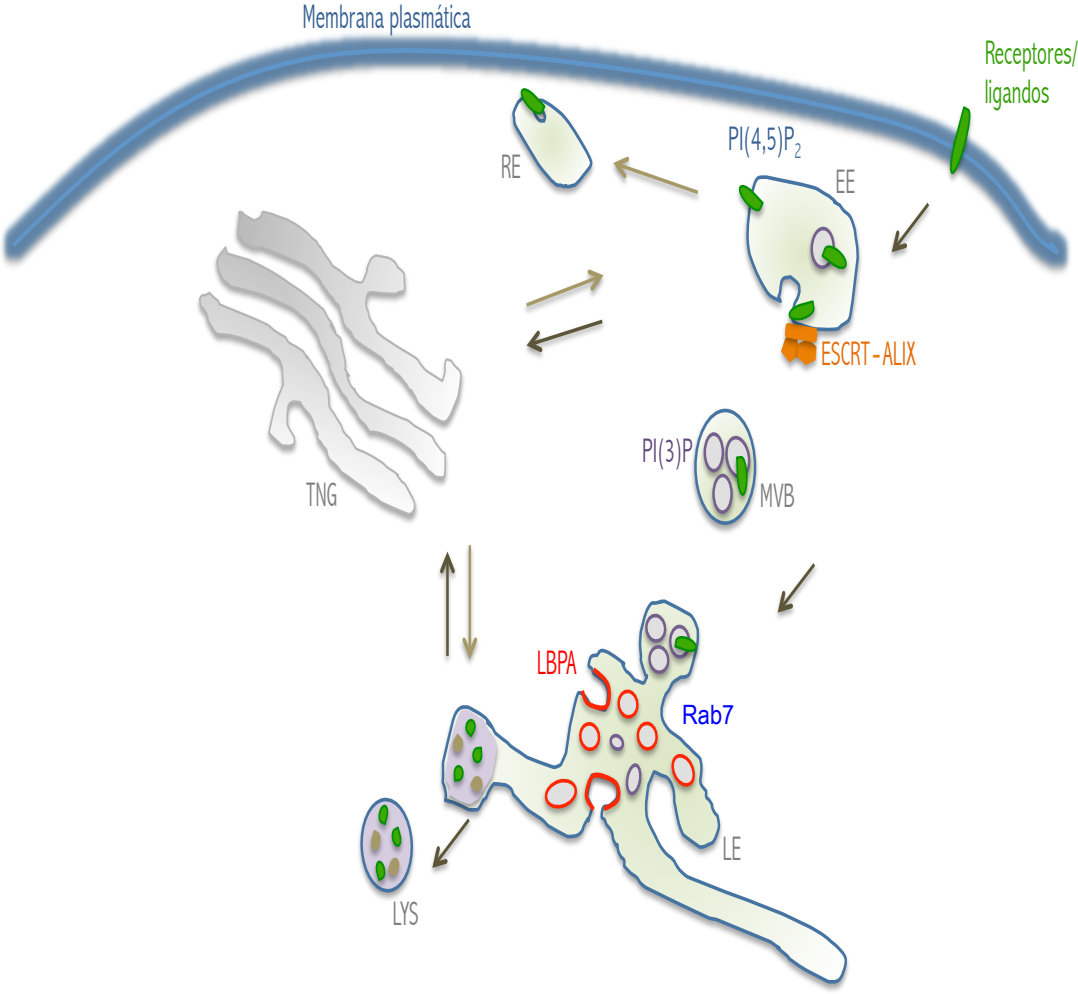


Figura 3. **La vía endocítica.** Las proteínas cargo ubicadas en la membrana plasmática son internalizadas a los endosomas tempranos (EE), las cuales, pueden ser recicladas directamente a la membrana plasmática. Los receptores involucrados en la señalización que necesitan ser regulados negativamente, son internalizados en vesículas luminales del endosoma formando los MVB a través de la maquinaria ESCRT. Los MVB se fusionan con el endosoma tardío, en donde las moléculas cargo pueden ser recicladas a través del aparato de Golgi, transportadas a otros destinos celulares, o bien, ser degradados en el lisosoma.

## 9. Formación de los cuerpos multivesiculares y la maquinaria ESCRT

El proceso de formación de MVB requiere la acción secuencial de varios complejos proteicos denominados ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III y una serie de moléculas accesorias que se ensamblan de manera coordinada (Raiborg, et al. 2003); (Katzmann, et al. 2002). Mediante análisis genómico y proteómico, se identificó en levadura un grupo de 21 proteínas Vps clase E (por sus siglas en inglés vacuolar protein sorting) que integran la maquinaria endosomal requerida para el transporte ESCRT (Babst 2005; Katzmann, et al. 2001).

Las proteínas Vps clase E participan en la formación de compartimientos endosomales, de ahí que se les llama de la clase E (Raymond, et al. 1992). En un inicio, las proteínas Vps se identificaron en diferentes vesículas por lo que se les dio una denominación según la morfología de los compartimientos en los que fueron encontradas. Varios estudios demuestran que al mutar alguna de estas proteínas Vps clase E en levadura, se generan defectos en la vía endocítica, en la estructura de los endosomas, en el direccionamiento de proteínas hacia el lumen endosomal y

en la formación de las vesículas internas endosomales (Odorizzi, et al. 1998b);(Raymond, et al. 1992).

Las células de mamífero cuentan con proteínas homólogas a la mayoría de las Vps de levadura. El complejo ESCRT-0 está constituido por las subunidades Vps27 y Hse; en mamíferos, las proteínas homólogas son Hrs y STAM (Bache, et al. 2003). El complejo ESCRT-I se forma con las moléculas Vps23, Vps28, Vps37 y Mvb12. En células de mamífero, las proteínas homólogas se conocen como Tsg101, Vps28 y Vps37 respectivamente (Babst, et al. 2002). Las subunidades Vps22, Vps25, Vps36 forman el complejo ESCRT-II (Babst, et al. 2002).

En mamíferos, el complejo II está formado por las subunidades homólogas Eap30, Eap25, Eap45. La denominación Eap proviene de las siglas en inglés *Ell-associated proteins*, ya que estas moléculas también interaccionan con el factor de alargamiento Ell de la RNA polimerasa II (Kamura, et al. 2001).

Vps2, Vps20, Vps24, SNF7 son las proteínas que forman el complejo ESCRT-III de levadura; las moléculas homólogas en mamíferos son CHMP2, CHMP6, CHMP3 y CHMP4 respectivamente (Babst, et al. 2002) La denominación CHMP4 proviene de Chromatin-Modifying Protein (Stauffer, et al. 2001) o Charged Multivesicular Protein (Strack, et al. 2003).

Existen evidencias tanto bioinformáticas como experimentales de la presencia de una maquinaria ESCRT incluyendo las proteínas accesorias en el genoma de *E. histolytica*, sugiriendo un mecanismo de formación de los MVB similar al descrito en mamíferos (Lopez-Reyes, et al. 2010). En estudios bioinformáticos en este parásito, se encontraron 19 genes que codifican para las proteínas del complejo ESCRT y sus accesorias con un porcentaje de similitud entre 20 y 60% con las proteínas de humano y levadura y además, la secuencia de estas proteínas contienen los dominios funcionales característicos de los factores ESCRT de otros sistemas (Lopez-Reyes, et al. 2010). Al analizar la expresión del ARN mensajero de 16 de estos genes de *E. histolytica* en condiciones basales y durante 5 minutos de la eritrofagocitosis, se observó el transcrito de 15 de ellos. De los cuales, 13 mantienen constante su expresión en las dos condiciones, mientras que los genes *Ehvps23* y *Ehadh112* incrementaron su expresión durante la fagocitosis.

En relación a la expresión de las proteínas de las subunidades de los complejos ESCRT-0, ESCRT-I y ESCRT-II, a la fecha no existen otros reportes. Sin embargo, mediante anticuerpos policlonales se detectó la

expresión de las cuatro subunidades del complejo ESCRT-III (EhVps2, EhVps20, EhVps24 y EhVps32) (Avalos y Orozco, datos no publicados). Mediante microscopía confocal en trofozoítos fijados, se demostró que en condiciones basales estas proteínas se encuentran difusas en el citoplasma, EhVps32 y EhVps20 co-localizan con el fagosoma a los cinco minutos de la fagocitosis de eritrocitos; en contraste EhVps2 y EhVps24 se localizan principalmente en núcleo (Avalos-Padilla, et al. 2015).

En general, durante la formación de los MVB, la maquinaria ESCRT se va ensamblando poco a poco en la membrana de los endosomas (Figura 4). El complejo ESCRT-0 se estabiliza en la membrana endosomal a través del fosfoinositol-3-fosfato (PI(3)P), en el caso de los mamíferos, este complejo también se une a clatrina. A su vez, el complejo ESCRT-0 interacciona con la proteína cargo ubiquitinada a través de los dominios UIM (por sus siglas en inglés *Ubiquitin-interacting motif*).

Una vez que se estabiliza el complejo ESCRT-0 en la membrana del endosoma tardío; éste recluta al complejo ESCRT-I, el cual direcciona a la proteína cargo a lo largo de la membrana del endosoma a través de la interacción de ésta con los dominios de unión a la ubiquitina UEV de la subunidad Vps23 (Katzmann, et al. 2001). El direccionamiento de la



proteína cargo continúa al integrarse al conjunto proteico el complejo ESCRT-II, la subunidad Vps36 de este complejo interacciona con la molécula cargo a través del dominio de unión a ubiquitina. Finalmente, se une el complejo ESCRT-III formando un gran polímero sobre la superficie de los endosomas que junto con otros factores asociados inducen la invaginación de la membrana endosomal. Los cuatro complejos ESCRT interaccionan entre sí (Katzmann, et al. 2002); (Raiborg, et al. 2003). Se sabe que las proteínas del complejo ESCRT-III interaccionan y viajan a través de los filamentos del citoesqueleto a través de los dominios de unión de interacción con microtúbulos MIM (por sus siglas en inglés, *microtubule interacting motif*) y MIT, por sus siglas en inglés *microtubule interacting and trafficking domain*).

La proteína ALIX funciona como adaptadora en el proceso de la formación de los MVB, ya que datos obtenidos de estudios con células de mamíferos sugieren que ésta juega un papel importante al ligar a ESCRT-I y ESCRT-III (Von Schwedler, et al. 2003). Mediante ensayos tipo *pull down*, se encontró que el dominio Bro1 de la proteína Bro1p, interacciona con la proteína SNF7 (también conocida como subunidad Vps32 del complejo ESCRT-III) (Kim, et al. 2005). Una vez que la proteína Bro1p se estabiliza en el endosoma, sirve

de adaptadora para reclutar a otro tipo de moléculas (Odorizzi, et al. 2003). La capacidad de interacción entre el dominio Bro1 y la proteína SNF7 se conserva en las proteínas con dominio Bro1 en varios organismos. En mamíferos, el homólogo a SNF7 es CHMP4 (Kato, et al. 2004).

También se sabe que en *E. histolytica*, la adhesina EhADH, que es la proteína homóloga a ALIX, interacciona con la proteína EhVps32 (Banuelos, et al. 2012), sugiriendo una función similar a la de sus homólogos. Como ya se mencionó anteriormente, EhADH está involucrada en la adhesión y fagocitosis de la ameba (Arroyo and Orozco 1987); (García-Rivera, et al. 1999), lo cual nos permite inferir que la participación de esta proteína en la vía de los MVB regula dichos mecanismos patogénicos.

Durante el proceso de formación de MVB, las proteínas que interaccionan con la ubiquitina lo hacen con baja afinidad permitiendo una reacción reversible. En levaduras, la proteína Doa4, también llamada UBP4, es la enzima desubiquitinasa que participa en la eliminación de la ubiquitina de las proteínas cargo antes de que se formen las vesículas internas y así reciclar a la ubiquitina para el siguiente ciclo. Sin embargo, algunas proteínas cargo llegan a las vesículas internas del cuerpo multivesicular en presencia o ausencia de Doa4 (Reggiori and Pelham 2001).

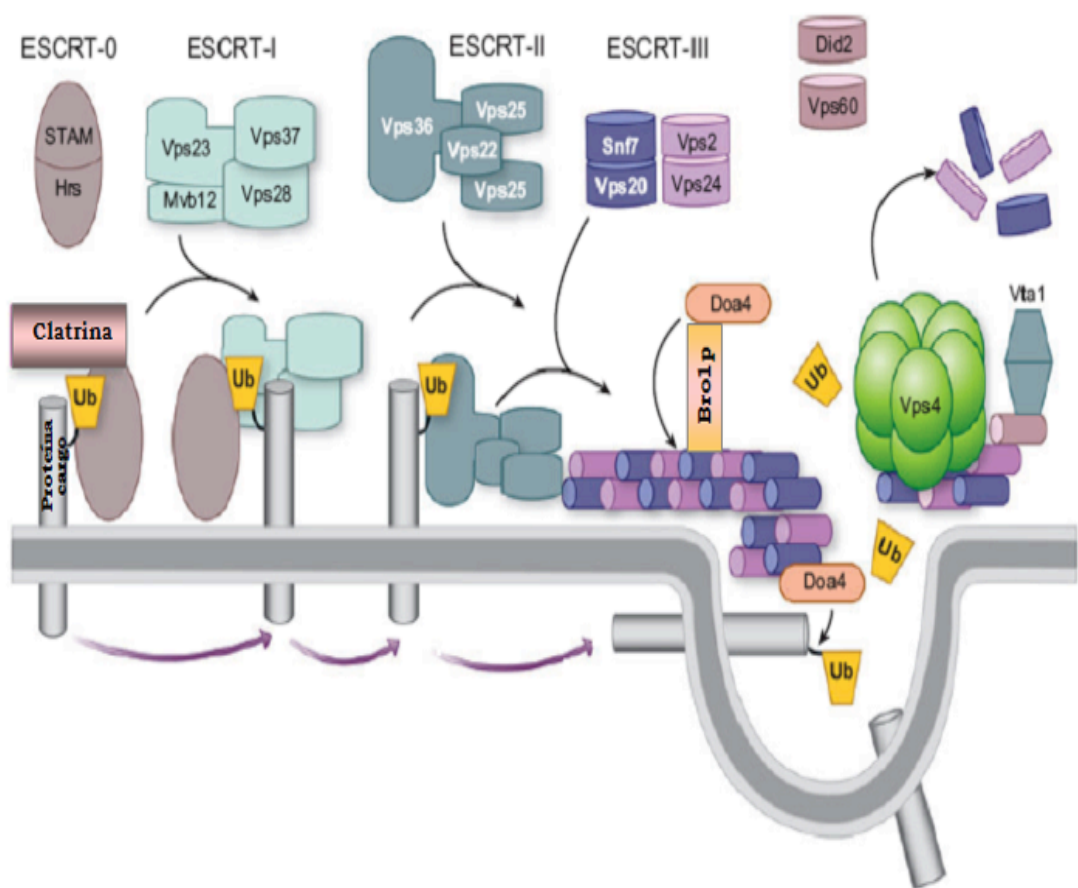
La proteína Vps4 es la AAA ATPasa vacuolar que disocia a los cuatro complejos de la membrana para que todas las subunidades que conforman el polímero se reciclen (Babst, et al. 1998); (Bowers, et al. 2004). La proteína Vps4 tiene un dominio de interacción con los microtúbulos MIT mediante el cual se asocia a los endosomas (Scott, et al. 2005). Mediante ensayos de interacción proteína-proteína *in vitro* y por ensayos de doble híbrido se determinó la interacción de Vps4 con varias subunidades de la maquinaria ESCRT (Yeo, et al. 2003); (Ito, et al. 2001). Una vez estabilizada Vps4 en el endosoma, esta enzima interactúa con la proteína Bro1p, sin embargo, Bro1p es desplazada por el ATP (Vajjhala *et al.*, 2007) que se une a la proteína Vps4 para formar un anillo oligomérico (Babst, et al. 1998). En seguida, una molécula llamada Vta1p interacciona con la enzima Vps4 y estimula su actividad de ATPasa (Vajjhala, et al. 2007); (Azmi, et al. 2006; Lottridge, et al. 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que la molécula EhVps4 se expresa en trofozoítos de *E. histolytica* y que ésta podría tener la función catalítica que le permitiera disociar el complejo ESCRT. También, se mostró que amibas transfectadas con una mutante en la región catalítica de EhVps4, tienen una baja capacidad de virulencia, sugiriendo un papel importante de esta

proteína en la patogenicidad de este parásito, particularmente en los procesos endocíticos (Lopez-Reyes, et al. 2010).

A pesar de tener todos los conocimientos anteriores, no se sabe cómo se forman las vesículas internas endosomales. Se sugiere que la interacción de la maquinaria ESCRT-III con los filamentos genera la formación y constricción de una espiral en la membrana, promoviendo la fisión de las vesículas en el interior del endosoma.

Por otro lado, el remodelamiento y formación de micro dominios de lípidos juega un papel importante durante la biogénesis de MVB y la vía endocítica en general, ya que es necesario generar una membrana resistente a las hidrolasas. Hasta el momento, se consideran tres lípidos involucrados en la organización de subdominios y la formación y degradación de vesículas: el PI(3)P, el colesterol y el ácido liso *bis*-fosfatídico (LBPA).



**Figura 4. Representación esquemática de un modelo de la función del complejo ESCRT.** El complejo ESCRT-0 interacciona con el PI(3)P y recluta a los subdominios de clatrina para reclutar al complejo ESCRT-I, que a su vez recluta el complejo ESCRT-II y en sucesión llega el ESCRT-III para formar un polímero sobre una región rica en traspanina y esfingolípidos de la membrana endosomal. La proteína cargo ubiquitinada es direccionada de manera secuencial a través de cada complejo. Posteriormente se reclutan Bro1, Doa4 y Vps4, la ubiquitina es disociada de la molécula cargo e inmediatamente la maquinaria se desensambla de la membrana para ser reciclada en el siguiente ciclo. La formación de vesículas internas está catalizada por la interacción de la proteína cargo con las tetraspaninas y por la modificación de lípidos para formar la curvatura de la membrana (Modificado de (Piper and Katzmann 2007)).

## 10. Participación de los lípidos en la vía endocítica

La diferencia funcional y morfológica de los endosomas durante la vía endocítica, también se ve reflejada en la composición lipídica de los organelos. Por un lado, el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P<sub>2</sub>) participa en la formación de vesículas cubiertas de clatrina en la membrana plasmática (Jost, et al. 1998). El PI(3)P se involucra en la formación de endosomas tempranos y a su vez, el LBPA, también conocido como bismonoacil-glicerolfosfato (BMP) está relacionado con el endosoma tardío (Gruenberg 2003).

Otro lípido con importancia funcional en los endosomas es la fosfatidilserina (PS), el cual se encuentra enriquecido en los endosomas tempranos y en la cara citoplasmática de la membrana plasmática. También está presente el fosfatidilinositol 3,5-bifosfato (PI(3,5)P<sub>2</sub>), sin embargo su distribución celular no está determinada (Gagescu, et al. 2000; Leventis and Grinstein 2010; Shisheva 2008). La composición lipídica de las membranas favorece las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína generando microambientes y plataformas especializadas esenciales para la arquitectura y función de los organelos (Gruenberg 2001).

### *i) Los lípidos en los endosomas tempranos*

El PI(3)P se encuentra enriquecido en la membrana de los endosomas tempranos y en las vesículas intraluminales (ILV, por sus siglas en inglés intraluminal vesicles) de los MVB; en endosomas tardíos, disminuye significativamente, lo cual sugiere que este lípido es susceptible a la actividad de las fosfatasa.

Algunas de las proteínas que forman la maquinaria ESCRT interactúan con este lípido a través de dominios específicos de unión a PI(3)P, tales como el dominio FYVE y PX (Odorizzi, et al. 1998a). El dominio FYVE fue nombrado de acuerdo a la primera letra del nombre de las cuatro proteínas en las cuales se descubrió: Fab1p, YOTB; Vac1, EEA1 (Stenmark, et al. 1996). Por otro lado, el dominio PX se describió por primera vez en dos subunidades de una oxidasa en neutrófilos: p20<sup>phox</sup> y p57<sup>phox</sup> (Ellson, et al. 2001) y en proteínas de la familia SNX (Worby and Dixon 2002).

El PI(3)P es generado en los endosomas tempranos por la acción de Vps34, la cual es una cinasa de PI3 (Schu, et al. 1993); (Shin, et al. 2005) y su formación está controlada directamente por Rab5, que funciona como una proteína efectora de Vps34. Además, existen otras proteínas que tienen el dominio FYVE, tales como el antígeno 1 de endosomas tempranos (EEA1)



que son reclutados en la membrana del endosoma temprano a través del PI(3)P y están involucrados en la fusión de endosomas (Nielsen, et al. 2000); (Simonsen, et al. 1998).

La proteína SNX3 (por sus siglas en inglés *sorting nexin 3*) interacciona con el PI(3)P a través del dominio PX (Xu, et al. 2001). Dicha interacción se requiere para la formación de las vesículas intraluminales del endosoma y la fusión de membranas, pero no es indispensable para la regulación negativa de los receptores. En contraste, la proteína Hrs participa en el direccionamiento de moléculas hacia el lisosoma, y no está involucrada en la formación de los MVB (Pons, et al. 2008). Además, se sugiere que el PI(3)P junto con las proteínas efectoras forma parte del complejo que media el transporte retrógrado de proteínas desde el endosoma hacia el aparato de Golgi en su región *trans* para su reciclaje (Attar and Cullen 2010).

El PI(3)P es metabolizado formando el fosfatidilinositol-(3,5)-bifosfato (PI(3,5)P<sub>2</sub>) a través de acción de la PI(3)P-5 cinasa Fab1 en levaduras (Odorizzi, et al. 1998b); en mamíferos, el homólogo de esta enzima es PIKfyve (Sbrissa, et al. 2002). La síntesis de este fosfolípido se lleva cabo en los endosomas tempranos y está presente en los pasos tardíos de la vía

endocítica, sin embargo, su distribución y función específica no están determinadas.

Por otro lado, el colesterol y las proteínas de unión a colesterol también participan en la vía endosomal. La proteína Annexina A2 se une a los endosomas de manera dependiente de colesterol y dicha interacción, juega un papel importante en la formación y fisión de los MVB sin afectar la formación de las vesículas intraluminales (ILV) (Pichler and Riezman 2004). También, Annexina A2 se une a actina, la cual regula el proceso de formación del endosoma (Morel and Gruenberg 2009).

### *ii) Los lípidos en endosomas tardíos*

El endosoma tardío es un organelo delimitado por una membrana simple que contiene membranas internas heterogéneas, tanto vesiculares como lamelares; siendo todas de composición lipídica distinta (Gruenberg and Stenmark 2004). Las membranas limitantes del endosoma tardío, en contraste con las del endosoma temprano, contiene bajas cantidades de PI(3)P (Gillooly, et al. 2000), colesterol, PS y esfingomielina.

También se han encontrado balsas lipídicas reportadas en las membranas limitantes e internas del endosoma tardío, las cuales tienen diferentes propiedades fisicoquímicas (Sobo, Chevallier, et al. 2007). Se ha demostrado que existen dominios de membranas resistentes a detergentes (DRM) enriquecidas con colesterol/glicoproteínas y esteroides/esfingomielina (Alanko, et al. 2005). Las ceramidas son moléculas generadas a partir de la esfingomielina por la acción de la esfingomielinasa, cuya actividad es óptima a un pH de 5.5. La concentración del colesterol en las membranas endosomales es inversamente proporcional a la cantidad de las ceramidas, las cuales desplazan el colesterol de las balsas lipídicas (Lange, et al. 2005); (Megha and London 2004).

EL LBPA se consideró como una molécula asociada a lisosomas en la década de los setentas y ochentas, sin embargo, el estudio del endosoma tardío se inició años después. Existen numerosas evidencias experimentales que demuestran que el LBPA se encuentra principalmente en endosomas tardíos. Kobayashi y colaboradores, (1998) inmunizaron ratones con las membranas de endosomas tardíos purificados y generaron los anticuerpos monoclonales anti-LBPA (6C4), los cuales, son considerados marcadores de endosomas tardíos por su alta especificidad y a su vez, han sido una

potente herramienta para caracterizar la función de este fosfolípido. Mediante microscopía confocal, se encontró que el LBPA co-localiza con la proteína Rab7, la cual también es considerada un marcador de endosomas tardíos en células de mamífero (Kobayashi, et al. 2002).

Kobayashi y colaboradores (2002), realizaron un fraccionamiento suborganelar de endosomas con gradientes de sacarosa, en el cual, encontraron que los endosomas tardíos tienen varios dominios de distinta composición lipídica en las membranas internas del endosoma tardío, dos de ellos, con el 73 y 47 % de PC; el tercer dominio reportado es rico en PE (43%); también, encontraron un dominio en el que el 77% de los lípidos corresponde al LBPA. Mediante inmunomarcaje con partículas de oro en muestras derivadas de un fraccionamiento suborganelar, se confirmó que el LBPA se encuentra en las vesículas internas del endosoma tardío (Kobayashi, et al. 1998); (Kobayashi, et al. 2001; Sobo, Le Blanc, et al. 2007). Esta composición de las membranas internas endosomales con una alta concentración de LBPA es única en comparación con todo el sistema vacuolar en células de mamífero.

La presencia de distintas poblaciones de membranas internas en el endosoma tardío, puede reflejar las diferentes funciones de dicho organelo,

se ha reportado que la mayoría de las vesículas están involucradas en la degradación de glicolípidos a través del lisosoma. Por otro lado, la población rica en LBPA participa en el reciclaje de proteínas direccionándolas hacia el aparato de Golgi (en su región *trans*) desde las membranas internas hacia la membrana limitante del endosoma mediante el proceso denominado fusión retrógrada (Kobayashi, et al. 2002); (*van der Goot and Gruenberg 2006*). El LBPA también se localiza en la membrana limitante del endosoma tardío después de la fusión retrógrada. .

### *iii) Los lípidos en lisosomas*

Los lisosomas, pueden fusionarse con diferentes compartimientos celulares, tales como endosomas tardíos, autofagosomas y la membrana plasmática; por lo que se ha encontrado una mezcla del material debido a eventos de fusión directa de membranas. Incluso, existe evidencia experimental de que los lisosomas contienen componentes de la región perinuclear (Bright *et al.*, 2005). Los eventos de fusión de las membranas endolisosomales están regulado por proteínas SNARE, RabGTPasas y fosfoinosítidos, junto con la calmodulina (Shen, et al. 2011). En levaduras de *Sacharomyces cerevisiae*, los eventos de fusión del lisosoma con el endosoma tardío participan,

aparte de las proteínas SNARE, el ATP, y un sistema regulatorio de lípidos: ergosteroles, diacilglicerol (DAG), AP, PE, PI(3)P y PI(4,5)P<sub>2</sub> (Wickner 2010). La función que realiza cada uno de estos componentes no es clara, sin embargo, se sabe que forman dominios de membrana con forma de anillo, a través de los cuales, se fusionan las membranas. El colesterol juega un papel importante en este proceso, ya que modula la fusión de membranas dependientes de las proteínas SNARE (Tong, et al. 2009).

La presencia del LBPA es constante en los lisosomas, se ha sugerido que llega a este organelo a través de la fusión con los endosomas tardíos, sin embargo, la función del LBPA en el lisosoma no ha sido caracterizada.

## **11. El ácido liso *bis*-fosfatídico (LBPA)**

El LBPA es un fosfolípido con una carga negativa, con forma de cono y una estructura atípica que le confiere características funcionales particulares.

### ***i) La estructura del LBPA***

De acuerdo al sistema de clasificación de lípidos definida por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, y la Unión Internacional de

Bioquímica y Biología Molecular (IUPAC-IUBMB), el LBPA pertenece a la categoría de los glicerofosfolípidos (GP), de clase glicerofosfoglicerol (GP04) y subclase monoacilfosfoglicerol-monoacilglicerol (GP0410) ([www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org)).

La clasificación de los fosfolípidos está en función del grupo polar que contienen en su estructura, los glicerofosfolípidos se caracterizan por contener por lo menos un grupo glicerolfosfato, al cual se esterifican los ácidos grasos y otros grupos funcionales que determinan su clase. Los glicerofosfolípidos se sub clasifican en las familias de fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y el ácido fosfatídico (PA). El LBPA es un poliglicerofosfolípido, al igual que el fosfatidilglicerol (PG) y la cardiolipina, ya que contienen más de un grupo glicerol en su estructura (CL) (Figura. 5).

El LBPA, tiene dos grupos glicerol unidos al fosfato y cada uno de ellos esterifica un ácido graso . Este fosfolípido fue reportado por primera vez en células de pulmón de conejo y cerdo (G. 1967) generando cierta confusión con el nombre de ácido *liso bis*-fosfatídico, ya que la estructura de la molécula no se relaciona con el ácido fosfatídico (Kolter and Sandhoff 2005). Químicamente, el nombre correcto del LBPA de acuerdo a su

estructura, es *bis*-monoacil-glicerolfosfato (BMP). Sin embargo, en la literatura se existen reportes nombrando a la misma molécula de las dos formas.

El LBPA tiene características estructurales únicas, ya que, mientras todos los otros glicerofosfolípidos reportados en mamíferos esterifican los ácidos grasos con una estero configuración sn-3;sn-3 sobre el carbono 3 del glicerolfosfato, el LBPA tiene una estero configuración sn-1:sn-1 (Brotherus, et al. 1974); (Joutti, et al. 1976). Existen reportes de isómeros 3,1'-LBPA, las cuales son consideradas como isómeros intermediarios en la síntesis del LBPA.

Recientemente, se propuso que la forma nativa y activa del LBPA es la que esterifica sobre la posición C2 (C2') del grupo glicerol (sn-1:sn1') (Chevallier, et al. 2000); (Chevallier, et al. 2008); (Kobayashi, et al. 2001; Matsuo, et al. 2004a). También se sabe que el isómero 2,2'-LBPA es termodinámicamente inestable, y que los ácidos grasos pueden migrar al carbono C3 (C3') del glicerol formando el isómero 3,3'-LBPA (Chevallier, et al. 2000); (Goursot, et al. 2010) durante los procesos de purificación de la molécula. Además, por simulación computacional con análisis de dinámica molecular, se reveló que los isómeros sn-3:sn-1', sn-1:sn1' y sn-3:sn3'

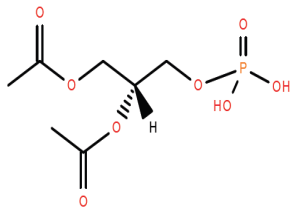


tienen la capacidad orientarse y de formar puentes de hidrógeno formando regiones compactas o dominios en las membranas (Hayakawa, et al. 2006); (Frederick, et al. 2009).

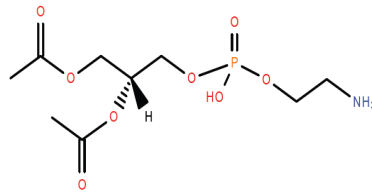
Esta estructura atípica del LBPA, le confiere varias características particulares, como es la resistencia a la hidrólisis enzimática de las fosfolipasas A y las hidrolasas degradativas contenidas en los lisosomas y endosomas tardíos; al igual que los ambientes ácidos de esos organelos.

#### *i) La síntesis del LBPA*

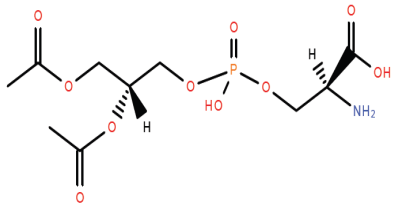
De acuerdo a la estructura de los glicerofosfolípidos, el glicerolfosfato (PG) y el LBPA se consideran isómeros estructurales, ya que ambos tienen dos grupos gliceroles unidos al grupo fosfato (Figura 6). Actualmente, la vía de síntesis del LBPA no se ha caracterizado, sin embargo existe la hipótesis de que el LBPA es sintetizado en las membranas de los endosomas tardíos y lisosomas a partir del PG (Waite, et al. 1987); (Waite, et al. 1990); (Waite, et al. 1990); (Amidon, et al. 1995). Aunque existen varios estudios, no se sabe con certeza cómo se da la conversión del PG al LBPA.



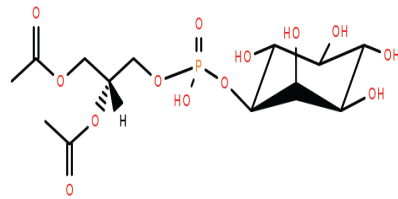
PA



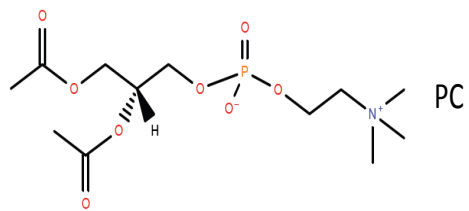
PE



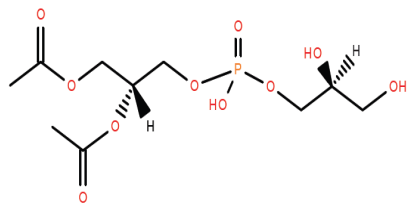
PS



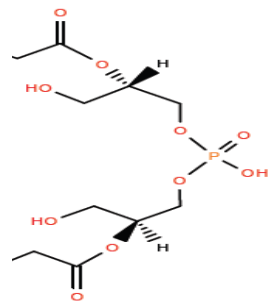
PI



PC

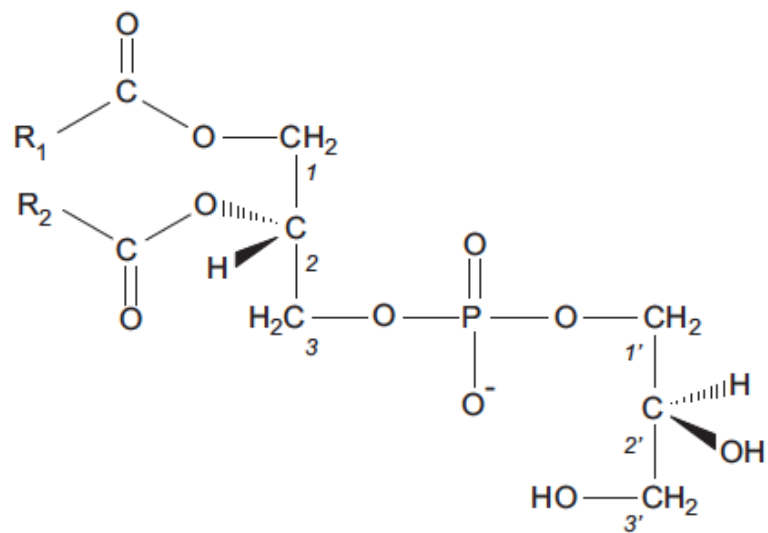


PG

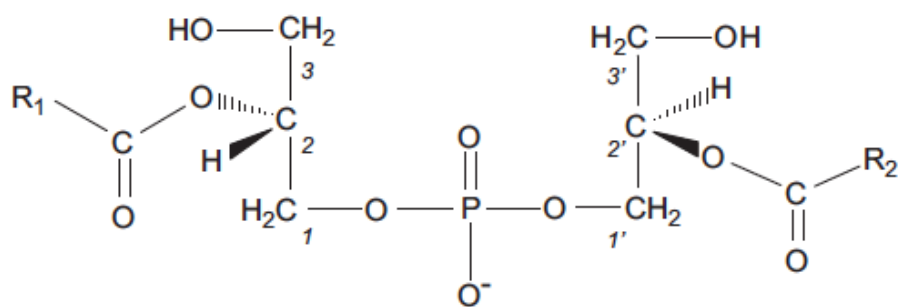


LBPA/BMP

**Figura 5. Estructura de los distintos tipos de glicerofosfolípidos.**  
PA, ácido fosfatídico; PE, fosfatidiletanolamina; PS fosfatidilserina; PI, fosfatidilinositol; PC, fosfatidil colina; PG, fosfatidil glicerol; LBPA/BMP, ácido liso bis-fosfatídico/bis-monoacil glicerolfosfato



1,2 diacyl-sn 3:sn1' PG



2,2' diacyl-sn 1:sn1' BMP

Figura 6. Estructura del PG y el LBPA. La posición del ácido graso sobre los carbonos del glicerofosfato se indican con los números, la estereoconfiguración de la posición del fosfato se indica con *sn* seguida del número de carbono.

Esta hipótesis describe que en el primer paso, una fosfolipasa A2 corta el ácido graso de la posición 2 del PG formando el lisofosfatidilglicerol (LPG).

Enseguida, el LPG es acilado en la posición 2 de la cabeza del grupo glicerol transformándose en 3,1'-LBPA por una reacción de transacilación del LPG que funciona tanto como aceptor y como donador de grupos acilos. A la fecha, no se sabe el mecanismo del siguiente paso, pero se ha sugerido que es necesaria la eliminación del ácido graso de la posición 1 del glicerol y como consecuencia, una migración del grupo fosfoéster ubicado en la posición 3 hacia la 1. Finalmente, la posición 2 del glicerol es esterificado, probablemente por la transacilación con otro fosfolípido que actúa como donador (Joutti, et al. 1976); (Luquain, et al. 2000); (Waite, et al. 1987). (Matsuzawa, et al. 1978) propusieron que el PI(3)P participa en la síntesis del LBPA como donador de grupos acilos para el PG y el LPG. Las enzimas que participan en la síntesis del LBPA no se han descrito, pero se sugiere que son tanto endosomales como lisosomales (Luquain, et al. 2000).

En estudios más recientes, se ha propuesto que la vía de síntesis *de novo* del PG y el LBPA están correlacionadas (Hullin-Matsuda, et al. 2007). Debido a que no existen evidencias contundentes de la presencia del PG en membranas del endosoma tardío y lisosomas, se ha sugerido que este es

direccionado a estos organelos a través de transporte vesicular mediante transporte de lípidos regulado por proteínas, mitofagia o por contacto directo de membranas (Hullin-Matsuda, et al. 2007). Sin embargo, actualmente no existe evidencia experimental contundente sobre este tema.

### iii) Especies moleculares del LBPA

Se han identificado varias especies moleculares de LBPA en distintos tipos celulares, tales como en los lisosomas del hígado, cerebro, riñón, macrófagos pulmonares y alveolares, suero de humano, testículos y células estromales de rata y algunos otros tejidos. La composición de ácidos grasos es importante para determinar las propiedades biofísicas del LBPA y también, podría interferir en sus funciones celulares.

En la mayoría de las células, el LBPA esterifica altas cantidades de ácido oléico (18:1) (Wherrett and Huterer 1973); (Huterer and Wherrett 1979); (Luquain, et al. 2000); (Besson, et al. 2006); (Bouvier, et al. 2009). En relación a los ácidos poli insaturados, el LBPA presenta altas cantidades de ácido decosahexaenóico (DHA, 22:6) en células estromales uterinas de rata (Luquain, et al. 2000), células PC12 (Holbrook, et al. 1992), macrófagos THP-1 y RAW (Besson, et al. 2006); (Bouvier, et al. 2009), en hígado de

rata y humano (Wherrett and Huterer 1973), y suero de humanos (Kakela, et al. 2003). En los macrófagos pulmonares, los principales ácidos grasos que esterifica el LBPA son el ácido linoléico (18:2) y el araquidónico (AA, 20:4) (Huterer and Wherrett 1979); (Mason, et al. 1972); (mCochran, et al. 1987). El AA esterificado al LBPA en macrófagos de conejo, es considerado como activador celular que conlleva a la formación de eicosanoides (mCochran, et al. 1987).

El bis-DHA-LBPA (22:6/22:6) es considerado un marcador de enfermedades lisosomales. Usando liposomas de PC/BMP/colesterol, se ha sugerido que esta especie molecular protege parcialmente la oxidación del colesterol, a diferencia del dioleoyl-LBPA (18:1/18:1) (Bouvier, et al. 2009).

Fuera del reino animal, el LBPA se ha identificado en lisosomas de *Leishmania mexicana* (Schaible, et al. 1999), *Dictyostelium discoideum* (Rodriguez-Paris, et al. 1993) y algunas bacterias; sin embargo, se desconocen las especies moleculares de LBPA en estos microorganismos. En estudios más recientes, algunos isómeros de LBPA han sido sintetizados para analizar *in vitro* las propiedades biofísicas de la molécula. Se ha demostrado que el 3,1'-dioleoyl-sn1:sn3' LBPA forma vesículas pequeñas y lamelares, cuya morfología varía en función del pH y fuerza iónica



(Hayakawa, et al. 2006). En contraste, liposomas formados con el isómero 2,2'-dioleoyl-sn1:sn1'-LBPA generó espontáneamente vesículas en su interior con un gradiente de pH (Matsuo, et al. 2004b).

## **12. El LBPA y la proteína ALIX. Formación de vesículas intraluminales del endosoma tardío**

El LBPA puede participar en la formación de MVB ya que los liposomas formados por este fosfolípido, espontáneamente generan vesículas en su interior de forma inducida por la acidificación del pH (Matsuo et al 2004). Se ha sugerido que la proteína ALIX es la molécula que pudiera controlar la formación de vesículas de LBPA, ya que se induce la formación de liposomas multivesiculares de LBPA que se asemejan a los MVB cuando se incuban con la proteína ALIX y extractos citoplasmáticos. Por otro lado, al interferir la expresión de la proteína ALIX, se observó que reduce la acumulación de LBPA y del colesterol dentro de los endosomas, así como también se reduce el número de vesículas intraluminales (Chevallier, et al. 2008); (Matsuo, et al. 2004). Resulta interesante que estos bajos niveles de LBPA, colesterol y vesículas intraluminales se restablecen después de

alimentar a las células con liposomas formados por 2,2'-bisoletoyl-LBPA (Chevallier, et al. 2008). Todo esto sugiere que este fosfolípido controla directa o indirectamente los niveles de colesterol endosomal y la formación de vesículas intraluminales.

Por otro lado, se ha propuesto que el LBPA y ALIX también regulan la fusión retrógrada de las vesículas intraluminales con la membrana limitante del endosoma tardío permitiendo la entrada de patógenos al citoplasma. Se ha observado que en células con la expresión de ALIX interferida, al igual que células con el LBPA bloqueado a través del anticuerpo anti-LBPA endocitado (el anticuerpo es internalizado en las células por fase fluida, y es acumulado en el endosoma tardío al unirse a su antígeno), no se liberan proteínas virales en el citoplasma (Le Blanc, et al. 2005); (Luyet, et al. 2008); (van der Goot and Gruenberg 2006). Estos resultados han sugerido que mediante esta fusión retrógrada de las vesículas intraluminales con la membrana limitante del endosoma tardío también se regulan los niveles de colesterol, y que el LBPA y ALIX participan en el reciclaje de los componentes que no se degradan en el lisosoma.

La participación de la maquinaria ESCRT también se ha reportado en algunos tipos celulares para la formación de ILV del endosoma tardío, junto con la

proteína ALIX y LBPA (Matsuo, et al. 2004). Sin embargo, existen varios reportes que consideran este mecanismo independiente de ESCRT y que la participación de esta maquinaria es exclusiva para la formación de MVB partiendo de endosomas tempranos.

Por otro lado, existe otra población de ILV que direccionan a las moléculas cargo al lisosoma para su degradación. En algunos casos, los contenidos lisosomales son liberados afuera de la célula a partir de exosomas que se fusionan y fisianan con la membrana plasmática. EL LBPA puede o no estar presente los exosomas de algunos tipos celulares (Denzer, et al. 2000); (Wubbolts, et al. 2003). En contraste, la presencia de la proteína ALIX en los exosomas es constante (Thery, et al. 2006). Los mecanismos de liberación de los exosomas puede ser dependiente o independiente de la maquinaria ESCRT (*Baietti et al., 2012; Trajkovic et al., 2009*).

### **13. La participación del LBPA en la degradación de moléculas**

La degradación de esfingolípidos y glicoesfingolípidos se lleva a cabo en los compartimentos ácidos de la vía endocítica: el endosoma tardío y lisosoma. En la superficie de estos compartimentos existen proteínas activadoras de

esfingolípidos (SAP), comúnmente llamadas saposinas, las cuales mantienen accesibles los glicolípidos como sustratos para las enzimas. Los dominios de membrana ricos en LBPA tienen bajo contenido de colesterol, generando las condiciones biofísicas en las membranas que estimulan la degradación de los glicolípidos por las hidrolasas de manera selectiva sin alterar la composición de la membrana limitante del endosoma tardío y lisosoma (Kolter and Sandhoff 2005; Kolter, et al. 2005). La saposina C, es una proteína capaz de inducir fusión de membranas compuestas por 2,2'-bisoleoyl-LBPA en ambientes ácidos (Chu, et al. 2005), sugiriendo que la interacción saposina C-LBPA participa en la formación de MVB, y la ausencia de este complejo proteína-lípido podría generar MVB multilamelares.

Los esfingolípidos no glucosilados, tales como las ceramidas y la esfingomielina no necesitan proteínas activadoras para ser degradadas (Jenkins, et al. 2009), sin embargo, la presencia de los fosfolípidos aniónicos como el LBPA y el PI promueven la actividad de la esfingomielinasa ácida para hidrolizar la esfingomielina. Además, la saposinas A, C y D activan indirectamente la degradación de las ceramidas favoreciendo la penetración de la ceramidasa en la membrana (Linke, Wilkening, Lansmann, et al. 2001). Los lípidos aniónicos LBPA, PI y dicol-

fosfato, también participan en la degradación de las ceramidas (Linke, Wilkening, Sadeghlar, et al. 2001).

Por otro lado, la participación del LBPA con algunas enzimas lipolíticas, por ejemplo, la lipasa lisosomal ácida (LAL), la cual es esencial para la degradación intracelular de ésteres de colesterol y triacilgliceroles que llegan al lisosoma mediante la internalización de lipoproteínas de baja densidad (Makino, et al. 2006); (Delton-Vandenbroucke, et al. 2007). Incluso, se ha demostrado que las membranas ricas en LBPA con carga negativa, potencian la actividad de la fosfolipasa A (Hiraoka, et al. 2006), la cual está involucrada en el catabolismo de lípidos (Abe and Shayman 2009).

#### **14. El LBPA y el colesterol**

Se ha reportado que las vesículas formadas por LBPA participan en el transporte y regulación del colesterol con la proteína ALIX (Kobayashi, et al. 1999); (Sobo, Chevallier, et al. 2007). La invaginación de la membrana plasmática durante la endocitosis provoca la internalización del colesterol, el cual es hidrolizado y transportado a través de los endosomas hasta llegar a

las vesículas internas del endosoma tardío formadas de LBPA. Posteriormente, el colesterol libre es redistribuido en el interior de la célula.

Cuando existe una alteración en la vía endosomal, se presenta una acumulación de colesterol en el endosoma tardío provocando una morfología alargada del endosoma y éste organelo no se fusiona con el lisosoma. Esto también se ha observado al bloquear el LBPA con el anticuerpo monoclonal anti-LBPA endocitado, y el mismo fenómeno sucede en pacientes con el síndrome autosómico Niemann-Pick tipo C (NPC) (Watari, et al. 1999); (Patel, et al. 1999); (Kobayashi, et al.1999); (Loftus, et al. 1997).

Durante la enfermedad autoinmune NPC se observa la acumulación excesiva del LBPA en los compartimientos lisosomales. En estudios de laboratorio, el LBPA es un antígeno reconocido por sueros de pacientes de esta enfermedad. Este síndrome no se ha estudiado completamente, sin embargo es relevante el hecho de que las bases patológicas de esta enfermedad están relacionados con el LBPA (Galve-de Rochemonteix, et al. 2000); (Kobayashi, et al. 1998).

El flujo de colesterol en los endosomas tardíos probablemente depende de las proteínas transportadoras Niemann-Pick tipo C 1 y 2 (NPC1 y NPC2). La

proteína NPC2 es una pequeña proteína soluble y mediante ensayos *in vitro*, se ha observado que transfiere el colesterol a la proteína NPC1 en condiciones ácidas y en presencia del LBPA en los endosomas tardíos (Kobayashi, et al. 1999). La proteína NPC1 es una glicoproteína con 13 dominios transmembranales, de los cuales cinco constituyen el dominio SSD (de las siglas en inglés Sensing Sterol Domain) (Davies and Ioannou 2000) y se ha localizado tanto en la membrana limitante como en las ILV del endosoma tardío.

Se demostró que la deficiencia de cualquiera de ellas conduce a la acumulación del colesterol no esterificado en el interior de los organelos endocíticos. Sugiriendo que ambas proteínas son cruciales para el movimiento del colesterol hacia fuera del sistema endosomal (Davies and Ioannou, 2000). Existe la hipótesis de que la proteína NPC2 transfiere el colesterol proveniente de las membranas de las ILV ricas en LBPA a la NPC1 ubicada en la membrana limitante del endosoma, la cual transporta el colesterol hacia fuera del sistema endosomal (Storch and Xu 2009); (Infante, et al. 2008); (Kwon, et al. 2009). La transferencia de colesterol que realiza NPC2, se ve disminuida en células BHK que han endocitado el anti-LBPA (Xu, et al. 2008). Se ha reportado que el LBPA que esterifica dos

ácidos oléicos (18:1/18:1) es más eficiente en el transporte de colesterol junto con la NPC2, que las moléculas de LBPA con los ácidos grasos saturados más cortos (16:0/16:0).

Por otro lado, se realizó la comparación del flujo de colesterol en macrófagos tratados con el anti-LBPA y por otro lado, con la droga U18666A, la cual genera el fenotipo celular de la enfermedad NPC (Delton-Vandenbroucke, et al. 2007). Las células tratadas con el anticuerpo anti-LBPA, mostraron un aumento de colesterol en la membrana plasmática y el flujo de HDL estuvo reducido, sugiriendo que el colesterol derivado de las LDL se acumula en dominios no accesibles a las lipoproteínas de alta densidad. Con estos resultados, los autores infieren un mecanismo de distribución de colesterol independiente de NPC1 (Hullin-Matsuda, et al. 2009). Posiblemente, el tratamiento con el anticuerpo anti-LBPA también interfiere el tráfico del colesterol a través de los transportadores ABCG1 y ABCA del endosoma.



## JUSTIFICACIÓN

En células de mamífero, el fosfolípido ácido liso *bis*-fosfatídico (LBPA) es un componente indispensable para el buen funcionamiento del sistema endosomal/lisosomal en la vía endocítica, participando activamente en el reciclaje de receptores y en la distribución de colesterol.

*E. histolytica* utiliza procesos endocíticos como mecanismo de nutrición y de virulencia; sin embargo, la participación de los lípidos en dichos eventos está poco estudiado, en particular la de los glicerofosfolípidos. Además, se desconoce si este protozooario tiene LBPA, y en caso de que así sea, cuál es su función. Por lo tanto, detectar la presencia del LBPA en el sistema endosomal amibiano, así como la participación de este fosfolípido durante eventos endocíticos ayudará a entender mejor los mecanismos de virulencia de la amiba.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

El ácido liso *bis*-fosfatídico es un componente lipídico de *E. histolytica* y participa en los procesos endocíticos en conjunto con la proteína EhADH.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar estructuralmente el LBPA en *E. histolytica*, determinar su participación en eventos endocíticos y su interacción con la proteína EhADH.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar el LBPA en extractos de lípidos de *E. histolytica*.
- Determinar las especies moleculares del LBPA de *E. histolytica*.
- Determinar la localización celular del LBPA de *E. histolytica* en condiciones basales y eventos endocíticos.
- Evaluar la interacción entre el LBPA de *E. histolytica* y la proteína EhADH en condiciones basales y de fagocitosis.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### 1. Identificación del LBPA en lípidos de *E. histolytica*.

Para identificar el LBPA en trofozoítos de *E. histolytica*, se obtuvieron extractos de lípidos totales de trofozoítos, los cuales se utilizaron como antígeno en ensayos de ELISA (Enzyme Linked Immunoassay) para inmunodetectar el LBPA con el anticuerpo anti-LPBA (6C4). Por otro lado, los lípidos totales de amiba se separaron mediante cromatografía en capa fina para identificar la fracción de fosfolípidos con una migración similar al estándar. Dicha fracción también se inmunodetectó con el anticuerpo 6C4 mediante ensayos de dot blot.

### 2. Determinación de las especies moleculares del EhLBPA de amiba.

Con el fin de identificar las especies moleculares del LBPA de *E. histolytica*, la fracción de fosfolípidos con migración similar a la del estándar, la cual también fue reconocida por el anticuerpo 6C4, se purificó y analizó mediante cromatografía de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas.

### **3. Localización celular del LBPA de *E. histolytica***

#### **i) Distribución celular del LBPA de *E. histolytica* en condiciones basales**

Se realizaron ensayos de microscopía electrónica y de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo 6C4 en trofozoítos fijados. Se cuantificó el número de partículas de oro/ $\mu^2$  y a su vez, se determinó el porcentaje relativo de las vesículas teñidas con el anticuerpo 6C4.

#### **ii) Distribución celular del LBPA de *E. histolytica* durante eventos de endocitosis**

Con el fin de determinar la localización celular del fosfolípido durante eventos de endocitosis en *E. histolytica*, se realizaron cinéticas de pinocitosis en las cuales se incubaron los trofozoítos en medio de cultivo suplementado con dextran-FITC. Enseguida, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo 6C4 y se analizaron las muestras por microscopía confocal. Las imágenes se analizaron para cuantificar la fluorescencia intracelular correspondiente al LBPA, y se

determinó el porcentaje relativo de las vesículas teñidas con el anticuerpo 6C4, el dextran-FITC y de las vesículas co-teñidas.

Para evaluar la distribución del fosfolípido durante la fagocitosis, los trofozoítos se incubaron con eritrocitos a diferentes tiempos, posteriormente, se fijaron las células y se analizó la distribución de la marca fluorescente del LBPA y mediante microscopía confocal y por otro lado, microscopía electrónica de transmisión. También se determinó la asociación del anticuerpo 6C4 con marcadores de vesículas ácidas y endosomas tardíos a través de ensayos de co-localización y microscopía confocal.

#### **4. Análisis de la interacción del LBPA de *E. histolytica* con la proteína EhADH.**

Para determinar si el LBPA de *E. histolytica* interactúa con la proteína EhADH, se realizaron ensayos de co-localización e inmunoprecipitación con los anticuerpos 6C4 y anti EhADH. Mediante análisis computacional o *docking* molecular, se predijo la localización del sitio de interacción de la proteína EhADH con el LBPA y se comprobó que al mutar dicho sitio, la interacción *in silico* de las moléculas, se abate.

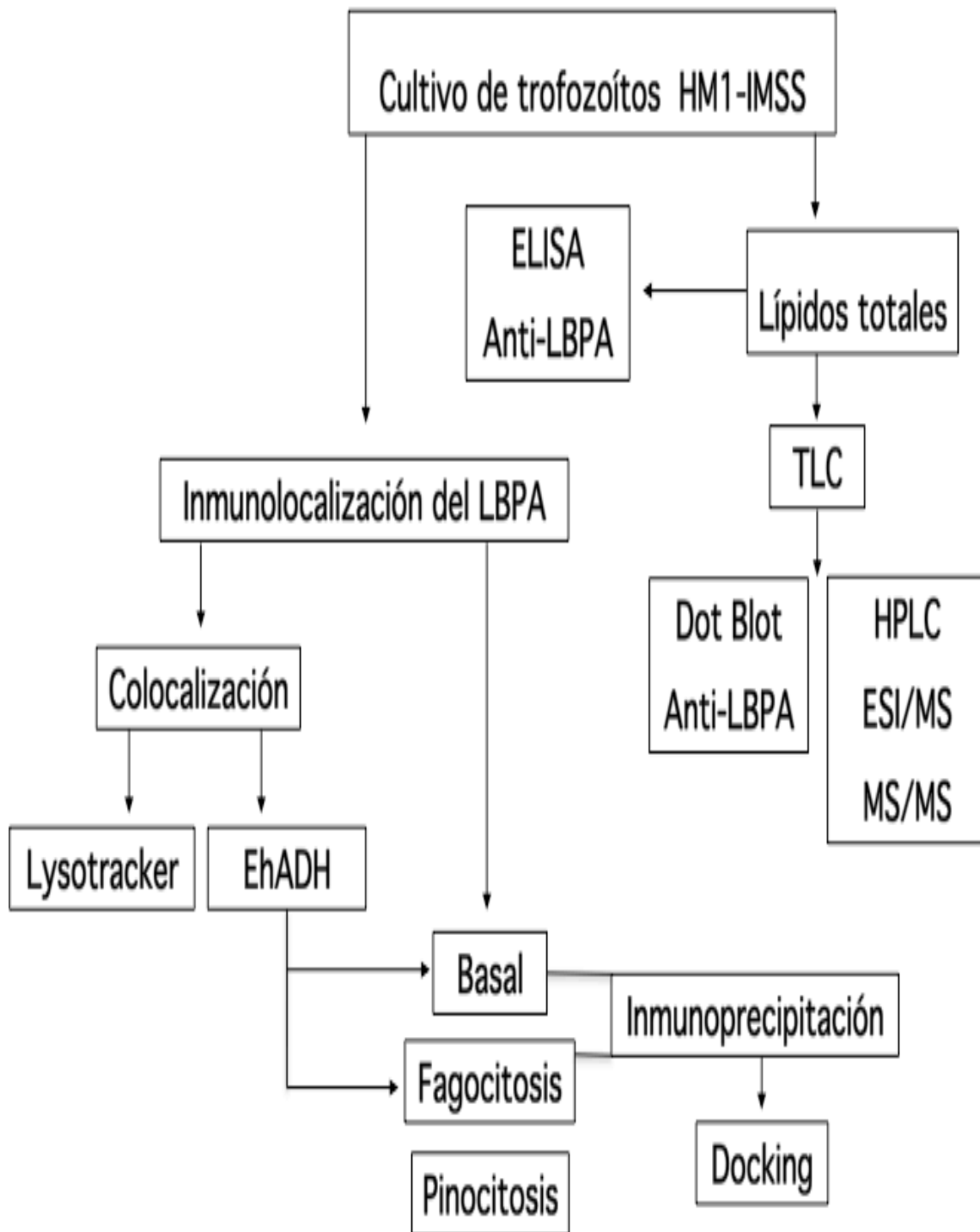


Figura 7. **Estrategia experimental.** (ELISA, por sus siglas en inglés enzyme linked immuno assay); cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés thin layer chromatography); cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés high performance liquid chromatography) acoplada a espectrometría de masas con ionización por electronebulización (LC-ESI/MS por sus siglas en inglés liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry); espectrometría de masas en tándem (MS/MS por sus siglas en inglés tandem mass spectrometry/mass spectrometry).

## MATERIALES Y METODOS

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

Los trofozoítos de la cepa HM-1-IMSS de *E. histolytica* se cultivaron axénicamente a 37 °C en medio TYI-S-33 (Diamond, et al. 1978) complementado con 15% de suero bovino (Biofluds), 3% de mezcla de vitaminas y 0.25 UI/ml de penicilina y 35 µg/ml de estreptomicina (Lakeside, México). Para cosechar los trofozoítos, las cajas de cultivos crecidos durante 72 h, se colocaron sobre hielo durante 10-15 min para permitir que las amibas se desprendieran de la pared del plástico. Posteriormente, las células se centrifugaron a 360 xg a 4 °C por 5 min en tubos Falcon (Nalgene) de 50 ml. El sobrenadante se eliminó y el paquete celular se lavó por centrifugación con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS: NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8mM, pH 6.8) a 4 °C durante 5 min. Durante el último lavado se tomó una alícuota de la suspensión y se contaron las amibas en una cámara de Neubauer. Los trofozoítos se utilizaron de manera inmediata para los subsecuentes experimentos.



## **2. Obtención de extractos totales de trofozoítos**

Los extractos totales amibianos se obtuvieron a partir de trofozoítos cosechados de la manera antes mencionada. Por cada  $15 \times 10^6$  de trofozoítos, se añadió 1 ml del inhibidor de proteasas PHMB 100 mM (p-hidroximercuribenzoato) para re-suspender las células, inmediatamente se agregó la mezcla de inhibidores (2 mM benzamidina, 5  $\mu\text{g/ml}$  aprotinina, 5  $\mu\text{g/ml}$  pepstatina A, 5  $\mu\text{g/ml}$  leupeptina, 10  $\mu\text{g/ml}$  E-64). Enseguida, se congeló la muestra en nitrógeno líquido. Para lisar las células, se procedió a descongelarlas mediante pases en hielo-vórtex (2 min de cada uno) hasta que la muestra quedó totalmente lisada.

## **3. Extracción de lípidos totales**

Para extraer los lípidos amibianos, la pastilla celular de trofozoítos recién cosechados, se re-suspendió en 5 ml de metanol absoluto y se calentó a 55 °C durante 20 minutos en un baño María. Pasado este tiempo, se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 10 ml de cloroformo y se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 min para concentrar la pastilla. Después, la fase orgánica se filtró con

papel Whatman con poro del número 1. Enseguida, se evaporó el metanol-cloroformo 2:1 v/v con nitrógeno líquido y se guardó la muestra a -20 °C hasta su uso.

#### **4. Cuantificación de fósforo total de fosfolípidos**

Los lípidos se cuantificaron de acuerdo a lo reportado por Ames, (1966). Las muestras se re-suspendieron en metanol y se agregaron 50  $\mu$ l de nitrato de magnesio al 10% en alcohol al 95%. La muestra se trasvasó a tubos de vidrio lavados con mezcla crómica. Después se calentó en una parrilla hasta que el humo color café desapareció y se dejó enfriar. Posteriormente, se agregaron 0.7ml de la mezcla AB [A (ácido ascórbico al 10%) y B (4.2 g de molibdato de amonio, 28.6 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por litro de agua) 1:6 v/v]. Se incubó 1 h a 37 °C y se leyó la absorbancia a 820 nm. Aparte, se realizó una curva estándar con 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100  $\mu$ l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8 mM para comparar la concentración de las muestras mediante cálculos de regresión lineal.

#### **5. Ensayos de ELISA**

Para detectar el LBPA en trofozoítos, se realizaron ensayos de ELISA con el anticuerpo anti-LBPA (Echelon Bioscience). Con el fin de determinar la

especificidad de los anticuerpos, se realizó un control con los estándares de PG, LPG LBPA y lecitina de huevo (Sigma Aldrich), que se sabe que es una mezcla natural de fosfolípidos. Por otro lado, para descartar la posible reacción cruzada del anticuerpo con proteínas, se realizó el ensayo cubriendo cajas de 96 pozos (NUNC) con 100 µg de extractos de proteínas de trofozoítos. Para la detección del LBPA, se usaron 40 y 100 µg de extractos de lípidos totales de amibas. Como control positivo del experimento, se usaron las mismas concentraciones de proteínas y lípidos extraídos de células BHK. Como control de fondo, se utilizaron placas sin recubrir. El material biológico de naturaleza lipídica, se re-suspendió en cloroformo 2%/metanol 98%. En el caso de las proteínas, se usó la solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 (carbonato de sodio 0.1M; bicarbonato de sodio 0.1M). Las muestras se colocaron en las placas por triplicado y se incubaron toda la noche a 4 °C. Las muestras se lavaron en tres ocasiones con PBS, enseguida, se bloquearon los sitios libres con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Sigma, EUA) durante una hora a temperatura ambiente. Las proteínas se bloquearon con albúmina al 3%. Posteriormente, las muestras se incubaron 3 h a temperatura ambiente con el anticuerpo 6C4 (Echelon). Al término de este tiempo y a partir de este paso, los lavados subsecuentes de los lípidos se realizaron con PBS.SFB-10%) y de

las proteínas con PBS-Tween al 0.1% por tres ocasiones. Después, las muestras se incubaron durante 1 hora con un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa a temperatura ambiente. La reacción antígeno-anticuerpo se reveló con Ortofenilen-diamina 50 mM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (solución reveladora con ácido acético 0.1M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2M pH: 5) y se leyó la absorbancia con un espectrofotómetro a 492 nm.

## 6. Cromatografía en capa fina

Extractos de lípidos totales obtenidos de trofozoítos se separaron mediante cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés thin layer chromatography) utilizando los estándares de LBPA como referencia. Se pesaron 5 mg del extracto de lípidos se solubilizaron en 500  $\mu$ l de la fase móvil isopropanol:*n*-Hexano:H<sub>2</sub>O (8:6:1.5 v/v/v). Enseguida, los lípidos solubilizados se colocaron sobre una placa de sílica (MERCK) dibujando una línea punteada y la muestra se dejó secar durante 15 min. Posteriormente, la placa se sumergió en un tanque cromatográfico utilizando la fase móvil Isopropanol:*n*-hexano:H<sub>2</sub>O (8:6:1.5, v/v/v) y el desarrollo cromatográfico se realizó durante 4 h. Pasando este tiempo, se dejó secar la placa durante 16 h. Una vez seca la placa, se cortaron tres tiras de un centímetro cada una, las dos tiras de los extremos y una de la parte media, se revelaron con

vapores de yodo y las fracciones cromatográficas se dibujaron con un lápiz. La constante  $R_f$  (por sus siglas en inglés ratio of front) de cada una de las fracciones separadas se determinó dividiendo la distancia de la muestra entre la distancia del eluyente desde el origen. Para extraer los compuestos separados, se raspó la sílica que contenía cada fracción y se colocó en una pipeta Pasteur; la elusión de los lípidos se realizó con la fase móvil mencionada. Las muestras se secaron con  $N_2$  líquido y se almacenaron a  $-20$  °C para los siguientes experimentos.

## **7. Dot blot**

Las fracciones separadas por TLC correspondientes a los fosfolípidos, fueron re-suspendidas en isopropanol/agua (95:5%) y fueron transferidas con vacío a una membrana de polivinildeno difluoride (PVDF). El solvente se evaporó a TA y la membrana se bloqueó con PBS-SFB (10%) ON a  $4$ °C. Posteriormente, se incubó 3h a TA con 2 ml del anticuerpo 6C4 diluido 1:100 en PBS. Después de lavar cuatro veces con PBS-Tween-20 (0.02%), la muestra se incubó con un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP (Zymed) diluido 1:9 000 en PBS, durante 1h a TA. Enseguida, la membrana se lavó varias veces con PBS-Tween 20 (0.02%). Finalmente, la

inmunoreacción se observó con un kit comercial de quimioluminiscencia usando el procesador de imágenes de MicroChem 4.2 (Bio Imaging System).

## **8. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Se utilizó un sistema de HPLC fase reversa de acuerdo a lo reportado por (Mortuza, et al. 2003). Se usó como fase estacionaria una columna Zorvax SB C18 (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 0.5 mm). Las fases móviles que a continuación se describen, se usaron recién preparadas, degasificadas con vacío y filtradas a través de una membrana con un poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore):

Fase A: Hidróxido de amonio, 0.25% (v/v) / ácido fórmico 0.05% (vol/vol) (0.5 ml) in 1-1 metanol, pH 6.4: agua (88:12).

Fase B: Hidróxido de amonio 0.25% (v/v) / ácido fórmico 0.05% (v/v) (0.5 ml) in 1-1 methanol, pH 6.4: hexano (80:20).

Las muestras se re-suspendieron en metanol y se inyectaron en la columna C18. La cromatografía se desarrolló con una bomba capilar Agilent 1200 LC y los compuestos eluyeron con un gradiente lineal de seis pases de acuerdo a las condiciones tabla 1.

**Tabla 1. Condiciones experimentales del HPLC**

<b>Pase</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Flujo (<math>\mu</math>l/min)</b>	<b>A%</b>	<b>B%</b>
0	0.00	10.00	90.0	10.0
1	2.00	10.00	90.0	10.0
2	30.00	10.00	40.0	60.0
3	32.00	10.00	20.0	80.0
4	35.00	10.00	20.0	80.0
5	37.00	10.00	90.0	10.0
6	42.00	10.00	90.0	10.0

## 9. Espectrometría de masas

La identificación de las especies moleculares del LBPA de los trofozoítos de *E. histolytica* se determinó con base en el tiempo de retención de los estándares, la relación masa/carga ( $m/z$ ) de acuerdo a los iones de LBPA reportados en otros sistemas, así como el análisis del ion precursor y patrón de fragmentación. La abundancia relativa se reportó de acuerdo al área bajo la curva registrada en cada espectro.

Para detectar los iones separados por HPLC, se utilizó un espectrómetro 3200 Q-Trap (Applied Biosystem Instruments) con una fuente de ionización turbo espray (LC-ESI-MS). El análisis de espectrometría de masas con electro nebulización se realizó en modo negativo guardando los datos de 155 lecturas. Los datos se adquirieron mediante experimentos de *Information Dependent Acquisition* (IDA), en modo *full scan*. En el modo de adquisición *full scan*, todas las moléculas que se ionizan en la interfase llegan al detector y aquellos picos que son más abundantes son adquiridos en modo ESI-MS/MS, generando el cromatograma de los iones totales (TIC de las siglas en inglés de Total Ion Current). Para complementar la identificación de las especies moleculares de los iones detectados por LC-ESI-MS, lípidos totales de  $1.2 \times 10^8$  trofozoítos se analizaron por infusión



directa, en modo negativo, en modo *ion precursor* de 153  $m/z$ , el cual corresponde a la masa del glicerol fosfato con pérdida de agua, y es considerado un patrón de identificación del LBPA (Mortuza *et al.*, 2003; [www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org)). En seguida, los iones que presentaron el ion precursor de 153  $m/z$  y que coincidieron con los detectados por LC-ESI-MS, se fragmentaron mediante espectrometría de masas en tándem MS (MS/MS). La fragmentación se produce por la colisión del ión seleccionado mediante una trampa de iones (LIT del sus siglas en Linear Ion Trap) con moléculas de un gas inerte. Los iones producidos con la fragmentación están ligados directamente con la composición química y la estructura de la molécula. Los parámetros instrumentales para la fragmentación se establecieron a partir de los optimizados con los estándares de LBPA:

Gas cortina: nitrógeno

Energía de colisión: -50 eV

Potencial *declustering* (DP): -70 eV

Gas de colisión: nitrógeno

Voltaje del capilar: 8 V

## **10. Tinción de vesículas ácidas**

Un cultivo de trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento, se colocó en cajas de cultivo estériles de seis pozos (NUNC), en cuyo fondo se colocaron cubreobjetos estériles. Las células se incubaron toda la noche con 2µl de LysoTracker Red (Invitrogen) por cada ml de suero TYI completo. Al siguiente día, se realizaron los ensayos de pinocitosis o endocitosis como se describió previamente.

## **11. Ensayos de pinocitosis *in vitro***

Un cultivo de trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento, se colocó en cajas de cultivo estériles de seis pozos (NUNC), en cuyo fondo se colocaron cubreobjetos estériles. Una vez que las amibas se adhirieron al vidrio, se cambió el medio TYI complementado por medio TYI incompleto con 8 mg de Dextran-FITC (Sigma Aldrich) y se incubó durante 0, 15, 30, 120 y 200 min. Pasado este tiempo, los trofozoítos se lavaron con PBS a 37 °C para evitar su desprendimiento. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 1h a temperatura ambiente y se siguió la técnica de inmunofluorescencia indirecta descrita más adelante.

## 12. Obtención de eritrocitos

Mediante punción venosa se obtuvo una muestra de sangre humana, la cual se colocó en solución Alsever (0.02 M de citrato de sodio, 0.07 M de cloruro de sodio, 0.1 M de dextrosa, ajustando el pH a 6.1 con 0.01 M de ácido cítrico) para evitar su coagulación. La muestra se centrifugó a 500 xg y se lavó cuatro veces por 10 min con solución Alsever. El sobrenadante se decantó y los eritrocitos ubicados en la pastilla celular se cuantificaron en una cámara de Neubauer empleando la siguiente fórmula:

Sumatoria de los eritrocitos ubicados en los 5 cuadrantes)/5\*25\*(factor de dilución) = eritrocitos/ml

## 13. Ensayos de eritrofagocitosis *in vitro*

Un cultivo de trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento, se colocó en cajas de cultivo estériles de seis pozos (NUNC), en cuyo fondo se colocaron cubreobjetos estériles. Una vez que las amibas se adhirieron al vidrio, se cambió el medio TYI complementado por medio TYI incompleto con 50 eritrocitos humanos por cada trofozoíto. La interacción entre los dos tipos celulares se permitió durante 0, 15 y 90 min. Pasado este tiempo, los

trofozoítos se lavaron con PBS a 37 °C para evitar su desprendimiento. Posteriormente, las células se fijaron con para-formaldehído (PFA) al 4 % durante 1h a temperatura ambiente y se siguió la técnica de inmunofluorescencia indirecta descrita más adelante. En el caso de las muestras que se analizaron por microscopía electrónica, los trofozoítos se fijaron con una mezcla de PFA al 4% y glutaraldehído 0.5% durante 1 h a temperatura ambiente.

#### **14. Inmunofluorescencia indirecta**

Las muestras fijadas después de los ensayos de endocitosis *in vitro*, se lavaron tres veces con PBS. Después, las células se permeabilizaron con PBS-saponina al 0.2% (SIGMA) durante 10 min. Posteriormente, se bloquearon los sitios inespecíficos con 0.5% albúmina (Sigma) (BSA por sus siglas en inglés bovine serum albumin) re-suspendida en PBS-saponina al 0.2% durante 30 min a temperatura ambiente. Seguido de esto, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario (6C4, anti-EhADH, anti-EhRab7A) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, la muestra se lavó en tres ocasiones con PBS y se incubó 1 h con un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa-594 (Invitrogen) diluido 1:100 en PBS. Nuevamente, las células se lavaron tres veces con PBS y se montaron los

cubreobjetos sobre portaobjetos con una gota de Vectashield. Las preparaciones se fijaron con barniz de uñas en el perímetro del cubreobjetos. Finalmente, las células se examinaron a través de un microscopio Nikon Diaphot 200 acoplado a un sistema de barrido de láser confocal MRC 1024 (Bio-Rad).

## 15. Cuantificación de fluorescencia

Las imágenes de microscopía confocal fueron analizadas con el software Image J 1.48 i (44). Para cuantificar la intensidad de la fluorescencia intracelular, utilizamos las imágenes de la proyección máxima, en donde, se dibujó la región alrededor de cada célula y se midieron los valores del área, la intensidad integrada, y el valor promedio de gris. También, se tomaron los registros de otras regiones sin fluorescencia al lado de la célula para usarlos como fondo de fluorescencia. La cantidad neta de intensidad de fluorescencia por pixel, expresada como fluorescencia celular total corregida (CTCF por sus siglas en inglés: Corrected Total Cell Fluorescence), se calculó para cada trofozoíto de acuerdo a la siguiente fórmula (45 y 46):

CTCF= fluorescencia intracelular total – (área de la célula x fluorescencia del fondo)

Donde la fluorescencia intracelular total es la suma de la intensidad de los pixeles de cada célula (valor de la intensidad integrada); y la fluorescencia del fondo es el valor de la señal por cada píxel de la región sin fluorescencia medido junto a la célula (promedio de gris).

Para medir las vesículas teñidas, se obtuvieron los cortes en Z de 1- $\mu$ m de cada célula. La escala fue calibrada para medir y contar las vesículas con un diámetro de 2 a 14  $\mu$ m. Para determinar el número de vesículas teñidas con ambos fluorocromos, se utilizaron cortes celulares en Z de 1- $\mu$ m y se analizaron con el plugin JACoP (por sus siglas en inglés Just Another Co-localization Plugin) (47). Para calcular el porcentaje relativo de vesículas tenidas durante la pinocitosis y la fagocitosis, el número de vesículas teñidas con el anticuerpo 6C4 se tomó como 100%.

## **16. Ensayos de microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Se realizaron ensayos de eritrofagocitosis *in vitro* durante 0, 15 y 90 min, las muestras se cosecharon y fijaron con para-formaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.5% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Enseguida, las muestras fueron embebidas en una resina LR White (London resin company Ltd), la cual se polimerizó toda la noche a 4°C bajo luz

ultravioleta (UV). Posteriormente, se realizaron cortes ultrafinos (70 nm) de la resina polimerizada. Los cortes se colocaron sobre rejillas de níquel recubiertas de formvar al 0.53% disuelta en dicloroetano. Las muestras fueron lavadas dos veces con PBS, bloqueadas con 1% BSA durante 15 min y se incubaron con anticuerpo 6C4 toda la noche a 4°C. Los cortes fueron lavados e incubados durante 1 h con un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con partículas de oro coloidal de 20 nm (Ted Pella Inc.). Por último, las muestras se lavaron y observaron a través de un microscopio de transmisión Joel JEM-1011. Las partículas de oro se cuantificaron en cada 64  $\mu\text{m}^2$  en al menos 12 cortes.

## **17. Ensayos de inmunoprecipitación**

Trofozoítos que fagocitaron eritrocitos durante 90 min y trofozoítos en condiciones basales, se re-suspendieron en una solución de Tris-HCl (10 mM), NaCl (50 mM) con un coctel de inhibidores de proteasas (PHMB, IA, NEM and TLCK) y se lisaron mediante ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación usando el vórtex. Simultáneamente, 200  $\mu\text{l}$  de proteína G recombinante (rProteinG) acoplada a perlas de agarosa (Invitrogen), fueron incubados con 100  $\mu\text{g}$  del anticuerpo anti-EhCPADH, o el 6C4, o con el suero pre-inmune durante 2 h a 4° C con agitación suave

para generar el complejo rProteinG-anticuerpo. Después, las muestras se lavaron cinco veces con 0.5% BSA disuelto en PBS durante 5 min con agitación suave y centrifugación a 11,600 x g durante 2 min. Por otro lado, con el fin de eliminar las posibles interacciones inespecíficas de las perlas con el lisado celular, éste se incubó con 200  $\mu$ l de rProteinG durante 2 h at 4 ° C con agitación suave y se centrifugó a 11, 600 g. una vez que se obtuvo el lisado celular pre-aclarado, se incubó con las perlas de agarosa acopladas al complejo proteína G-anticuerpo a 4° C, ON. Las muestras se recuperaron mediante centrifugación y después de cinco lavados con PBS, las muestras se colocaron en una membrana de nitrocelulosa para detectar mediante ensayos de dot blot a la proteína EhADH o al LBPA con un anticuerpo secundario específico para las cadenas ligeras (1:10,000) (No. Cat. 115-035-174 and 211-032-171, Jackson ImmunoResearch). Como control se realizó el mismo procedimiento con eritrocitos humanos.

Para confirmar la identidad de las proteínas detectadas mediante los experimentos de dot blot, se agregaron 60  $\mu$ l de solución amortiguadora 4 X (40% glicerol, 240 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.04% azul de bromofenol y 5%  $\beta$ -mercaptoetanol) a los muestras inmunoprecipitadas, las cuales se hirvieron durante 3 min y se centrifugaron a 11,600 xg durante 2



min at 4 °C. Posteriormente, 30  $\mu$ l del sobrenadante se cargaron en geles de poliacrilamida al 12.5% SDS-PAGE; las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se realizaron ensayos de western blot usando el anticuerpo anti-EhADH y un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Zymed) (1:9 000).

### **18. Docking molecular**

La optimización de la geometría del ligando 2,2'-bisoleoyl-LBPA se realizó con el software Gaussian 03 (Frischet *et al.*, 2004), utilizando una base AM1. El modelaje molecular 3D de la proteína EhADH se construyó con el software I-TASSER (Zhang *et al.*, 2008) usando un ordenador iMac 2.7 GHz Intel core I5. El alineamiento de la proteína EhADH (Q9U7F6 UniprotKB) se realizó con el programa *protein-blast* (NCBI) con la secuencia 2R03 de la base de datos PDB. El docking se realizó usando el programa Molecular Operating Environment (MOE) (Chemical Computing Group Inc, Montreal, Quebec Canada). Se analizaron los sitios de interacción de la proteína EhADH completa y usando la secuencia reportada por Bissig *et al.*, 2013 localizada en el dominio Bro1. Para construir las mutantes, los residuos ubicados en el C-terminal de EhADH, fueron mutados *in silico* (L441A, D442A, S443A, E447R, Q651R, N655A and R663T); posteriormente, se

realizó el *docking* con el LBPA. Por otro lado, el Dominio Bro1 se mutó en los residuos Y89A, D90A, E95A, D96A, S97A, K98A, P99A, K101A and F102A; y los aminoácidos ubicados del 225-227 fueron deletados. Enseguida, se realizó una dinámica molecular en el cluster híbrido Xiuhciatl (<http://clusterhibrido.cinvestav.mx/>) usando el software NAMD 2.8 (50) y CHARMM27 (51), con un campo de fuerza GPU-CUDA. Las interacciones electrostáticas se midieron con Particle Mesh Ewald (PME).

Los átomos de hidrógeno se adicionaron usando el software psfgen del programa VMD (52). Los parámetros del campo de fuerza para no considerar uniones fueron de 9 Å y un tiempo de 2 fs. La energía de minimización del sistema fue de 1000 pasos seguidos por una estabilización de 1 ns sin restricciones. La dinámica molecular se realizó 25 ns usando un ensamble de NTC. Después de la dinámica molecular del dominio Bro1 mutado, se realizó el *docking* con el LBOPA a 0, 1, 10 y 14 ns.

## 19. Análisis estadístico

Las gráficas y el análisis estadístico se realizaron con el software GraphPadPrism 6. Cada punto de las gráficas representa las mediciones en

12-15 trofozoítos, los valores están dados en los promedios  $\pm$  la desviación estándar. Se aplicó la prueba de T de Student´s comparando los valores de cada uno de los tiempos con el primer tiempo analizado de las cinéticas. Los valores de p mayores a 0.05, no se consideraron como representativos estadísticamente. Los resultados entre 0.05 (\*) y 0.01 (\*\*), se interpretaron como representativos y los valores de p menores a 0.001 (\*\*\*), se reportaron como altamente significativos.

## RESULTADOS

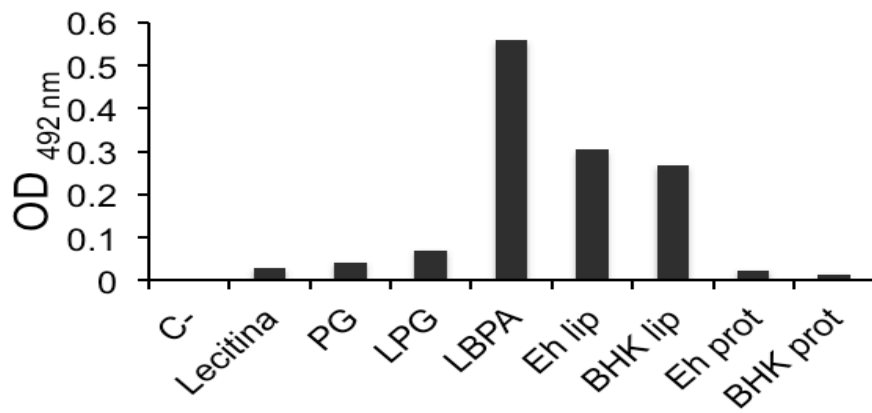
### Identificación del LBPA

#### 1. El LBPA está presente en lípidos de *E. histolytica*

En células de mamífero, se ha usado el anticuerpo 6C4 como marcador de endosomas tardíos, lisosomas y fagolisosomas. Por otro lado, con esta herramienta ha sido posible la caracterización funcional de este fosfolípido en varios procesos celulares (Kobayashi, et al. 2000). En este trabajo, con el fin de identificar el LBPA en lípidos de *E. histolytica*, se realizaron ensayos de ELISA usando el anticuerpo 6C4. Se utilizaron placas recubiertas con lecitina de huevo, la cual es una mezcla natural de fosfolípidos; también se usaron los estándares de PG y LPG que son posiblemente los precursores en la vía de síntesis del LBPA. Como control positivo, se usó el estándar de LBPA y extractos de lípidos de células BHK. Por otro lado, se usaron extractos de proteínas y lípidos extraídos de trofozoítos y de células BHK. En la figura 8, se observó que el anticuerpo reconoce principalmente al estándar de LBPA y los extractos de lípidos, tanto de ameba como de los fibroblastos. En las muestras de proteínas se observó un ligero reconocimiento (Fig. 8A) que podría ser LBPA asociado a las mismas. Estos

resultados coinciden con el reporte de especificidad del anticuerpo 6C4 de Kobayashi et al. (1999). Además, el anticuerpo 6C4 reconoció a los lípidos totales de *E. histolytica* de manera dosis dependiente, no así a las proteínas (Fig. 8B). Con estos resultados, se demuestra la presencia de LBPA en los lípidos totales de *E. histolytica*.

A)



B)

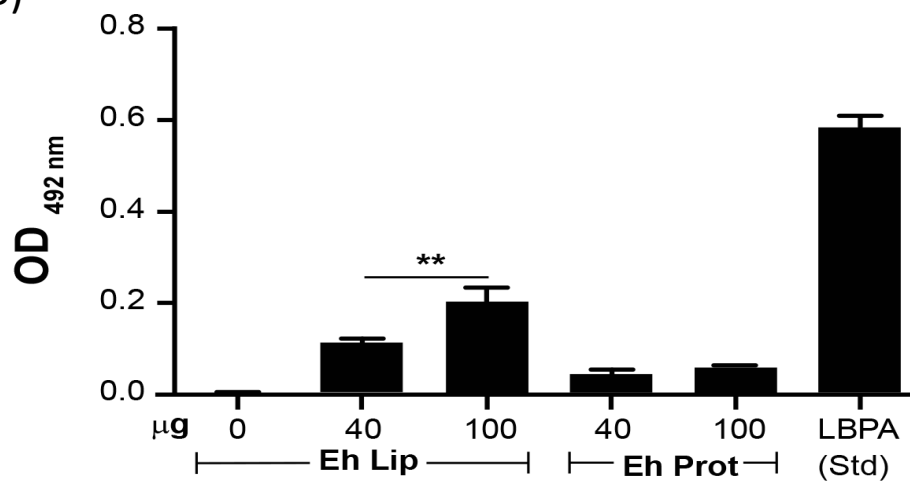


Figura 8. Inmunodetección del LBPA en muestras de distintos fosfolípidos por ensayos de ELISA. A) Las muestras que se utilizaron fueron lecitina de huevo, estándares de fosfatidilglicerol (PG), liso-fosfatidilglicerol (LPG) y (S,S´)-2,2´-bisoleoyl-LBPA, Eh lip: extractos de lípidos de *E. histolytica*; BHK lip: extractos de lípidos de células BHK; EH prot: extractos de proteínas de *E. histolytica*; BHK prot: extractos de proteínas de células BHK. B) Eh Lip: 40 y 100 µg; Eh prot: 40 y 100 µg; LBPA 10 µg de (S,S´)-2,2´-bisoleoyl-LBPA. Se uso el anticuerpo 6C4 que fue detectado con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa y la absorbancia se leyó a 492 nm.

Una vez que se detectó al LBPA en los trofozoítos de *E. histolytica*, se caracterizó estructuralmente al fosfolípido mediante técnicas de química analítica. Se sabe que cada familia de fosfolípidos tiene características fisicoquímicas particulares determinadas por su grupo polar, las cuales son útiles para la purificación e identificación de los diferentes compuestos. La TLC es una técnica que permite separar los lípidos de acuerdo a su polaridad permitiendo que el corrimiento cromatográfico de cada familia de fosfolípidos sea diferente. El LBPA se identificó en las membranas de lisosomas purificados de *Dictyostelium discoideum* mediante TLC por comparación del corrimiento cromatográfico con estándares (Rodríguez-Paris, et al. 1993).

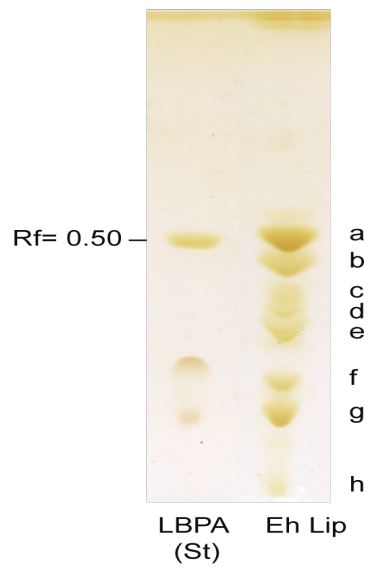
En este proyecto, con el fin de purificar los fosfolípidos con un patrón cromatográfico igual al del estándar (*S,S*)-2,2'-bisoleoyl-LBPA, los extractos de lípidos totales se procesaron mediante cromatografía en capa fina. Con las condiciones experimentales utilizadas, se determinó que el R<sub>f</sub> del estándar (*S,S*)-2,2'-bisoleoyl-LBPA es de 0.50. Al analizar el corrimiento cromatográfico de los extractos de lípidos de amiba, se observó que estos se separaron en ocho bandas, las cuales se nombraron con las letras A, B, C, D, E, F, G, y H. La fracción "A" presentó un corrimiento cromatográfico



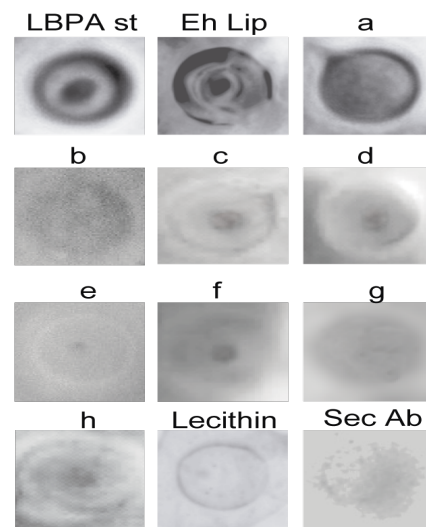
con un Rf de 0.50, al igual que el estándar (Fig. 9 A). Los compuestos contenidos en las fracciones “A-H” se extrajeron de la sílica con metanol-cloroformo (2:1 v/v), se secaron con nitrógeno líquido y se utilizaron para realizar ensayos de dot blot para confirmar que la fracción que co-migró con el estándar, también es reconocida por el anticuerpo 6C4. Por otro lado, los mismos compuestos se analizaron mediante LC-ESI-MS y MS/MS para identificar las especies moleculares del LBPA.

Para los ensayos de dot blot, las muestras extraídas de las fracciones “A-H”, lípidos totales, lecitina de huevo y el estándar (S, S´)-2,2´-bisoleoyl-LBPA re-suspendidas en isopropanol:agua (95:5% v/v) fueron colocados sobre una membrana de PVDF. Al revelar el anticuerpo 6C4 con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa, la reacción resultó positiva con la fracción “A”, los lípidos totales y el estándar. Como se esperaba, las reacciones con la lecitina y los fosfolípidos extraídos de las otras fracciones resultaron negativas (Fig. 9B). Con estos experimentos, confirmamos que el LBPA es un componente de los lípidos de *E. Histolytica*.

**B**



**C**



**Figura 9. El LBPA forma parte de los fosfolípidos de *E. histolytica*.**

A) TLC de 50 mg de lípidos totales de *E. histolytica* (Eh Lip) y el estándar (S, S´)-2,2´-bisoleoyl-LBPA (Rf=0.50) (LBPA Std) revelado con vapores de iodo; fase móvil Isopropanol:*n*-Hexano:H<sub>2</sub>O (8:6:1.5, v/v/v). Las letras a la derecha señalan los fosfolípidos de amiba separados. B) Membranas de PVDF analizadas por dot blot con el anticuerpo 6C4 y revelado con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa: Lecitina; Spot A-H: fracciones “a-h” separadas por TLC en la figura 9 A; Eh Lip, lípidos totales; LBPA (STD): estándar (S, S´)-2,2´-bisoleoyl-LBPA y Sec Ab, reacción con anticuerpos secundarios.

## 2. Identificación de las especies moleculares de LBPA de *E. histolytica*

**Existen al menos seis especies moleculares de LBPA en los trofozoítos**

En distintas células de mamífero, se ha demostrado por HPLC y espectrometría de masas que la molécula de LBPA esterifica principalmente ácidos grasos insaturados y se han reportado más de 28 especies moleculares de LBPA de diversos tamaños, desde 719 hasta 889  $m/z$ , dependiendo de la longitud de sus grupos acilos (Kakela, et al. 2003). La relación masa/carga ( $m/z$ ) es una magnitud física usada en la electrodinámica de las partículas cargadas; y resulta de dividir la masa (la suma del peso molecular de los átomos que conforman la molécula) entre su carga eléctrica, que en el caso del LBPA es 1.

En esta investigación, con el fin de caracterizar el tiempo de retención de los estándares, y a su vez, optimizar las condiciones experimentales, se analizó el estándar (S,S)-2,2'-bisoleoyl-LBPA. En la figura 10 A se muestra el cromatograma (TIC por sus siglas en inglés total ion current) que

representa la intensidad del total de iones eluidos (eje *y*) a través del tiempo de corrida de HPLC expresado en minutos (eje *x*). Se observa un pico mayoritario con intensidad del 80% aproximadamente indicado con la flecha, cuya elusión es en el minuto 24.57. Los iones contenidos en esta curva, se detectaron con el espectrómetro de masas programado con la modalidad de cromatografía líquida con ionización por electronebulización (LC-ESI-MS por sus siglas en inglés *liquid chromatography - electrospray ionisation - mass spectrometry*) en modo *full scan*. Con este análisis, se encontró en el espectro un ion de 773.5 *m/z* (eje *x*) con intensidad del 100% (eje *y*) (Fig. 11 B), que corresponde al estándar de LBPA con dos ácidos oléicos (Kobayashi et al. 2002).

Como se mencionó anteriormente, la caracterización estructural de los fosfolípidos por espectrometría de masas, está basado en la relación *m/z* de las moléculas completas, y de los iones correspondientes a los grupos funcionales que las conforman. Esta técnica instrumental permite aislar las moléculas con determinada relación *m/z* en una trampa de iones, donde se genera la fragmentación de las mismas mediante su colisión con un gas inerte rompiendo los enlaces débiles de la molécula generando varios iones producto, los cuales corresponden a los grupos funcionales y diversos

fragmentos moleculares. El ion producto de la fragmentación que representa el grupo polar de los fosfolípidos, se considera como el ion precursor de cada familia de fosfolípidos. El ion precursor característico de los glicerofosfolípidos es de 153  $m/z$  y corresponde al glicerolfosfato.

Para comprobar la identidad del ion de 773.5  $m/z$  detectado por LC-ESI-MS, éste se fragmentó por espectrometría de masas en tándem MS/MS. En la figura 11, en el eje  $y$  se observa la intensidad de los iones producto y en el eje  $x$ , la relación  $m/z$  de cada uno de ellos. El espectro de fragmentación es considerado como patrón de identificación del LBPA: el ion de 79  $m/z$ , corresponde al fosfato ( $\text{PO}_3^-$ ), el fragmento de 171  $m/z$  representa al grupo glicerolfosfato, sin embargo, es un ion inestable que tiende a perder agua generando el ion de 153  $m/z$  (Mortuza, et al. 2003); ([www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org)). También se observa el ion de 773.7  $m/z$  que corresponde a la molécula completa, la baja intensidad de este ion indica que las energías de colisión utilizadas son óptimas para la descomposición molecular. En este caso, también se generó un ion producto de mayor intensidad de 281  $m/z$ , el cual indica que se desprendieron dos ácidos grasos ( $\text{RCOO}^-$ ) de cada molécula de LBPA. Sin embargo, en otras especies moleculares de LBPA, los iones que corresponden a los grupos acilos pueden variar de masa

molecular, dependiendo de la longitud de los mismos; por lo tanto, estos no son considerados como parte del patrón de identificación del LBPA.

Con estos experimentos se caracterizaron los estándares estableciendo las condiciones experimentales de sistema LC-ESI-MS para identificar moléculas de LBPA por tiempo de retención, y por otro lado, se detectaron las energías de colisión óptimas para confirmar la identidad de los iones a partir del patrón de fragmentación, el cual está representado por los iones producto de 79 y 153  $m/z$ .

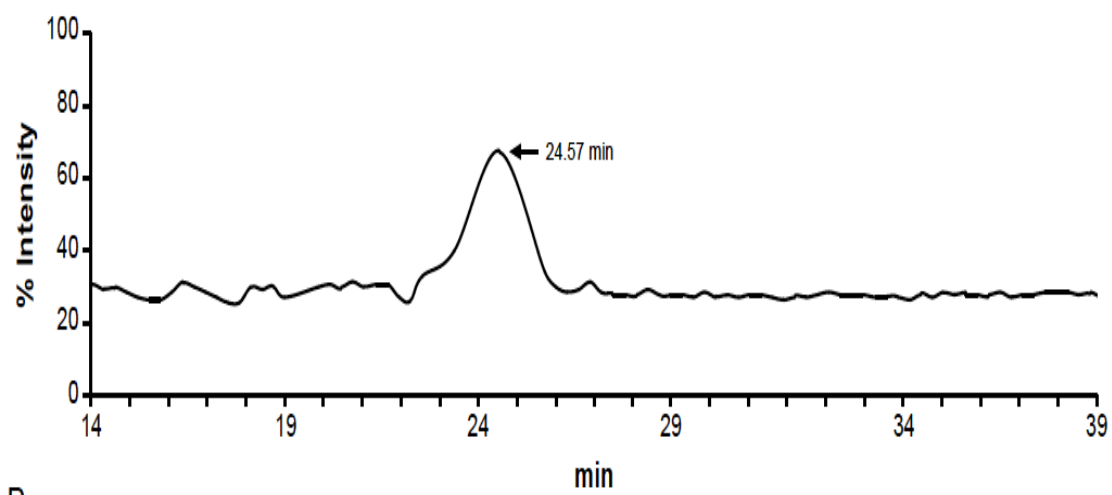
Posteriormente, se analizaron los compuestos contenidos en la fracción purificada por TLC correspondiente al LBPA de *E. histolytica* con el fin de determinar las especies moleculares de este fosfolípido. El espectro de masas de los fosfolípidos de amiba generado por LC-ESI-MS, reveló al menos seis iones que conforman dos grupos de iones de LBPA. El grupo I, está compuesto por tres iones con 772.58, 774.78 y 776.58  $m/z$ ; en el grupo II, se encontraron los compuestos con 798.78, 800.76 y 802.68  $m/z$  (Fig. 12). Los iones de cada grupo corresponden a moléculas de LBPA con los ácidos grasos esterificados de la misma longitud, pero con distintos niveles de insaturación (Tabla I). Con el fin de confirmar la identidad de los seis iones detectados por LC-ESI-MS, se generó el patrón de fragmentación de

cada uno de ellos mediante MS/MS en modo negativo *product ion scan*, resultando todos positivos al patrón de fragmentación del LBPA.

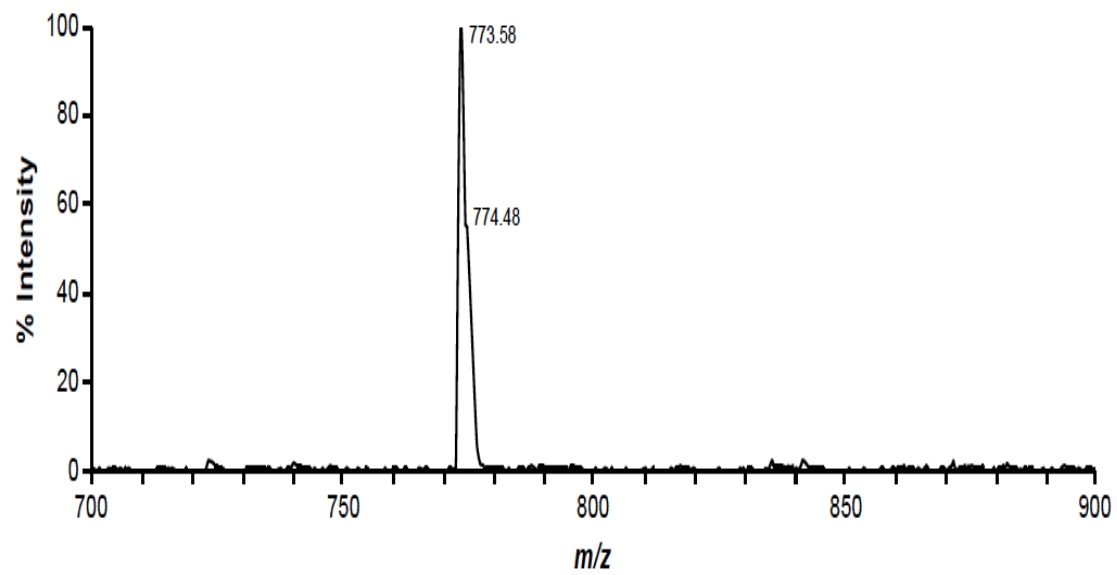
Por otro lado, para validar de otra forma que los iones detectados por LC-ESI-MS corresponden a moléculas de LBPA, los lípidos totales de trofozoítos se analizaron por infusión directa en el espectrómetro de masas con el modo negativo, ion precursor de 153 *m/z*. En este análisis, encontramos los seis iones encontrados mediante LC-ESI-MS descritos anteriormente. Este modo de análisis permite fragmentar los iones y detectar aquéllos que producen el ion de interés, en este caso, el de 153 *m/z* que corresponde a los glicerofosfolípidos.



A



B



*Figura 10.* Análisis por LC-ESI-MS del estándar (S,S)-2,2'-bisoleoyl-LBPA. A) TIC del perfil cromatográfico. B) Espectro de masas LC-ESI-MS de los iones eluidos en los minutos 14-39 y detectados en modo negativo *full scan*.

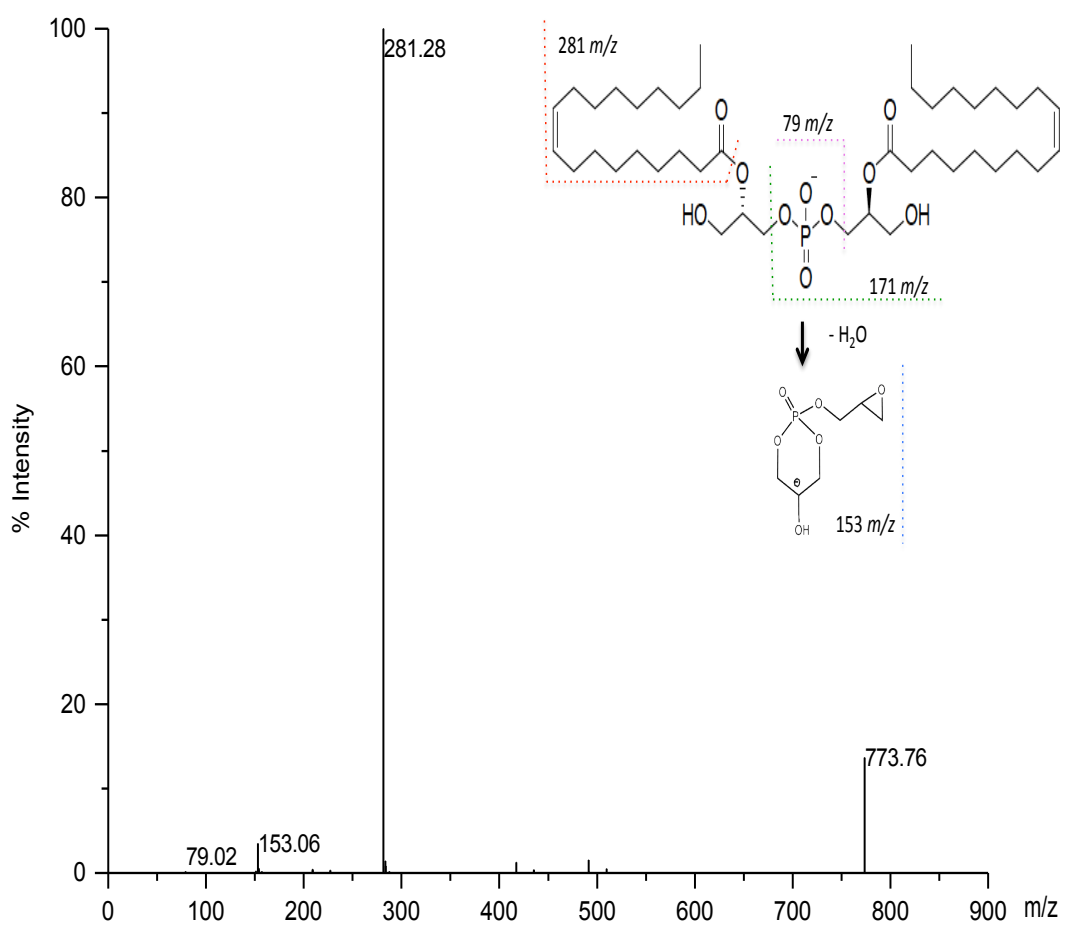


Figura 11. Patrón de fragmentación del (S,S)-2,2'-bisooleoyl-LBPA.  
Espectro de los iones producto de la fragmentación del ion de 773  $m/z$   
detectados por MS/MS en modo negativo *product ion scan*.

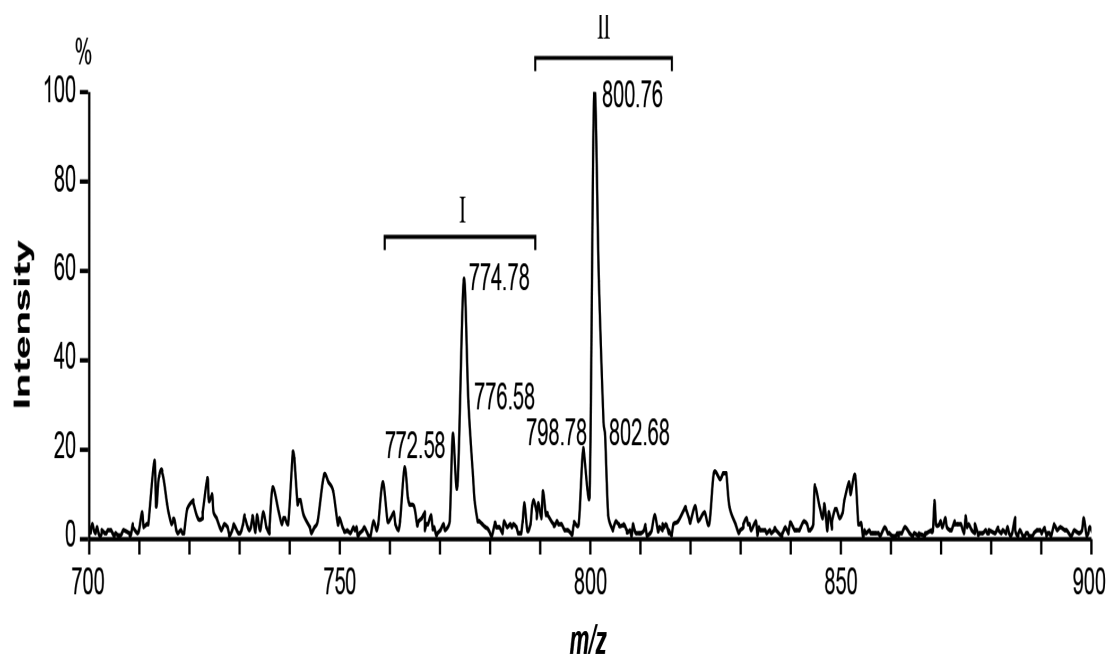


Figura 12. Existen al menos seis especies moleculares de LBPA en *E. histolytica*. Espectro obtenido por ESI-MS de los iones eluidos al minuto 24-25 de la fracción “A” purificada por TLC de los lípidos totales de *E. histolytica*.

Los experimentos realizados en este trabajo, permitieron validar la identificación de las especies moleculares de LBPA por tres metodologías, por tiempo de retención durante la corrida de HPLC, por espectrometría de masas por medio del patrón de fragmentación y por el análisis de ion precursor de 153  $m/z$ . Además los seis iones encontrados, coinciden con las especies moleculares reportadas en varios tipos de células de mamífero (Luquain, et al. 2000); (Luquain, et al. 2001); (Masafumi, et al. 2001); (Kobayashi, et al. 2002); (Meikle, et al. 2002); (Mortuza, et al. 2003); (Kakela, et al. 2003); (Meikle, et al. 2008). Con lo cual se concluye, que existen al menos seis iones principales de LBPA en la composición lipídica de *E. histolytica*, posiblemente, con otras condiciones experimentales se detecten otras más.

### **EL LBPA de *E. histolytica* más abundante es de subclase 38:3(18:1/20:2)**

Los resultados obtenidos con el cromatógrafo acoplado al espectrómetro de masas, se describen en la tabla 1 indicando la relación  $m/z$  de los iones detectados, la subclase de fosfolípidos y la abundancia relativa de las

especies moleculares de LBPA identificadas. Las especies moleculares se determinaron con base en los iones reportados en otros sistemas y la abundancia relativa se determinó de acuerdo al área bajo la curva (cuentas por segundo de intensidad CPS) de los espectros generados por LC-ESI-MS. Los seis iones moleculares de LBPA detectados en este trabajo, representan la subclase de fosfolípidos 36 y 38 con los niveles de insaturación desde 1 hasta 4. Los ácidos grasos más abundantes son insaturados 18:1 y 20:2. El único ácido graso saturado encontrado fue el 18:0. El ion de LBPA con mayor abundancia relativa es una molécula asimétrica de subclase 38:3 (18:1/20:2).



Tabla 2. Especies moleculares de LBPA en *E. histolytica*

Ion Molecular	<i>m/z</i>	Subclase	Especie Molecular	Abundancia Relativa
1	772.58	36:3	18:1/18:2	10
2	774.48	36:2	18:1/18:1	25
3	776.58	36:1	18:1/18:0	4
4	798.72	38:4	18:0/20:4	8
5	800.76	38:3	18:1/20:2	43
6	802.68	38:2	18:1/20:1 (18:0/20:2)	11

Tabla 2. Ion molecular: número consecutivo asignado con base en la relación  $m/z$  de manera ascendente.  $m/z$ : donde  $m$  es la suma del peso molecular de los átomos que componen el ion/ $z$ : número de carga (1). Subclase: suma del número de carbonos de los dos ácidos grasos: número de insaturación de ambas cadenas alifáticas. Especies moleculares: longitud y nivel de insaturación de cada uno de los ácidos grasos expresados con el número de carbonos: número de insaturaciones del grupo acilo 1/número de carbonos: número de insaturaciones del grupo acilo 2. Abundancia relativa: determinada de acuerdo al área bajo la curva de los iones en el espectro LC-ESI-MS.

### 3. Localización celular del LBPA

#### **El LBPA se encuentra en las vesículas ácidas de trofozoítos**

En trofozoítos de *E. histolytica*, el LBPA fue identificado a través de microscopía electrónica de transmisión con el anticuerpo 6C4 y anticuerpos secundarios marcados con partículas de oro. Las imágenes de TEM mostraron que el LBPA se encuentra distribuido en el citoplasma y en vesículas de diferentes tamaños (Fig. 13A). El número de partículas de oro se contaron en las imágenes encontrando que en promedio, el 71.8% se encuentra en vesículas, mientras que el 28.2% en el citoplasma (Fig. 13B). Estos resultados coinciden con la localización reportada del LBPA en otras células de mamíferos (Kobayashi, et al., 2000).

Se sabe que LBPA se encuentra asociado a endosomas tardíos, lisosomas y fagolisosomas en varias células de mamíferos y organismos de otros reinos, como es el caso de la amiba *Dictyostelium discoideum* (Rodriguez-Paris, et al. 1993). Para determinar el tipo de las vesículas que contienen el LBPA, se realizaron ensayos de co-localización con el anticuerpo 6C4 y el marcador de lisosomas Lysotracker Red, el cual, emite fluorescencia en presencia de protones. El anticuerpo 6C4 se detectó con un anticuerpo secundario

acoplado a FITC (verde). Las imágenes de microscopía confocal muestran que el LBPA se encuentra difuso en puntos citoplasmáticos y en vesículas de diferentes tamaños (Fig. 14). También se observó que el LysoTracker Red (rojo) tiñe de vesículas de distintos tamaños. Analizando el empalme de los dos canales, se demostró la co-localización de ambos marcajes en color amarillo representa el 74.6% de las vesículas de 2-14 micras de diámetro con una asociación molecular de 0.699, según coeficiente de Pearson's [47]. Sin embargo, el observar vesículas teñidas únicamente con LysoTracker (26.4%) indica que todas las vesículas que contienen LBPA son ácidas, pero no todas las vesículas ácidas LBPA (Fig. 14). Estos resultados confirman que en trofozoítos de *E. histolytica*, como ocurre en otros sistemas [27], las vesículas que contienen LBPA tienen un pH ácido. En condiciones basales, dichas vesículas posiblemente participan en la endocitosis constitutiva de los trofozoítos.

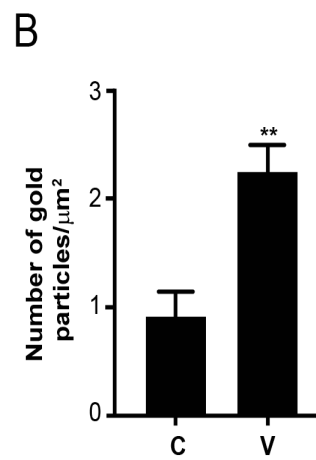
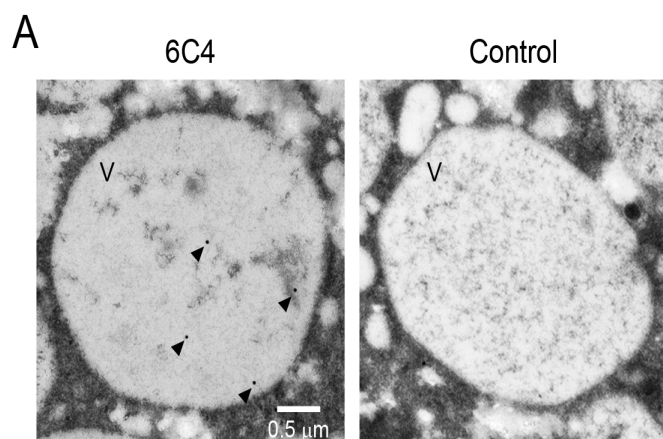


Figura 13. **El LBPA se localiza en el interior de vesículas citoplasmáticas.** A) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de un corte ultrafino de trofozoítos en condiciones basales tratadas con el anticuerpo 6C4 y un anticuerpo secundario marcado con partículas de oro coloidal (cabeza de flechas). Control: experimento realizado sin el anticuerpo 6C4. B) Media del número de partículas de oro/ $\mu\text{m}^2$  en C: citoplasma; V: vesículas.

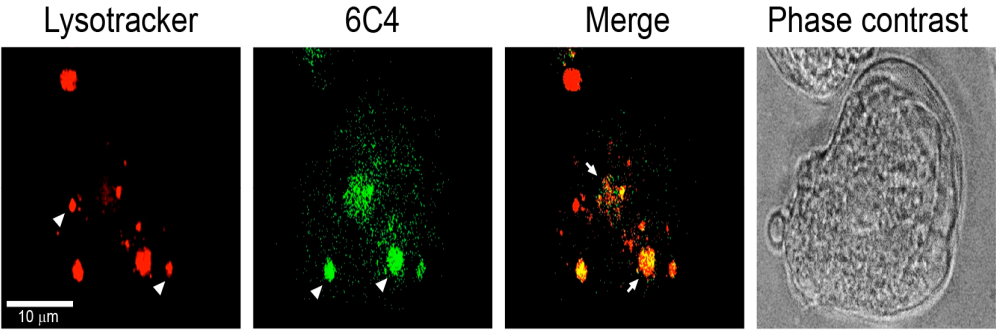


Figura 14. **Inmunolocalización celular del LBPA por microscopía confocal.** Trofozoítos incubados con el marcador de lisosomas LysoTracker Red (rojo) se fijaron y permeabilizaron. El anticuerpo 6C4 se detectó con un segundo anticuerpo anti-ratón acoplado a FITC (verde). El empalme de ambos canales (*merge*) muestra la co-localización del LBPA con las vesículas de contenidos ácidos (amarillo). En el panel de la derecha, una imagen de microscopio de contraste de fase. Cabeza de flechas: vesículas; flechas: vesículas teñidas con ambos fluorocromos.



#### 4. Distribución celular del LBPA durante eventos endocíticos

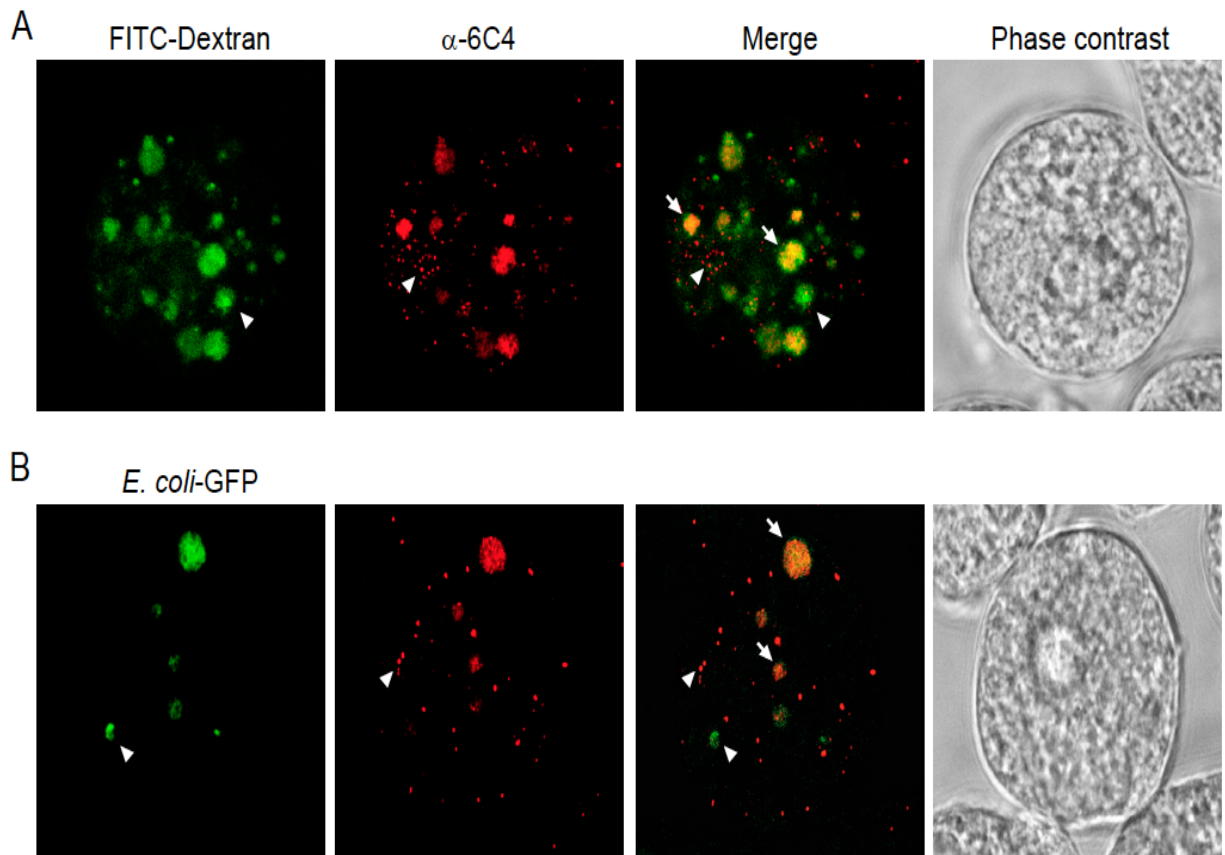
##### El LBPA co-localiza con pinosomas y fagosomas

Para determinar la localización celular del LBPA en trofozoítos durante eventos endocíticos, se marcó el fosfolípido y se detectó mediante inmunofluorescencia indirecta durante cinéticas de pinocitosis y fagocitosis.

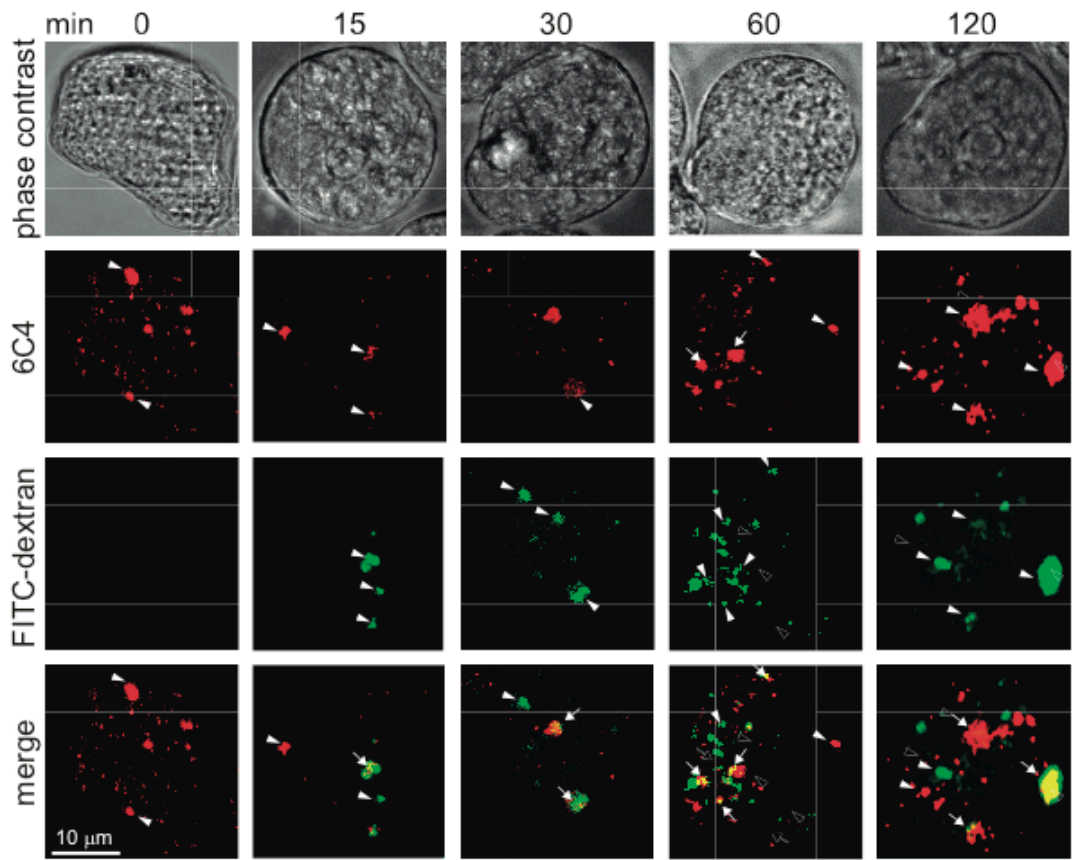
Para seguir la actividad endocítica de los trofozoítos, estos se incubaron con dextran acoplado a FITC (verde) y con bacterias *E. coli* que expresan GFP (verde) durante 15 minutos. Posteriormente, las células se fijaron e incubaron con el anticuerpo 6C4 que fue evidenciado con un anticuerpo anti-ratón marcado con Alexa-594 (rojo) (Fig. 15). Al empalmar ambos canales, se observó en amarillo (flechas) la co-localización del LBPA con algunos pinosomas (Fig. 15 A) y fagosomas (Fig. 15 B); sin embargo, también se detectaron vesículas con dextran o bacterias que no co-localizan con el LBPA (cabezas de flecha), y a su vez, el LBPA aparece en estructuras punteadas y difusas en el citoplasma sin co-localización (cabezas de flecha). Para investigar la participación de la LBPA en vías pinocítica, los trofozoítos se incubaron con dextran-FITC de 0 a 120 min; en seguida se fijaron, permeabilizaron y trataron con el anticuerpo 6C4

seguido anticuerpos secundarios acoplados Alexa-594, finalmente, se analizaron por microscopía confocal (Fig. 16). En estos experimentos, se observaron vesículas de distintos tamaños e intensidad durante la pinocitosis; a los 15 y 30 min, la marca fluorescente disminuye, a los 60 y 120 min se aprecian vesículas citoplasmáticas más grandes y con mayor intensidad de fluorescencia (Fig. 16). La fluorescencia intracelular correspondiente al LBPA se cuantificó y expresó como CTCF; la cual, disminuyó drásticamente en el 84% (6.3 veces) después de 15 min de pinocitosis (Fig. 17A). A los de 60 minutos, el nivel de LBPA aumentó restableciéndose a los mostrados por trofozoítos en condiciones de estado basal, mostrando una meseta después de los 60 minutos (Fig. 17A). De acuerdo con Aley et al., [53], la meseta significa que se ha alcanzado el equilibrio entre la endocitosis y excreción del dextran. Durante la pinocitosis, Se cuantificó el porcentaje relativo de estas vesículas teñidas con el dextran-FITC y el anticuerpo 6C4. Durante los 15 y 120 min de pinocitosis, el número de vesículas co-teñidas (Fig. 16 flechas) aumentó de 33.8% en 15 min a un 56.6% después los 120 min (Fig. 17B); la asociación entre el dextran-FITC y el LBPA fue de 0.61 a 0.7 de acuerdo al Coeficiente de Pearson (Fig. 17C). De acuerdo a los reportes de otros autores, el LBPA disminuye drásticamente al principio de la endocitosis debido a que los

fosfolípidos, incluyendo el LBPA, participan como aceptores y donadores de cadenas alifáticas para sintetizar otros metabolitos (Conrhad et al., 1999). Nuestros resultado sugieren que el LBPA de *E. histolytica* está presente en pinosomas en diferentes concentraciones durante las cinéticas de pinocitosis; es necesario estudiar las razones de la drástica disminución seguida del aumento de la concentración del LBPA durante la pinocitosis de *E. histolytica*.

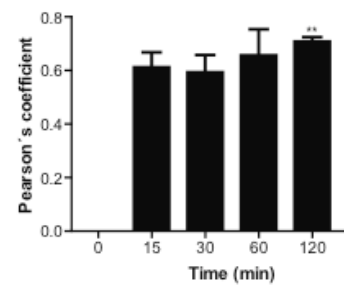
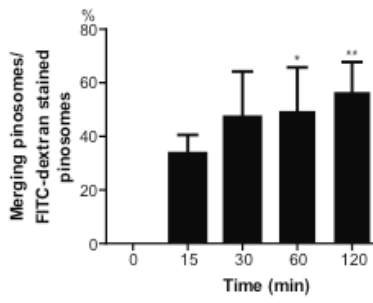
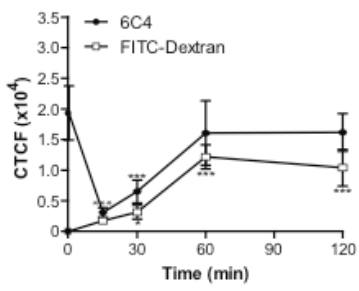


**Figura 15. Inmunolocalización del LBPA durante la endocitosis.** Trofozoítos incubados durante 15 minutos con A) dextran-FITC (verde) y B) *E. coli*-GFP, se fijaron y permeabilizaron. El anticuerpo 6C4 se detectó con anticuerpos secundarios acoplados a Alexa-594 (rojo). *Merge*: se muestra el empalme de los canales descritos anteriormente. La imagen de la derecha muestra el contraste de fase.



**Figura 16. Inmunolocalización del LBPA durante la pinocitosis.**

Imágenes de microscopía confocal de trofozoítos incubados con dextran-FITC a diferentes tiempos a 37 °C. El LBPA fue detectado con el anticuerpo 6C4 y anticuerpos secundarios acoplados con Alexa-594. Flechas: Colocalización de la LBPA y partículas ingeridas de dextran. Puntas de flecha: vesículas teñidas con LBPA o dextran-FITC.





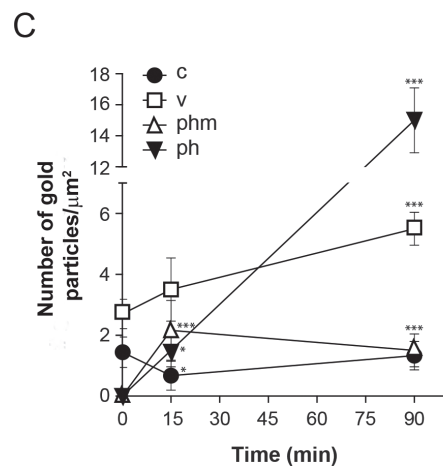
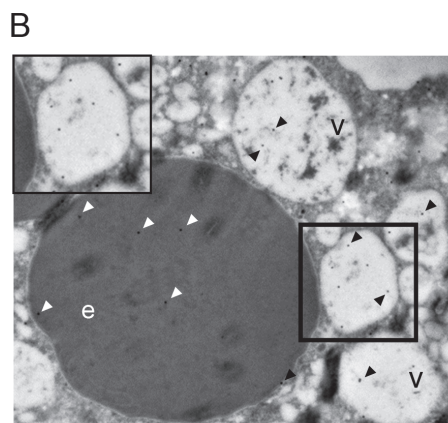
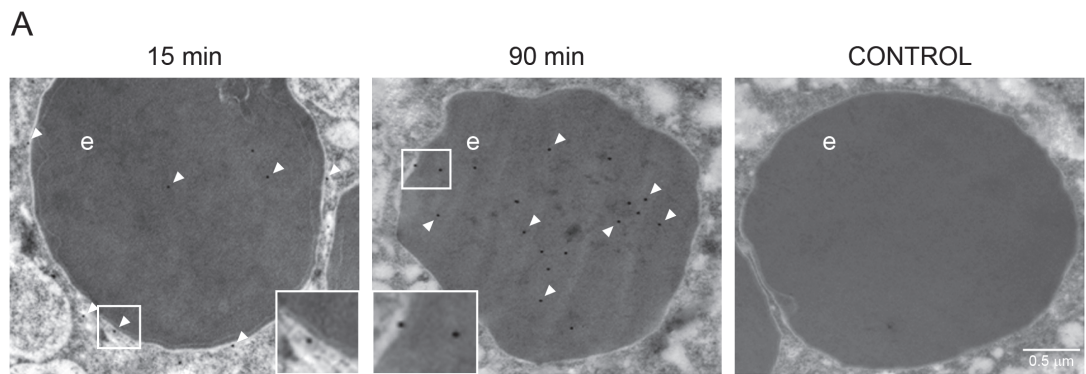
**Figura 17. Cuantificación de fluorescencia intracelular correspondiente a LBPA y dextran-FITC durante la pinocitosis.** Las imágenes de microscopía confocal fueron analizadas utilizando el software Image J 1.48i para medir: A) Fluorescencia intracelular del anticuerpo 6C4 y dextran-FITC. CTCF: fluorescencia total corregida intracelular. B) Porcentaje relativo de vesículas co-teñidas con el anticuerpo 6C4 y dextran-FITC durante la pinocitosis. C) Asociación de moléculas según el Coeficiente de Pearson (PC). Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar. (\*):  $p < 0,051$ , (\*\*):  $p < 0.001$ .

## El LBPA se encuentra en fagosomas que contienen eritrocitos

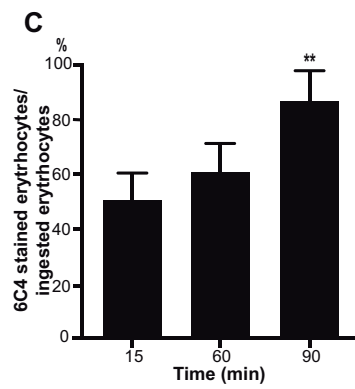
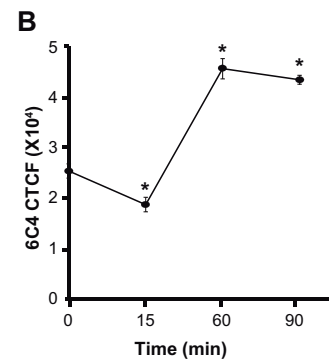
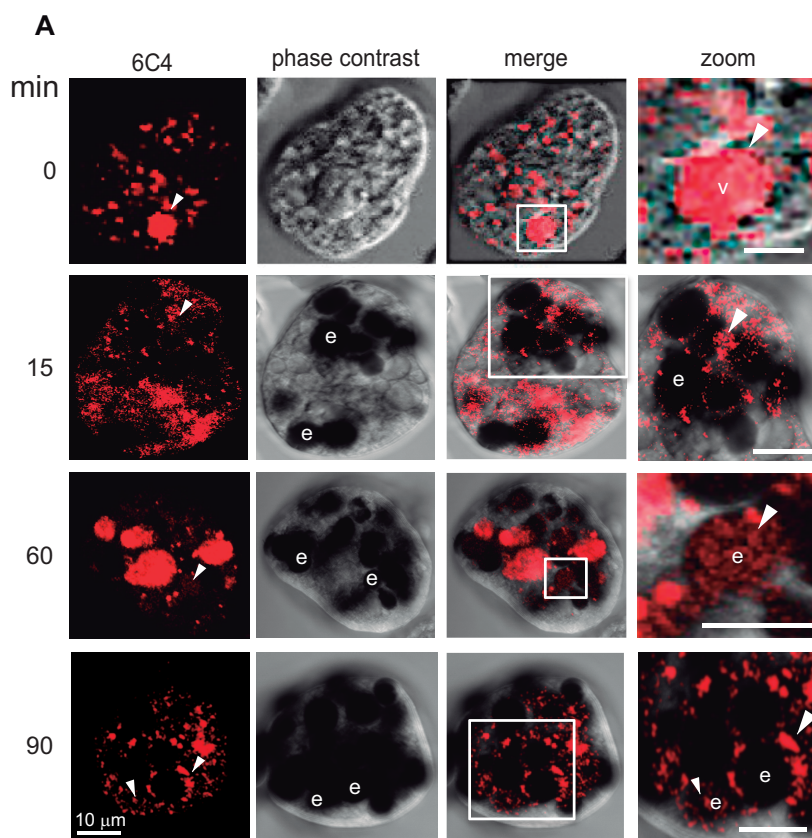
Con el objetivo de inmunolocalizar el LBPA durante uno de los principales eventos de la virulencia de *E. histolytica*: la fagocitosis, se realizaron cinéticas de eritrofagocitosis y se observaron las muestras por microscopía. Para determinar las ultra estructuras celulares que albergan el LBPA en los trofozoítos durante la eritrofagocitosis, se realizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Fig. 18). En las imágenes se observan cortes de trofozoítos incubados con eritrocitos durante 15 y 90 min. A los 15 minutos, la marca se observó en el interior de algunas vacuolas cercanas a los eritrocitos, 2.1 partículas de oro por  $\mu\text{m}^2$  en la membrana limitante de los eritrofagosomas y 1.5 dentro de los eritrocitos (Fig. 18A, C). En contraste, a los 90 minutos de interacción celular, la cantidad del LBPA aumentó 11 veces sobre los eritrocitos endocitados en comparación con los tiempos tempranos (Fig. 18A, C). El control se procesó de sin usar el anticuerpo primario 6C4. La cuantificación de partículas de oro demuestra que el LBPA aumenta dos veces en las vesículas citoplasmáticas en el proceso de eritrofagocitosis de 2.7 en el tiempo 0 a 5.5 en 90 min (Fig. 18B, C); sugiriendo que podría estar ocurriendo la fusión entre de vesículas con los fagosomas.

Por otro lado, las imágenes de microscopía confocal demostraron que en condiciones de estado basal, el LBPA se acumula en vesículas de diferentes tamaños (4-10  $\mu\text{m}$ ). Sin embargo, el fosfolípido se encontró en grandes vesículas después de 60 min de la fagocitosis (Fig. 19A). Mediante la comparación de la CTCF con el tiempo 0, se demostró que el LBPA disminuyó un 36% a los 15 min de la fagocitosis, después aumentó 1,6 veces, es decir, un 60% más en el minuto 60 y 90 (Fig. 19B). Además, el porcentaje relativo de eritrocitos teñidos con LBPA también aumentó 1.72 veces, de 49.7% en 15 min a 85.7%, en 90 min (Fig. 19C).

En conjunto, estos resultados confirman que el aumento del LBPA en los fagosomas sucedió después de 15 min de la fagocitosis; lo cual nos permite inferir que el LBPA participa en la fagocitosis y forma parte de fagosomas y lisofagosomas, como se ha reportado para otros sistemas [27, 55, 56].



**Figura 18. Inmunolocalización del LBPA durante la eritrofagocitosis.** A) TEM de fagosomas de trofozoítos incubados con eritrocitos 15 a 90 minutos a 37 °C, el LBPA fue localizado utilizando el anticuerpo 6C4 y un anticuerpo secundario marcado con oro. Puntas de flecha: partículas de oro. Control: Los análisis realizados utilizando anticuerpos sólo secundaria. B) Fagosoma con partículas de oro en vacuolas alrededor de los eritrocitos. C) Cuantificación de partículas de oro durante la fagocitosis. v: vesículas; c: citoplasma; MPh: membrana del fagosoma; Ph: fagosoma. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. (\*):  $p < 0.05$ , (\*\*):  $p < 0.001$ , (\*\*\*) :  $p < 0.0001$ .

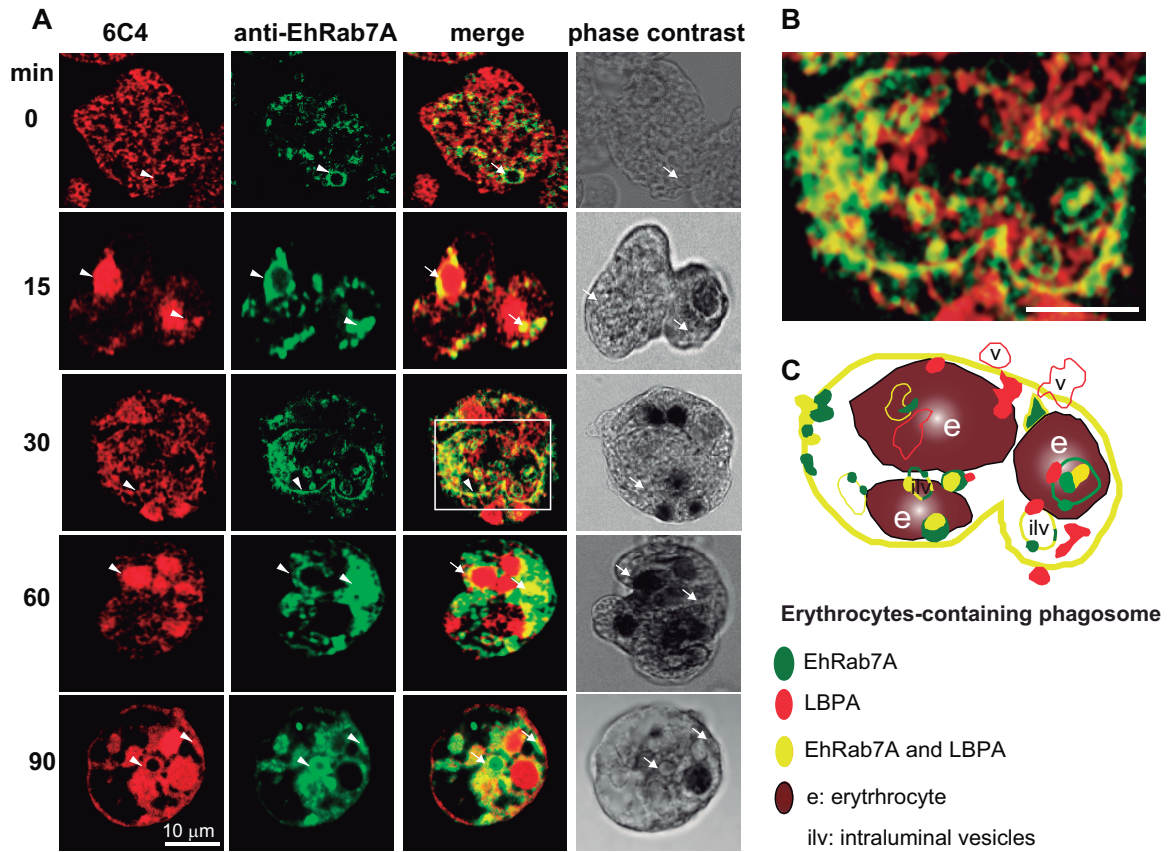


**Figura 19. Inmunolocalización celular del LBPA durante la fagocitosis detectada por microscopía confocal. A)** Imágenes de trofozoítos incubados con eritrocitos 15 a 90 minutos a 37 °C, el LBPA fue localizado utilizando el anticuerpo 6C4 y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa-694. Puntas de flecha: Vesículas teñidas. B) Fluorescencia intracelular del anticuerpo 6C4. CTCF: fluorescencia total corregida intracelular. C) Porcentaje relativo de fagosomas teñidas con el anticuerpo 6C4 y Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar. (\*):  $p < 0,051$ , (\*\*):  $p < 0.001$ .

## 5. Asociación del LBPBA con la proteína EhRab7A

La investigación de las interacciones moleculares ha permitido entender mejor los procesos endocíticos del parásito. En células de mamífero, las GTPasas Rab7 son consideradas marcadores de endosomas tardíos, ya que participan en la regulación del tráfico molecular a través de los endosomas hacia los endosomas tardíos y lisosomas. En el *E. histolytica* se encuentran varios genes que codifican para las proteínas Rab7. EhRab7A se ha encontrado en los fagosomas después de los 30 min de fagocitosis. De acuerdo a Saito-Nakano y colaboradores, esta molécula participa en la maduración de endosomas tardíos y está presente en vesículas de reciclaje de los fagosomas hacia el aparato de Golgi (cBredeson, et al. 2005). para determinar la asociación del LBPBA de *E. histolytica* con EhRab7A durante la eritrofagocitosis, realizamos ensayos de co-localización usando los anticuerpo 6C4 y anti-EhARab7A (Fig. 20). En condiciones basales, encontramos que ambas moléculas se asocian en pequeñas vesículas. Durante la eritrofagocitosis, el porcentaje de co-localización entre ambas moléculas aumentó, principalmente alrededor de los eritrocitos ingeridos y dentro fagosomas multivesiculares que contienen eritrocitos y vacuolas (Fig. 20B).





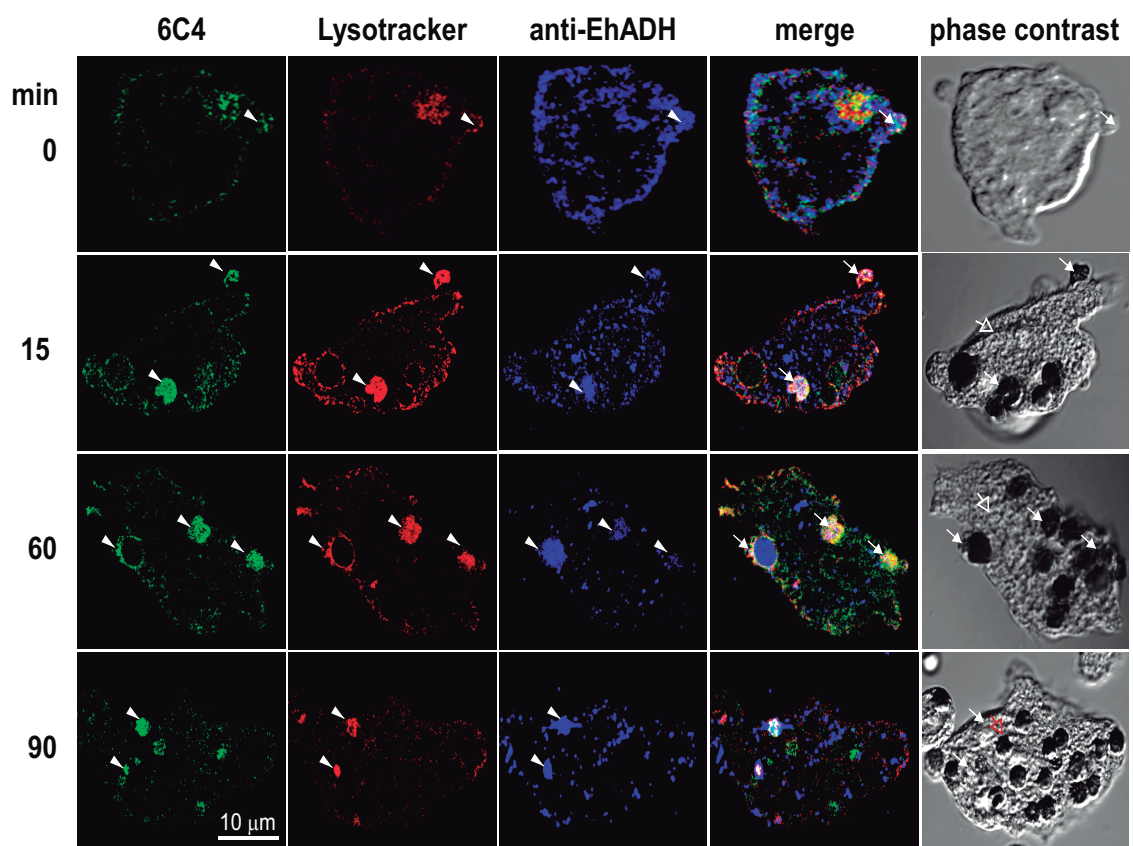
**Figura 20. Co-localización del LBPA y EhRab7A durante la eritrofagocitosis.** Imágenes de microscopía confocal de trofozoitos en condiciones basales (0 min) y después de la incubación con eritrocitos a diferentes tiempos. Los trofozoitos fueron tratados con los anticuerpos 6C4 y anti-EhRab7A, seguidos por anticuerpos secundarios marcados con FITC y TRITC, respectivamente. Contraste de fase + Merge: empalme de imágenes de los dos canales además de contraste de fase. Zoom: la ampliación de la zona de plazas de contraste de fases y el empalme. Puntas de flecha vacías: fagosomas; Puntas de flecha llenas: vesículas; Flechas: co-localización de fluorocromos; e: eritrocitos. B) Ampliación del cuadro mostrado en merge, 30 min. C) Esquema del fagosoma multivesicular mostrado en B.

## **6. El LBPA interactúa con la proteína EhADH en condiciones basales y durante eventos de fagocitosis.**

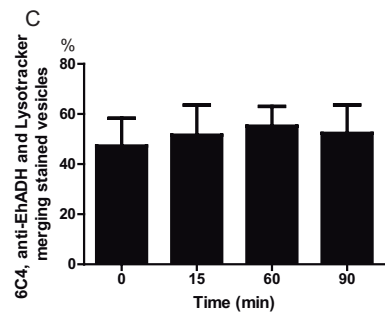
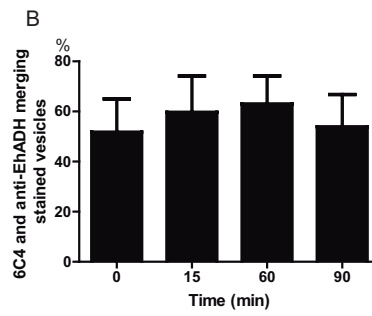
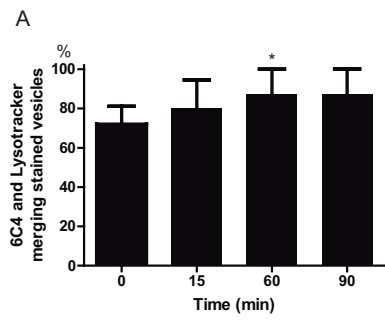
En células de mamífero, el LBPA está involucrado en eventos de tráfico vesicular asociado a la proteína Alix (Matsuo et al., 2005); (Bissig, et al. 2013). Por lo tanto, en este trabajo de investigación también nos enfocamos en determinar si el LBPA detectado interacciona con la proteína EhADH, la cual también forma parte de la familia Alix y a su vez, se ha reportado que participa activamente durante la fagocitosis de *E. histolytica* (García-Rivera et al., 1999; Bañuelos et al., 2012). Se realizaron cinéticas de eritrofagocitosis y ensayos de triple marcaje de ambas moléculas y LysoTracker Red mediante microscopía confocal utilizando el anticuerpo 6C4 y anti-EhADH seguidos de anticuerpos secundarios acoplados con Alexa-594 y FITC, respectivamente.

Se sabe que el LBPA se encuentra en vesículas con un pH de 5.5 aproximadamente y que este fosfolípido interactúa con la proteína Alix durante el tráfico vesicular. En *E. histolytica*, la proteína EhADH actúa como receptor de eritrocitos durante la fagocitosis y participa en la formación de endosomas, interactuando con la proteína EhVps32 (yunuen). Nosotros investigamos la naturaleza de las vesículas que contienen LBPA asociado

con EhADH utilizando el LysoTracker Red y los respectivos anticuerpos. Las imágenes de microscopio confocal mostraron que en condiciones basales, los tres marcadores colocalizan (Fig. 21). La proteína EhADH se encontró en la membrana plasmática y en el citoplasma, como se ha reportado anteriormente (García-Rivera, et al. 1999). Durante la fagocitosis también se observó el triple marcaje. La asociación del LBPA y la EhADH se observaron en fagosomas y alrededor de algunos eritrocitos ingeridos, también en fagosomas que contienen células rojas y algunos fagosomas multivesiculares (Fig. 21). La asociación del LBPA con el LysoTracker red durante la fagocitosis aumentó del 72.6% hasta un 87% con un coeficiente de Pearson de 0.78. Sin embargo, también se observaron vesículas teñidas únicamente con el LysoTracker Red en porcentajes de 27.4-13% (Fig. 22A), sugiriendo que la mayoría de las vesículas ácidas de los trofozoítos contienen LBPA, como sucede en otros sistemas. Además, los resultados de estos experimentos evidenciaron la diferente composición de los endosomas, mientras que algunos se decoraron únicamente con los anticuerpos anti-EhADH, con 6C4 o con LysoTracker Red, otros mostraron co-localización de LBPA y EhADH (Fig. 22B) o se observaron con el triple marcaje (50%) (Fig. 22C).



**Figura 21. Co-localización del LBPA, EhADH y LysoTracker Red durante la eritrofagocitosis.** Imágenes de microscopía confocal de trofozoitos en condiciones basales (0 min) y después de la incubación con eritrocitos a diferentes tiempos. Los trofozoitos fueron tratados con LysoTracker Red y los anticuerpos 6C4 y anti-EhADH, seguidos por anticuerpos secundarios marcados con FITC y TRITC, respectivamente. Contraste de fase + Merge: empalme de imágenes de los dos canales además de contraste de fase. Zoom: la ampliación de la zona de placas de contraste de fases y el empalme. Puntas de flecha vacías: fagosomas; Puntas de flecha llenas: vesículas; Flechas: co-localización de fluorocromos; e: eritrocitos.



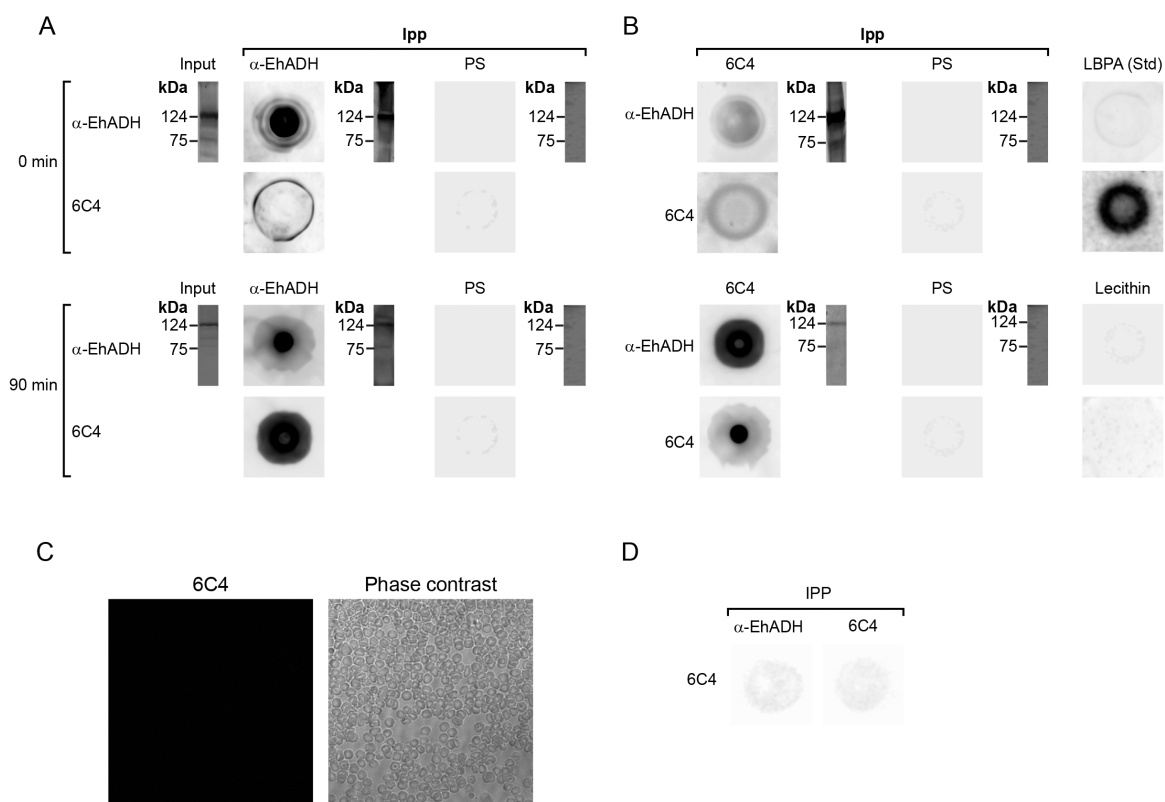
**Figura 22. Cuantificación de la asociación de los anticuerpos 6C4, anti-EhADH y el LysoTracker Red durante la fagocitosis.** Las imágenes de microscopía confocal fueron analizadas utilizando el software Image J 1.48i para medir: A) Porcentaje relativo de vesículas tenidas con el anticuerpo 6C4 y el LysoTracker Red. B) Porcentaje relativo de vesículas co-teñidas con el anticuerpo 6C4 y anti-EhADH. C) Porcentaje relativo de vesículas con triple marcaje. Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar. (\*):  $p < 0,051$ .



Para confirmar la interacción LBPA-EhADH, realizamos ensayos de inmunoprecipitación con extractos totales de trofozoítos en condiciones basales y de trofozoítos incubados con eritrocitos durante 90 min utilizando los anticuerpos 6C4 y anti-EhADH. Como control negativo se usó suero pre-inmune de conejo y se inmunoprecipitó con extractos de eritrocitos. Los inmunoprecipitados se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con vacío y se realizaron ensayos de dot blot usando los mismos anticuerpos: anti-EhADH y 6C4. Los inmunoprecipitados fueron reconocidos por ambos anticuerpos, tanto en condiciones basales (0 min), como en condiciones de fagocitosis (90 min). Además, realizamos ensayos de western blot de las mismas muestras con el fin de verificar el peso molecular de las proteínas detectadas con el anti-EhADH por dot blot. En todas las muestras, el anti-EhADH reconoció la proteína EhADH (75 kDa) y el complejo EhCPADH (124 kDa); lo cual coincide con lo descrito por García-Rivera et al., 1999 (Fig. 23).

Por otro lado, el anti-EhADH no reconoció la lecitina de huevo ni el estándar (S-S) -2, 2'-bisoleoyl-LBPA. El anticuerpo 6C4, reaccionó con el estándar como control positivo, no así con la lecitina. En los ensayos de dot blot y western blot, el suero pre-inmune no reaccionó con las muestras. Los

resultados con el lisado de eritrocitos fueron negativos. Con estos experimentos podemos inferir que el LBPA interactúa con EhADH, y que dicha interacción es más fuerte después de los 90 min de fagocitosis. Con todos los resultados aquí mostrados, se sugiere que el LBPA y EhADH están acoplados en fagosomas.



**Figura 23. Interacción del LBPA de *E. histolytica* y EhADH en condiciones basales y durante la fagocitosis.** Proteínas totales de trofozoítos en condiciones basales y después de 90 min de interacción con eritrocitos humanos, se incubaron con (A) anti-EhADH, (B) anticuerpo 6C4 o del suero previamente inmune (PS). Las muestras inmunoprecipitadas fueron colocadas en membranas de nitrocelulosa y se realizaron ensayos de dot blot utilizando los anticuerpos anti-EhADH y 6C4. A la derecha de cada dot blot, el western blot de la misma muestra usando el anticuerpo anti-EhADH. El (S,S)-2,2'-bisoleoyl-LBPA estándar (LBPA) y lecitina fueron tratados en membranas PVDF con los anticuerpos y 6C4 anti-EhADH. (C) control. Microscopía confocal de eritrocitos fijados, permeabilizados y teñidos con los anticuerpos 6C4. (D) inmunoprecipitación de eritrocitos lisados tratados con anti-EhADH y 6C4, revelado con el anticuerpo 6C4.

## La interacción *in silico* entre EhADH y LBPA implica el dominio Bro1 y el extremo carboxilo de la proteína EhADH

Se ha reportado que en células de mamíferos, el sitio de interacción de la proteína Alix con el fosfolípido LBPA, se localiza en el dominio Bro1 (Bissig et al., 2013). Por lo tanto, para predecir la interacción entre el LBPA y EhADH, realizamos análisis de *docking* molecular usando la proteína EhADH completa y por otro lado, su dominio Bro1 con el software *Molecular Operating Environment* (MOE). Los resultados del *docking* usando la proteína EhADH completa, mostraron dos sitios de unión al 2,2'-bisoyleoyl-LBPA ubicados en el dominio c-terminal de la proteína y en el dominio Bro1, cerca del sitio de interacción reportado por Bissig et al., 2013 (Fig. 24A). Al realizar los mismos experimentos con mutaciones en los residuos mencionados, la interacción de las moléculas en esta región se abatió (Tabla 3). La interacción del LBPA con el extremo C-terminal de la proteína EhADH está dada por los aminoácidos Gln651, Asn652, Gln655, Glu444, Glu447, Arg663 con una energía de -6.53 Kcal/mol (Fig. 24B). Las mutaciones de estos residuos abatieron dicha interacción molecular.

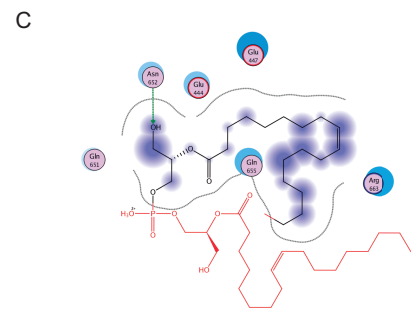
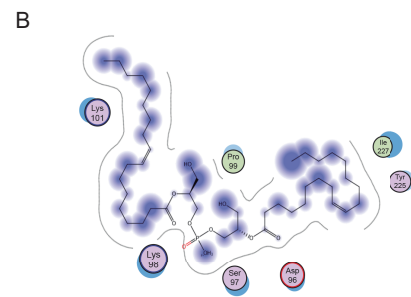
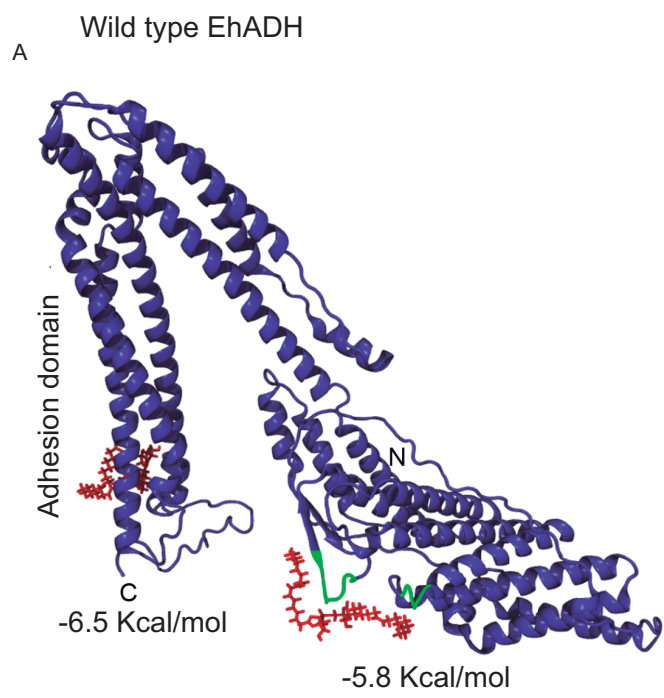
Tabla 3. Aminoácidos de EhADH que interacciona con el LBPA

<b>Bro1 domain</b>		<b>Adhesion domain</b>	
Residues interacting with LBPA <b>(-5.8037 kcal/mol)</b>	Mutations <b>(Not binding)</b>	Residues interacting with LBPA <b>(-6.5384 kcal/mol)</b>	Mutations <b>(Not binding)</b>
D96	D96A	E444	E444A
S97	S97A	-	D445A
K98	K98A	-	S446A
P99	P99A	E447	E447A
Y225	Deleted	Q651	Q651A
K226	Deleted	Q655	Q655A
I227	Deleted	R663	R663I

Curiosamente, nuestros resultados muestran que el sitio de interacción del LBPA con el dominio Bro1 de EhADH está situado en la superficie convexa de dicho dominio, en un loop que corresponde a los residuos 94-QEDSKPKK-101 y 224-FYKI-227 (Fig. 24 A en verde). En negritas, se muestran los residuos idénticos a la secuencia reportada en mamíferos, la cual está situada en los aminoácidos 101-110 y 232-235, respectivamente (Bissig et al., 2014). El valor de la energía libre para este enlace fue -5.8037 kcal/mol y la interacción fue dada por residuos de aminoácidos polares Lys101, Lys 98, Tyr335 y también con Pro99 y Ile227 (Fig. 24 C). Posteriormente, realizamos mutaciones *in silico* de los residuos Y89A, D90A, E95A, D96A, S97A, K98A, P99A, K101A y F102A; el docking realizado con el dominio Bro1 mutado, generó un enlace entre las moléculas de 15,4 Kcal/mol (Fig. 25A). Para comprobar la estabilidad de dicho enlace, se realizó una dinámica molecular a 1, 10 y 24 ns con el dominio Bro1 mutado y posteriormente el docking con el LBPA. Los valores de la energía fueron en 1 ns, 7.1 Kcal/mol (Fig. 25B) y a 10 ns 14.2 Kcal/mol (Fig. 25C); a 24 ns no resultó ningún enlace; demostrando que las mutaciones realizadas en dominio Bro1, evitan la interacción de EhADH con el LBPA. Estos resultados predicen que el sitio de unión para el LBPA en la proteína

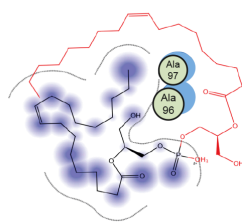
EhADH se conserva en *E. histolytica* con características de posición y estructura en 3D, de manera similar a lo reportado en mamíferos [40].





**Figura 24. Sitios de interacción predichos entre LBPA y EhADH mediante docking molecular.** A) Modelo tridimensional del acoplamiento de EhADH (morado) con LBPA (rojo); N y C: extremos N y C-terminal de EhADH respectivamente; color verde: sitio de interacción del dominio de EhADH con el LBPA correspondiente a 94-QEDSKPKK-101 y 224-FYKI-227. B) Diagrama de la interacción del LBPA con el dominio de adhesión situado en C-terminal de EhADH; en color rojo: fragmento del fosfolípido que no interactúan con la proteína. C) Diagrama de interacción del LBPA y el dominio Bro1 de la proteína EhADH. Los aminoácidos están representados con el código de tres letras.

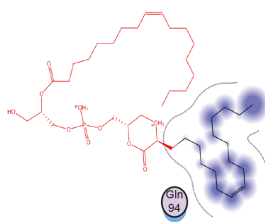
A



0 ns  
15.4 Kcal/mol

○ polar    ○ acidic

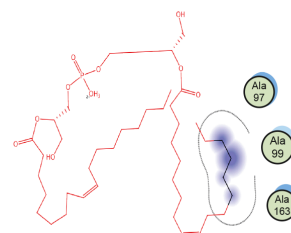
B



1 ns  
7.1 Kcal/mol

○ basic    ○ greasy    ● ligand exposure

C



10 ns  
14.2 kcal/mol

..... solvent contact

Figura 25. La mutación *in silico* del dominio Bro1 abate la interacción de EhADH y LBPA. Docking del LBPA con el Bro1 mutado después de realizar una dinámica molecular a (A): 0 ns, (B) 1 ns, (C) 10 ns. En rojo, el fragmento del fosfolípido que no interacciona con la proteína.

## DISCUSIÓN

La endocitosis, en términos generales, es un proceso necesario para la supervivencia celular, ya que le permite a la célula la internalización de los nutrientes, regular y/o reciclar los receptores de la membrana plasmática que participan en la señalización. Los procesos endocíticos consisten en el transporte de moléculas a través de los endosomas tempranos, MVB y endosomas tardíos. El material ingerido que llega a los endosomas tardíos, puede ser reciclado a través del trans-Golgi, o bien, degradado al ser transportado hacia los lisosomas (Gruenberg, 2003). Tanto en levadura como en humanos, se han caracterizado varias moléculas que orquestan la vía de la formación MVB, entre ellas, los complejos proteicos ESCRT, la proteína accesoria ALIX y los fosfolípidos de la familia del fosfatidilinositol. También, se ha demostrado que las proteínas NPC1 y NPC2 ubicadas en el endosoma tardío, controlan la distribución celular del colesterol internalizado junto con el fosfolípido LBPA, el cual es específico para endosomas tardíos y lisosomas (Kobayashi et al., 2002). El LBPA es una molécula importante para la etapa final de la vía endocítica y es considerado un marcador de endosomas tardíos y lisosomas (Kobayashi *et al.*, 2002), y

también, junto con la proteína ALIX, está involucrado en el proceso de reciclaje del material endocitado.

Además de los mamíferos, el LBPA se ha detectado en bacterias mediante experimentos bioquímicos, en las membranas de los lisosomas de *Dictyostelium discoideum* al ser purificado por TLC (Rodríguez-Paris et al.).

Por otro lado, *E. histolytica* es el agente causal de la amibiasis intestinal humana y tiene la habilidad de invadir tejidos, principalmente el hígado, ocasionando la formación de abscesos amibianos. Uno de los principales mecanismos de patogenicidad de este parásito es la fagocitosis (Rodríguez y Orozco, 1987). La fagocitosis es un mecanismo de endocitosis de partículas de gran tamaño. Existen varios estudios relacionados con las moléculas involucradas en la vía de los MVB de esta amiba. En 2010, López-Reyes identificó los genes que codifican para el complejo ESCRT y las proteínas accesorias en el genoma de la amiba, así como la expresión de los mismos y por RT-PCR en tiempo real. En el mismo trabajo, se reportó que trofozoítos transfectados con la ATPasa EhVPs4 y una mutante del sitio activo de la misma, disminuyen su actividad fagocítica, citolítica y su capacidad de causar daño hepático. Por otro lado, la proteína EhADH, considerada como homóloga a la proteína ALIX de humano, interacciona con

la subunidad EhVps32 del complejo ESCRT y a su vez, está involucrada en eventos de fagocitosis (Garcia-Rivera, et al. 1999); (Bañuelos, et al. 2005), (Bañuelos, et al. 2012 (Avalos-Padilla, et al. 2015).

Los lípidos, también juegan un papel importante en la vía endocítica, ya que la remodelación de membranas durante el tráfico vesicular es dinámica. Sin embargo, el estudio de lípidos de amiba y su función en los procesos celulares y de virulencia es un campo poco estudiado. Usando un polipéptido recombinante como sensor del PI3P, se demostró que este fosfolípido no se encuentra en pinosomas, pero sí en fagosomas (Powell, et al. 2005). También se sabe, que el  $PIP_3$  se encuentra en la membrana plasmática de los trofozoítos y que participa durante la primera fase de la formación de fagosomas, ya que se localiza en pseudópodos y las bocas fagocíticas de trofozoítos incubados con eritrocitos (Byekova, et al. 2009).

Con esta información, se sugiere que la vía de formación MVB y el funcionamiento del sistema endoso/lisosomal están conservados en *E. histolytica*, y que probablemente, está relacionada con los factores de virulencia del parásito. En este trabajo, identificamos seis especies moleculares de LBPA en trofozoítos de *E. histolytica*, así como demostramos su localización en pinosomas y fagosomas durante los e

eventos endocíticos. Además, mediante análisis de *docking* molecular encontramos que el sitio de unión de la proteína EhADH al LBPA es similar al descrito en a la proteína Alix de mamíferos (40).

### **Identificación del LBPA y determinación de sus especies moleculares**

La vía de síntesis del LBPA no se ha descrito a la fecha, aunque existe la hipótesis de que es a partir del precursor PG (Haullin et al, 2008). El PG es un isómero estructural del LBPA, ya que ambos tienen dos gliceroles unidos al grupo fosfato. EL LBPA tiene un ácido graso esterificado en cada uno de los gliceroles, a diferencia del PG que esterifica los dos acilos sobre el mismo glicerol. La vía de síntesis del LBPA, estipula que un grupo acilo es hidrolizado del glicerol por la acción de una fosfolipasa A y éste es transferido y esterificado a la cadena del segundo glicerol unido al fosfato por la acción de las enzimas transacilasas; sin embargo, no existen reportes sobre la caracterización de dichas enzimas o de los mecanismos que determinan la estero configuración de las moléculas de LBPA. Por lo tanto, en este trabajo, el estudio de la vía de síntesis del LBPA como estrategia para la identificación de este fosfolípido en *E. histolytica* resultaría poco contundente.



Como punto de partida de esta investigación, el anticuerpo 6C4 generado por Kobayashi et al. 1998, que es considerado un marcador de endosomas tardíos, resultó una herramienta útil para detectar específicamente al LBPA en lípidos de amibas mediante ensayos de ELISA. Con estos ensayos pudimos evaluar la especificidad de los anticuerpos anti-fosfolípido, los cuales no presentaron reacción cruzada con la mezcla de fosfolípidos contenida en lecitina de huevo, ni con el PG. El anticuerpo 6C4 reconoció ligeramente el LPG, que es considerado como un compuesto intermediario en la vía de síntesis o de degradación de cualquiera de los dos isómeros, PG y LBPA ya que consiste en el grupo fosfato con dos gliceroles y un solo ácido graso,. Sin embargo, la diferencia entre el reconocimiento del LPG y del LBPA es altamente significativa; al igual que la reacción ligeramente positiva que resultó con los extractos de proteínas de trofozoítos y células BHK en relación a las muestras de lípidos. Comparando los resultados del análisis de las muestras de lípidos extraídos de células BHK y de trofozoítos, se observa que la absorbancia aumenta en la muestra de amibas, aunque se usó la misma cantidad de lípidos de ambas células. Estos sugiere que el porcentaje de LBPA en relación a los lípidos totales de *E. histolytica* es mayor que en las células BHK; posiblemente, por la gran cantidad de vesículas citoplasmáticas que tienen los trofozoítos, que son considerados

células fagocíticas profesionales con un activo tráfico vesicular. También, el reconocimiento dependiente de la dosis del anticuerpo 6C4 de los lípidos de trofozoítos, confirma la presencia del LBPA en las membranas de *E. histolytica*.

Se ha demostrado que la composición lipídica de *E. histolytica* está integrada principalmente por los fosfolípidos de las familias de etanolamina, serina, colina, inositol y esfingosinas y que el ácido graso más abundante es el ácido palmítico (Sawyer, et al. 1967). También se sabe que los trofozoítos son capaces de sintetizar esfingofosfolípidos como la esfingomielina y otras dos ceramidas distintas a las de células de mamífero, como la ceramida etanolamiofosfato (CEP) y la ceramida aminoetilfosfonato (CAEP), las cuales, son abundantes en la membrana plasmática (Carbon, et al. 1980). En 1980, Aley y colaboradores caracterizaron por TLC en doble dimensión la composición lipídica de la membrana plasmática y de vesículas internas de *E. histolytica*, en donde reportan un fosfolípido no identificado que denominaron como "X". Actualmente, se sabe que el LBPA de células de BHK presenta un patrón cromatográfico similar al fosfolípido "X" de amiba (Kobayashi, et al. 1988), lo cual sugiere que se trata del mismo compuesto. Sin embargo, Aley et al. Identificó el compuesto "X" durante el

análisis de las membranas de *E. histolytica*; nosotros, detectamos en LBPA usando el anticuerpo 6C4 y espectrometría de masas. En este trabajo, nosotros no encontramos el LBPA en la membrana plasmática, pero si reportamos su localización en vesículas citoplasmáticas, pinosomas y fagosomas. El uso de metodologías instrumentales diferentes a las de Aley et al., nos lleva a mantener la pregunta si el compuesto “X” es el mismo que el LBPA.

El LBPA de células de mamífero tiene una estructura particular y diferente a los otros glicerofosfolípidos, ya que esterifica los ácidos grasos en el carbono C2 (C2') del glicerol, lo cual es una característica útil para su identificación porque presenta tiempos de retención característicos cuando se purifica por cromatografía líquida (Matsuo, et al. 2004); (Chevalier, et. al. 2000); (Luquain, et al. 2000); (Mortuza, et al. 2003); (Kakela et al. 2003).

Con la estrategia experimental utilizada en este trabajo, aislamos y caracterizamos estructuralmente al LBPA. Primero, separamos los lípidos totales por TLC en una dimensión y la fracción de fosfolípidos denominada “A” que presentó un corrimiento cromatográfico en una dimensión similar a lo reportado por Aley en 1980 y Kobayashi en 2002, y que además tiene el

mismo  $R_f$  que el estándar de LBPA. Los fosfolípidos extraídos de esta fracción se analizó mediante dot blot para inmunodetectar el LBPA de *E. histolytica* con el anticuerpo 6C4; por otro lado, la analizamos mediante espectrometría de masas para identificar las especies moleculares del LBPA.

En los ensayos de dot blot, el anticuerpo 6C4 reconoció de manera específica con la fracción “A”. Con estos experimentos confirmamos la presencia del LBPA en los lípidos de *E. histolytica*.

Las especies moleculares detectadas por LC-ESI-MS contenidas en la fracción “A”, coinciden con lo reportado previamente en diferentes tejidos mamíferos (Huterer and Wherrett, 1973); (Matsuo, et al. 2004); (Kobayashi, et al. 1998); (Luquain, et al. 2000); (Mortuza, et al. 2003); (Kakela et al. 2003). Se sabe que por espectrometría de masas, el ion precursor de 153  $m/z$  es diagnóstico para el grupo glicerolfosfato y que la diferencia en los patrones de fragmentación son mínimas entre los isómeros PG del LBPA. Sin embargo, el comportamiento cromatográfico de ambos compuestos es distinto, ya que el tiempo de retención del PG es aproximadamente siete minutos menor que el del LBPA (Mortuza, et al, 2003); (Kakela, et al. 2003), lo cual permitió separar y analizar el LBPA utilizando el sistema reportado por Mortuza *et al.*, 2003. Con esta

estrategia experimental, encontramos dos grupos con tres especies moleculares diferentes cada uno, sin embargo, es posible que existan más moléculas lipídicas correspondientes a LBPA en los lípidos de *E. histolytica* no detectados en este trabajo.

La composición de ácidos grasos relacionados con el LBPA, determina algunas de las propiedades biofísicas de la molécula que pueden impactar en su función. Encontramos que el LBPA de *E. histolytica* esterifica principalmente ácidos grasos insaturados de 18 y 20 carbonos, siendo los más abundantes el ácido oleico (18:1) y el eicosadienoico (20:2). Esta característica podría conferir a las membranas de los trofozoítos la propiedad de formar la curvatura de las membranas, necesaria para los procesos de fusión y fisión de vesículas, como sucede en otros sistemas. Se sabe que liposomas compuestos por, forman espontáneamente liposomas multivesiculares en función de un gradiente de pH. Esta característica biofísica ha sido relacionada con la flexibilidad de membranas y la formación de curvatura en las mismas; proceso necesario para la generación de ILVs (Matsuo et al., 2004).

La mayoría de las células estudiadas presentan varias especies moleculares de LBPA y presentan la característica de que la composición de ácidos

grasos es rica en ácidos grasos poli-insaturados e insaturados, siendo el más abundante el ácido oléico (18:1) (Kakela, et al. 2003; Kobayashi, et al. 2002; mCochran, et al. 1987; Mortuza, et al. 2003). Con los experimentos de LC-ESI-MS que realizamos en este trabajo, encontramos que la especie molecular más abundante de LBPA de *E. histolytica* es el ion de 18:1/20:2. Además, el ácido oléico (18:1) se observó con una abundancia relativa del 92%. En esta investigación, no hemos estudiado el significado biológico de la presencia de las diferentes especies moleculares detectadas, sin embargo, podemos sugerir que la mezcla de ellas puede proporcionar cierta flexibilidad a las membranas de los trofozoítos, siendo la propiedad necesaria para otras funciones relacionadas con la endocitosis, tales como la generación de ILVs y MVBs, así como el transporte de distintas moléculas.

Por otro lado, existen evidencias de que el LBPA de células de mamíferos participa activamente en la distribución del colesterol celular en conjunto con las proteínas ALIX (Kobayashi, et al. 1999; Matuso, et al. 2004) y NPC2 (Liscum and Fast, 1989); (Kobayashi, et al. 1999). Utilizando un modelo de liposomas, se demostró que la proteína NPC2 transfiere el colesterol a vesículas que contienen 2, 2'-dioleoyl-LBPA (18:1/18:1) con

mayor eficiencia a aquellos liposomas compuestos por 2, 2'-LBPA con cadenas de ácidos grasos más cortos y saturados (14:0/14:0), sugiriendo que la longitud de la cadena del acilo tiene un efecto sobre la estructura de la membrana y/o la interacción NPC2-LBPA, por lo tanto, la composición de ácidos grasos también afecta la eficiencia en el transporte de colesterol (Xu, et al. 2008). El LBPA de *E. histolytica* podría participar en la distribución celular del colesterol. Aunque los trofozoítos no tienen la maquinaria para sintetizar el colesterol, lo toman del medio y lo redistribuyen dentro de la célula en los distintos orgánulos. Con esta información, podemos sugerir que el LBPA esterificado con ácidos grasos de 18:1, podrían estar involucrados en el transporte de colesterol. Los genes que codifican para las proteínas NPC1 y NPC2, se han detectado en el genoma de *E. histolytica*, también las proteínas se han detectado en extractos totales de los trofozoítos mediante ensayos de western blot (Bolaños y Orozco, comunicación personal). Además de esta función putativa, las especies moleculares de LBPA de *E. histolytica* pueden tener un papel como donadores y aceptores de cadenas de ácidos grasos con otros tipos de fosfolípidos [54].

### **Localización de LBPA en trofozoítos**

Una vez que detectamos al LBPA en los lípidos de amiba, evaluamos su localización en trofozoítos fijados utilizando el anticuerpo 6C4, que, como ya se mencionó, es considerado un marcador de endosomas tardíos/lisosomas y fagolisosomas y se han utilizado para determinar la función celular del LBPA (Kobayashi, et al. 1998); (Mobius, et al. 2003); (Bissig C, et al. 2013). Nuestros resultados muestran que en condiciones basales, el LBPA se encuentra en estructuras punteadas difusas en el citoplasma y el 74.6% de las vesículas de diferentes tamaños presentaron una asociación con el LysoTracker de 0.699 de acuerdo al Coeficiente de Pearson. Debido a que no existen marcadores específicos para diferenciar los endosomas tempranos de los tardíos en trofozoítos, sin embargo, con nuestros resultados inferimos que el LBPA se encuentra en algunas vesículas ácidas formadas durante la endocitosis constitutiva de los trofozoítos. También sugerimos que el LBPA de *E. histolytica* puede participar en eventos celulares distintos a la endocitosis. Las estructuras punteadas citoplasmáticas marcadas con el anticuerpo 6C4 y observadas mediante microscopía confocal, podrían ser proteínas solubles transportadoras de fosfolípidos; sin embargo, esta hipótesis que nosotros proponemos, requiere comprobación experimental.



## Distribución celular del LBPA durante los procesos endocíticos

Con base en nuestros resultados, nosotros sugerimos que, como en los mamíferos, el LBPA de *E. histolytica* se localiza principalmente en las ILVs de los endosomas tardíos y que tiene una participación activa durante la endocitosis. El LBPA aparece en vacuolas de trofozoítos en condiciones basales y en aquellos que han endocitado dextran, bacterias y eritrocitos.

Siguiendo la vía pinocítica de los trofozoítos que han ingerido dextran-FITC, se observó que después de 15 min pinocitosis, la fluorescencia intracelular correspondiente al LBPA disminuyó de 6 a 7 veces, y después de 60 min aumentó la concentración alcanzando los niveles observados en las condiciones basales (Fig. 5). Los macrófagos, también presentan un porcentaje menor de LBPA en relación a los lípidos totales cuando son activados por la proteína BSG (4.1%), que cuando están en condiciones basales (18,6%) [54]. Cochran et al., mostraron que el LBPA es el fosfolípido que presentó mayor cambio de concentración después de la activación de los macrófagos. Estos autores también informaron que inmediatamente después de la activación, ciertos lípidos, incluyendo LBPA, son utilizados por los macrófagos para sintetizar otros metabolitos

funcionando como aceptadores o donantes de cadenas del ácido graso [54].

Se ha reportado que durante la pinocitosis, la acidificación de los pinosomas comienza en tiempos cortos (Meza and Clarke 2004), y de los 120 a 180 minutos, los trofozoítos comienzan a secretar el dextran previamente endocitado (Aley, et al. 1984); Meza y Clarke 2005. En células de mamífero, los MVB se han relacionado con la liberación de hidrolasas vesiculares y lisosomales. Posiblemente, el LBPA participa en eventos de secreción en fase fluida, y por este motivo, se re-localiza en vesículas grandes en tiempos largos de pinocitosis.

Aunque la endocitosis del dextran no es mediado por receptor en los trofozoítos, es posible que las células respondan al contacto con el compuesto y éste se acumule en vesículas mediante procesos de macropinocitosis [60]; como respuesta a este estímulo se podría activar la síntesis y degradación de distintos compuestos. Esto podría explicar por qué en el principio de la pinocitosis del dextran, el LBPA disminuye y después aumenta hasta llegar a la concentración de las condiciones basales. También resulta interesante que el porcentaje relativo de vesículas teñidas con el anticuerpo 6C4 se mantuvo a través del proceso de la cinética de

pinocitosis, incluso con los cambios en la concentración del LBPA, sugiriendo cambios en el tamaño de vesículas y en la concentración del LBPA en cada una de ellas; y la participación del fosfolípido en diversas funciones celulares.

Al evaluar la localización celular del LBPA en trofozoítos durante cinéticas de fagocitosis de eritrocitos humanos; observamos que a los 15 minutos, el fosfolípido se encuentra en vesículas pequeñas y bien definidas en el citoplasma; algunas de ellas cercanas a los eritrocitos endocitados. En contraste, después de los 60 minutos de eritrofagocitosis, la marca fluorescente aumenta y se agrupa co-localizando en los fagosomas que contiene eritrocitos y en otras vesículas citoplasmáticas. Es importante mencionar que cada eritrocito es internalizado por los trofozoítos a diferentes tiempos, por lo que se observan eritrocitos dentro de fagosomas en diferentes estados de maduración. Además, el anticuerpo 6C4 reveló diversos patrones de fluorescencia en un trofozoíto, posiblemente, porque también está reconociendo pinosomas formados durante la fagocitosis (Fig. 18).

La disminución de la concentración del LBPA después de 15 min de fagocitosis (36%) fue menos marcada que en la pinocitosis, posiblemente la

participación del LBPA en ambas vías es diferente. La fagocitosis es un evento mediado por receptor, por lo que los metabolitos necesarios para la síntesis y degradación de moléculas difieren con los requeridos para la pinocitosis.

La cuantificación de la fluorescencia intracelular demostró que después de 60 min de fagocitosis, la concentración del LBPA aumentó un 60% en comparación con el tiempo 0; y en este tiempo, las vesículas se observaron más grandes y más brillantes. De la misma manera, en los experimentos de TEM, el número de partículas de oro aumentó 11 veces en el minuto 90; también se observó en mayor cantidad de vesículas citoplasmáticas que rodean los eritrocitos. El aumento del LBPA en los tiempos largos de fagocitosis podría explicarse con la participación del fosfolípido en la distribución de las moléculas cargo hacia los lisosomas o al aparato de Golgi putativo de *E. histolytica* [61], como se ha reportado en células de mamíferos. Los procesos de digestión de los trofozoítos inician después de 90 min después de la fagocitosis [62], con nuestros resultados, es posible asumir que la LBPA podría contribuir en el transporte y reciclaje de determinadas moléculas.

En células de músculo liso, el número de fagosomas teñidos con el anticuerpo 6C4 aumentó después de 30 y 45 min de eritrofagocitosis sugiriendo la maduración del fagosoma a esos tiempos debido a la fusión de endosomas tardíos con los lisosomas y a su vez, los lisosomas con los fagosomas [56]. Con nuestros resultados en los experimentos de TEM, el observar mayor cantidad de vesículas que contienen LBPA alrededor de los eritrocitos, sugiere la fusión de los endosomas tardíos/lisosomas con el fagosoma para formar fagolisosomas. Como se mencionó con anterioridad, actualmente no existen marcadores específicos de endosomas formados durante la vía endocítica de este parásito, por lo que no nos fue posible identificarlos con mayor precisión para confirmar esta teoría.

La interpretación de estos resultados se refuerza con los reportes de la presencia del LBPA en fagolisosomas de macrófagos que contienen *Mycobacterias* (Vieira, et al. 2004) y *Leishmania mexicana* (Schaible, et al. 1999). En ambos casos, los procesos de fusión de fagosomas con lisosomas para formar los fagolisosomas que contienen LBPA, están regulados por una proteína adaptadora de las tirosina cinasas que activan el factor de crecimiento (Hrs). La proteína Hrs de células de humano, está involucrada en la formación de cuerpos MVB y regulación del factor de

crecimiento de hepatocitos. En 2010, Lopez-Reyes, et al. 2012 reportó la expresión de la proteína homóloga a Hrs en *E. histolytica* en tiempos basales y 5 min de fagocitosis. Esta proteína es miembro del complejo ESCRT-0, y es denominada EhVps27. Posiblemente, está involucrada en los mismos mecanismos celulares que el LBPA.

En las células de mamífero, el LBPA participa en la distribución de moléculas cargo desde el endosoma tardío hacia el lisosoma o el aparato de Golgi. El aparato de Golgi de *E. histolytica* no está completamente caracterizado, sin embargo, Saito-Nakano y colaboradores encontraron que la proteína EhRab7A está involucrada en el tráfico vesicular después de 30 minutos de fagocitosis y controla el transporte de los endosomas tardío a la red del *trans*-Golgi (Saito-Nakano, et al. 2007). El hecho de encontrar al LBPA asociado con EhRAB7A en fagosomas multivesiculares que contienen vesículas intraluminales, sostiene la hipótesis de que ambas moléculas están involucradas en la formación y función de los endosomas.

## **El LBPA está asociado a la proteína EhADH en condiciones basales y durante la fagocitosis**

En células de mamífero, se ha reportado la asociación del LBPA con la proteína Alix durante las fases tardía de la endocitosis (Luquain *et al.*, 2000) y durante la penetración de algunos virus a las células huésped (Bissig *et al.*, 2013); esta interacción fosfolípido-proteína es a través del dominio Bro1 localizado en el extremo N-terminal de las proteínas Alix (Bissig *et al.*, 2013). También se sabe que ambas moléculas participan en la distribución del colesterol y en el direccionamiento de partículas cargo para ser recicladas o digeridas por el lisosoma (Kobayashi *et al.*, 2000).

En *E. histolytica*, el LBPA y EhADH co-localizan tanto en condiciones basales, como en procesos endocíticos; además, ensayos de inmunoprecipitación usando los anticuerpos 6C4 y anti-EhADH confirmaron la asociación de ambas moléculas. La interacción LBPA-EhADH en condiciones basales puede estar relacionada con la activa endocitosis constitutiva que presentan los trofozoítos, o también, se podría explicar por la participación de las moléculas en otras funciones celulares, como el transporte intracelular de colesterol.

Durante la fagocitosis, la proteína EhADH participa como receptor de los eritrocitos que serán internalizados y a su vez, participa en la formación de fagosomas (García-Rivera, et al., 1999). El dominio de adhesión a las células huésped se localiza en el extremo c-terminal de la proteína (Martínez-López, et al. 2004). Además, a través de su dominio Bro1, la proteína EhADH se une a diferentes moléculas involucradas en la fagocitosis, como la EhVps32 (Bañuelos, et al., 2012).

Mediante *docking* molecular, pudimos predecir que el EhLBPA interactúa con la proteína EhADH a través de su dominio Bro1, como ha sido reportado en otros sistemas. De manera interesante, la estructura 3D de EhADH mostró el sitio de unión al EhLBPA situado en un *loop* similar al descrito en la proteína Alix de humanos (Bissig, et al., 2013). Sin embargo, nuestros experimentos computacionales también revelaron un sitio de unión en el dominio de adhesión de EhADH con una energía libre mayor al sitio de unión a través del dominio Bro1. Debido a que ambas moléculas podrían estar involucradas en más de un evento celular, es necesario realizar más estudios experimentales para definir los sitios de unión de EhADH con el fosfolípido y a su vez, las condiciones celulares que generan dicha asociación molecular.



Nuestros resultados aquí descritos, nos permiten sugerir que el LBPA de *E. histolytica* es un componente activo del sistema endo/lisosomal de los trofozoítos y que también podría participar directamente en la virulencia de la amiba, al igual que las proteínas del complejo ESCRT, EhVps4 y EhADH. Es bien conocido que *E. histolytica* aumenta su virulencia cuando se incuba con alto contenido de colesterol (Sharma 1954); (Serrano-Luna, et al. 2010). La reciente caracterización de las moléculas del complejo ESCRT, Ehvps4 y EhADH que participan en el sistema endo/lisosomal de amiba y están asociadas a la virulencia de la misma (Bañuelos, et al., 2012); (Lopez-Reyes, et al., 2010), refuerzan la importancia del estudio del metabolismo de los lípidos, así como de la homeostasis y la contribución del colesterol en este sistema.

Con la identificación del LBPA, podemos sugerir que al asociarse con la EhADH, en conjunto con los otros miembros del sistema ESCRT, podrían controlar la formación de MVB; y que en las etapas tardías de la vía, es muy probable que el LBPA junto con la EhADH y la NPC2, se lleve a cabo el reciclaje de moléculas y de esta manera, probablemente se regularía la incorporación del colesterol a las membranas de vesículas endo/lisomales para su posterior transporte hacia otros destinos celulares.

En general, este trabajo contribuye al entendimiento del tráfico endo/lisosomal de *E. histolytica*, incluyendo por primera vez, la característica estructural de un gliceroglicerofosfolípido y su posible participación en mecanismos moleculares que se relacionan con la virulencia de la amiba.

## CONCLUSIONES

- EL LBPA está presente en la composición de lípidos de *E. histolytica*.
- Se encontraron al menos seis especies moleculares de LBPA, siendo la más abundante la de 800 *m/z* (18:1/20:2).
- El LBPA se localiza en vesículas ácidas.
- El LBPA se asocia con la proteína EhRab7A durante la fagocitosis.
- El LBPA tiene una participación dinámica durante la endocitosis, principalmente en las fases tardías de la pinocitosis y fagocitosis.
- El LBPA se asocia con la proteína EhADH en condiciones basales y durante los procesos de fagocitosis.
- La interacción del LBPA con el dominio Bro1 de las proteínas de la familia Alix está conservado en *E. histolytica*.

## PERSPECTIVAS

- Confirmar experimentalmente la asociación del LBPA con el dominio Bro1 y el dominio de adhesión de EhADH, así como las condiciones celulares que inducen dicha interacción.
- Determinar la interacción del LBPA con las proteínas NPC1 y NPC2.
- Determinar las especies moleculares de LBPA que participan en los eventos de endocitosis y distribución celular del colesterol.
- Identificar y caracterizar las enzimas que participan en la síntesis de los glicerofosfolípidos.
- Caracterizar la función del LBPA bloqueando la molécula o en su caso, silenciando alguna de las enzimas de síntesis identificadas en el punto anterior durante procesos endocíticos y los eventos de distribución celular del colesterol.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, A. and J. A. Shayman

2009 The role of negatively charged lipids in lysosomal phospholipase A2 function. *J Lipid Res* 50(10):2027-2035.

Ackers, John P. and David Mirelman

2006 Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* 9(4):367-373.

Alanko, S. M., K. K. Halling, S. Maunula, J. P. Slotte and B. Ramstedt

2005 Displacement of sterols from sterol/sphingomyelin domains in fluid bilayer membranes by competing molecules. *Biochim Biophys Acta* 1715(2):111-121.

Aley, S. B., Z. A. Cohn and W. A. Scott

1984 Endocytosis in *Entamoeba histolytica*. Evidence for a unique non-acidified compartment. *J Exp Med* 160(3):724-737.

Aley, S. B., W. A. Scott and Z. A. Cohn

1980 Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 152(2):391-404.

Amidon, B., J. D. Schmitt, T. Thuren, L. King and M. Waite

1995 Biosynthetic conversion of phosphatidylglycerol to sn-1:sn-1' bis(monoacylglycerol) phosphate in a macrophage-like cell line. *Biochemistry* 34(16):5554-5560.

Arroyo, Rossana and Esther Orozco

1987 Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Molecular and Biochemical Parasitology* 23(2):151-158.

Attar, N. and P. J. Cullen

2010 The retromer complex. *Adv Enzyme Regul* 50(1):216-236.

Avalos-Padilla, Y., A. Betanzos, R. Javier-Reyna, G. Garcia-Rivera, B. Chavez-Munguia, A. Lagunes-Guillen, J. Ortega and E. Orozco

2015 EhVps32 Is a Vacuole-Associated Protein Involved in Pinocytosis and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog* 11(7):e1005079.

Azmi, Ishara, Brian Davies, Christian Dimaano, Johanna Payne, Debra Eckert, Markus Babst and David J. Katzmann

2006 Recycling of ESCRTs by the AAA-ATPase Vps4 is regulated by a conserved VSL region in Vta1. *The Journal of Cell Biology* 172(5):705-717.

Babst, Markus

2005 A Protein's Final ESCRT. *Traffic* 6(1):2-9.

Babst, Markus, David J. Katzmann, Eden J. Estepa-Sabal, Timo Meerloo and Scott D. Emr

2002 Escrt-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Developmental Cell* 3(2):271-282.

Babst, Markus, Beverly Wendland, Eden J. Estepa and Scott D. Emr

1998 *The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function* 17.

Bache, Kristi G., Camilla Raiborg, Anja Mehlum and Harald Stenmark

2003 STAM and Hrs Are Subunits of a Multivalent Ubiquitin-binding Complex on Early Endosomes. *Journal of Biological Chemistry* 278(14):12513-12521.

Banuelos, C., G. Garcia-Rivera, I. Lopez-Reyes, L. Mendoza, A. Gonzalez-Robles, S. Herranz, O. Vincent and E. Orozco

2012 EhADH112 is a Bro1 domain-containing protein involved in the *Entamoeba histolytica* multivesicular bodies pathway. *J Biomed Biotechnol* 2012:657942.

Bañuelos, C., G. García-Rivera, I. López-Reyes and E. Orozco

2005 Functional characterization of EhADH112: An *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein. *Experimental Parasitology* 110(3):292-297.

Besson, N., F. Hullin-Matsuda, A. Makino, M. Murate, M. Lagarde, J. F. Pageaux, T. Kobayashi and I. Delton-Vandenbroucke

2006 Selective incorporation of docosahexaenoic acid into lysobisphosphatidic acid in cultured THP-1 macrophages. *Lipids* 41(2):189-196.

Bissig, C., M. Lenoir, M. C. Velluz, I. Kufareva, R. Abagyan, M. Overduin and J. Gruenberg

2013 Viral infection controlled by a calcium-dependent lipid-binding module in ALIX. *Dev Cell* 25(4):364-373.

Boettner, D. R., C. D. Huston, J. A. Sullivan and W. A. Petri, Jr.

2005 *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* utilize externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of erythrocytes. *Infect Immun* 73(6):3422-3430.

Bos, H. J. and R. J. van de Griend

1977 Virulence and toxicity of axenic *Entamoeba histolytica*. *Nature* 265(5592):341-343.

Bouvier, J., K. A. Zemski Berry, F. Hullin-Matsuda, A. Makino, S. Michaud, A. Geloën, R. C. Murphy, T. Kobayashi, M. Lagarde and I. Delton-Vandenbrouck

2009 Selective decrease of bis(monoacylglycero)phosphate content in macrophages by high supplementation with docosahexaenoic acid. *J Lipid Res* 50(2):243-255.

Bowers, K., J. Lottridge, S. B. Helliwell, L. M. Goldthwaite, J. P. Luzio and T. H. Stevens

2004 Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 5(3):194-210.

Brotherus, J., O. Renkonen, W. Fischer and J. Herrmann

1974 Novel stereoconfiguration in lyso-bis-phosphatidic acid of cultured BHK-cells. *Chem Phys Lipids* 13(2):178-182.

Byekova, Y. A., R. R. Powell, B. H. Welter and L. A. Temesvari

2010 Localization of phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate to phagosomes in entamoeba histolytica achieved using glutathione S-transferase- and green fluorescent protein-tagged lipid biosensors. *Infect Immun* 78(1):125-137.

cBredeston, L. M., C. E. Caffaro, J. Samuelson and C. B. Hirschberg

2005 Golgi and endoplasmic reticulum functions take place in different subcellular compartments of Entamoeba histolytica. *J Biol Chem* 280(37):32168-32176.

Chevallier, J., Z. Chamoun, G. Jiang, G. Prestwich, N. Sakai, S. Matile, R. G. Parton and J. Gruenberg

2008 Lysobisphosphatidic acid controls endosomal cholesterol levels. *J Biol Chem* 283(41):27871-27880.

Chevallier, J., N. Sakai, F. Robert, T. Kobayashi, J. Gruenberg and S. Matile

2000 Rapid access to synthetic lysobisphosphatidic acids using P(III) chemistry. *Org Lett* 2(13):1859-1861.

Chu, Z., D. P. Witte and X. Qi

2005 Saposin C-LBPA interaction in late-endosomes/lysosomes. *Exp Cell Res* 303(2):300-307.

Conner, Sean D. and Sandra L. Schmid

2003 Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422(6927):37-44.

Davies, J. P. and Y. A. Ioannou

2000 Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is



identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein. *J Biol Chem* 275(32):24367-24374.

Delton-Vandenbroucke, I., J. Bouvier, A. Makino, N. Besson, J. F. Pageaux, M. Lagarde and T. Kobayashi

2007 Anti-bis(monoacylglycero)phosphate antibody accumulates acetylated LDL-derived cholesterol in cultured macrophages. *J Lipid Res* 48(3):543-552.

Denzer, K., M. van Eijk, M. J. Kleijmeer, E. Jakobson, C. de Groot and H. J. Geuze

2000 Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol* 165(3):1259-1265.

Diamond, Louis S., Dan R. Harlow and Carol C. Cunnick

1978 A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72(4):431-432.

Ellson, C. D., S. Gobert-Gosse, K. E. Anderson, K. Davidson, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. W. Thuring, M. A. Cooper, Z. Y. Lim, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, J. Coadwell, E. R. Chilvers, P. T. Hawkins and L. R. Stephens

2001 PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). *Nat Cell Biol* 3(7):679-682.

Faust, D. M., J. Marquay Markiewicz, A. Danckaert, G. Soubigou and N. Guillen

2011 Human liver sinusoidal endothelial cells respond to interaction with *Entamoeba histolytica* by changes in morphology, integrin signalling and cell death. *Cell Microbiol* 13(7):1091-1106.

Field, M. C. and J. B. Dacks

2009 First and last ancestors: reconstructing evolution of the endomembrane system with ESCRTs, vesicle coat proteins, and nuclear pore complexes. *Curr Opin Cell Biol* 21(1):4-13.

Flores-Soto, E., E. Azuara-Liceaga, C. Lopez-Camarillo and E. Orozco

2005 The *Entamoeba histolytica* Ehcp112 gene has a distal and weak promoter. *Exp Parasitol* 110(3):286-291.

Frederick, T. E., J. N. Chebukati, C. E. Mair, P. C. Goff and G. E. Fanucci

2009 Bis(monoacylglycerol)phosphate forms stable small lamellar vesicle structures: insights into vesicular body formation in endosomes. *Biophys J* 96(5):1847-1855.

G., Body D. and Grey

1967 The isolation of phosphatidylglycerol and a structural isomer from pig lung. *Biochim Biophys Acta* 1:253-263.

Gagescu, R., J. Gruenberg and E. Smythe

2000 Membrane dynamics in endocytosis: structure--function relationship. *Traffic* 1(1):84-88.

Galve-de Rochemonteix, B., T. Kobayashi, C. Rosnoblet, M. Lindsay, R. G. Parton, G. Reber, E. de Maistre, D. Wahl, E. K. Kruithof, J. Gruenberg and P. de Moerloose

2000 Interaction of anti-phospholipid antibodies with late endosomes of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(2):563-574.

García-Rivera, G., M. A. Rodríguez, R. Ocádiz, M. C. Martínez-López, R. Arroyo, A. González-Robles and E. Orozco

1999 *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular Microbiology* 33(3):556-568.

Gillooly, D. J., I. C. Morrow, M. Lindsay, R. Gould, N. J. Bryant, J. M. Gaullier, R. G. Parton and H. Stenmark

2000 Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *Embo j* 19(17):4577-4588.

Godbold, G. D. and B. J. Mann

1998 Involvement of the actin cytoskeleton and p21rho-family GTPases in the pathogenesis of the human protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Braz J Med Biol Res* 31(8):1049-1058.

Goursot, A., T. Mineva, C. Bissig, J. Gruenberg and D. R. Salahub

2010 Structure, dynamics, and energetics of lysobisphosphatidic acid (LBPA) isomers. *J Phys Chem B* 114(47):15712-15720.

Gruenberg, J.

2001 The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(10):721-730.

2003 Lipids in endocytic membrane transport and sorting. *Curr Opin Cell Biol* 15(4):382-388.

Gruenberg, J. and F. R. Maxfield

1995 Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7(4):552-563.

Gruenberg, J. and H. Stenmark

2004 The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(4):317-323.

Guerrant, R. L., J. Brush, J. I. Ravdin, J. A. Sullivan and G. L. Mandell

1981 Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis* 143(1):83-93.

Haque, R., C. D. Huston, M. Hughes, E. Houpt and W. A. Petri, Jr.

2003 Amebiasis. *N Engl J Med* 348(16):1565-1573.

Hayakawa, T., Y. Hirano, A. Makino, S. Michaud, M. Lagarde, J. F. Pageaux, A. Doutheau, K. Ito, T. Fujisawa, H. Takahashi and T. Kobayashi

2006 Differential membrane packing of stereoisomers of bis(monoacylglycero)phosphate. *Biochemistry* 45(30):9198-9209.

Hiraoka, M., A. Abe, Y. Lu, K. Yang, X. Han, R. W. Gross and J. A. Shayman

2006 Lysosomal phospholipase A2 and phospholipidosis. *Mol Cell Biol* 26(16):6139-6148.

Holbrook, P. G., L. K. Pannell, Y. Murata and J. W. Daly

1992 Bis(monoacylglycero)phosphate from PC12 cells, a phospholipid that can comigrate with phosphatidic acid: molecular species analysis by fast atom bombardment mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 1125(3):330-334.

Hullin-Matsuda, F., K. Kawasaki, I. Delton-Vandenbroucke, Y. Xu, M. Nishijima, M. Lagarde, M. Schlame and T. Kobayashi

2007 De novo biosynthesis of the late endosome lipid, bis(monoacylglycero)phosphate. *J Lipid Res* 48(9):1997-2008.

Huterer, S. and J. Wherrett

1979 Metabolism of bis(monoacylglycero)phosphate in macrophages. *J Lipid Res* 20(8):966-973.

Infante, R. E., M. L. Wang, A. Radhakrishnan, H. J. Kwon, M. S. Brown and J. L. Goldstein

2008 NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(40):15287-15292.

Ito, Takashi, Tomoko Chiba, Ritsuko Ozawa, Mikio Yoshida, Masahira Hattori and Yoshiyuki Sakaki

2001 A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(8):4569-4574.

Jacobs, Thomas, Iris Bruchhaus, Thomas Dandekar, Egbert Tannich and Matthias Leippe

1998 Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology* 27(2):269-276.

Jenkins, R. W., D. Canals and Y. A. Hannun

2009 Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell Signal* 21(6):836-846.

Jost, M., F. Simpson, J. M. Kavran, M. A. Lemmon and S. L. Schmid

1998 Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Curr Biol* 8(25):1399-1402.

Joutti, A., J. Brotherus, O. Renkonen, R. Laine and W. Fischer

1976 The stereochemical configuration of lysobisphosphatidic acid from rat liver, rabbit lung and pig lung. *Biochim Biophys Acta* 450(2):206-209.

Kakela, R., P. Somerharju and J. Tyynela

2003 Analysis of phospholipid molecular species in brains from patients with infantile and juvenile neuronal-ceroid lipofuscinosis using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Neurochem* 84(5):1051-1065.

Kamura, Takumi, Dennis Burian, Hamed Khalili, Susan L. Schmidt, Shigeo Sato, Wen-Jun Liu, Michael N. Conrad, Ronald C. Conaway, Joan Weliky Conaway and Ali Shilatifard

2001 Cloning and Characterization of ELL-associated Proteins EAP45 and EAP20: A ROLE FOR YEAST EAP-LIKE PROTEINS IN REGULATION OF GENE EXPRESSION BY GLUCOSE. *Journal of Biological Chemistry* 276(19):16528-16533.

Katiyar, S. K., A. K. Prasad, S. Ghoshal, S. R. Das and P. Sagar

1987 Cholesterol induced changes in glucose-6-phosphate generating enzymes, concanavalin A agglutinability and haemolytic activity of axenic *Entamoeba histolytica*. *Ann Trop Med Parasitol* 81(3):201-205.

Katoh, K., H. Shibata, K. Hatta and M. Maki

2004 CHMP4b is a major binding partner of the ALG-2-interacting protein Alix among the. *Arch Biochem Biophys* 421(1):159-165.

Katzmann, D. J., M. Babst and S. D. Emr

2001 Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the. *Cell*. 106(2):145-155.

Katzmann, David J., Greg Odorizzi and Scott D. Emr

2002 Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12):893-905.

Keene, W. E., M. E. Hidalgo, E. Orozco and J. H. McKerrow

1990 Entamoeba histolytica: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. *Exp Parasitol* 71(2):199-206.

Kim, Jaewon, Sujatha Sitaraman, Aitor Hierro, Bridgette M. Beach, Greg Odorizzi and James H. Hurley

2005 Structural Basis for Endosomal Targeting by the Bro1 Domain. *Developmental Cell* 8(6):937-947.

Kobayashi, Toshihide, Marie-Hélène Beuchat, Julien Chevallier, Asami Makino, Nathalie Mayran, Jean-Michel Escola, Cecile Lebrand, Pierre Cosson, Tetsuyuki Kobayashi and Jean Gruenberg

2002 Separation and Characterization of Late Endosomal Membrane Domains. *Journal of Biological Chemistry* 277(35):32157-32164.

Kobayashi, Toshihide, Marie-Helene Beuchat, Margaret Lindsay, Sonia Frias, Richard D. Palmiter, Hitoshi Sakuraba, Robert G. Parton and Jean Gruenberg

1999 Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol* 1(2):113-118.

Kobayashi, Toshihide, Espen Stang, Karen S. Fang, Philippe de Moerloose, Robert G. Parton and Jean Gruenberg

1998 A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392(6672):193-197.

Kobayashi, Toshihide, Konstantin Startchev, J. Whitney Andrew and Jean Gruenberg

2001 Localization of Lysobisphosphatidic Acid-Rich Membrane Domains in Late Endosomes. In *Biological Chemistry*, pp. 483. vol. 382.

Kolter, T. and K. Sandhoff

2005 Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:81-103.

Kolter, T., F. Winau, U. E. Schaible, M. Leippe and K. Sandhoff

2005 Lipid-binding proteins in membrane digestion, antigen presentation, and antimicrobial defense. *J Biol Chem* 280(50):41125-41128.

Kwon, H. J, L. Abi-Mosleh, M. L. Wang, J. Deisenhofer, J. L. Goldstein, M. S. Brown and R. E. Infante

2009 Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell* 137(7):1213-1224.

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.

Lange, Y., J. Ye and T. L. Steck

2005 Activation of membrane cholesterol by displacement from phospholipids. *J Biol Chem* 280(43):36126-36131.

Laughlin, R. C., G. C. McGugan, R. R. Powell, B. H. Welter and L. A. Temesvari

2004 Involvement of raft-like plasma membrane domains of *Entamoeba histolytica* in pinocytosis and adhesion. *Infect Immun* 72(9):5349-5357.

Laughlin, Richard C. and Lesly A. Temesvari

2005 Cellular and molecular mechanisms that underlie *Entamoeba histolytica* pathogenesis: prospects for intervention. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 7(13):1-19.

Le Blanc, I., P. P. Luyet, V. Pons, C. Ferguson, N. Emans, A. Petiot, N. Mayran, N. Demaurex, J. Faure, R. Sadoul, R. G. Parton and J. Gruenberg

2005 Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol* 7(7):653-664.

Leippe, M.

1992 Membrane perforation by *Entamoeba histolytica*: structural implications derived from the sequence of the pore-forming peptide. *Arch Med Res* 23(2):35-37.

Leippe, Matthias, Heike Bruhn, Oliver Hecht and Joachim Gräßlitzinger

2005 Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. *Trends in Parasitology* 21(1):5-7.

Leventis, P. A. and S. Grinstein

2010 The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys* 39:407-427.

Linke, T., G. Wilkening, S. Lansmann, H. Moczall, O. Bartelsen, J. Weisgerber and K. Sandhoff

2001 Stimulation of acid sphingomyelinase activity by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *Biol Chem* 382(2):283-290.

Linke, T., G. Wilkening, F. Sadeghlar, H. Moczall, K. Bernardo, E. Schuchman and K. Sandhoff



2001 Interfacial regulation of acid ceramidase activity. Stimulation of ceramide degradation by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *J Biol Chem* 276(8):5760-5768.

Loftus, S. K., J. A. Morris, E. D. Carstea, J. Z. Gu, C. Cummings, A. Brown, J. Ellison, K. Ohno, M. A. Rosenfeld, D. A. Tagle, P. G. Pentchev and W. J. Pavan

1997 Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science* 277(5323):232-235.

Long-Krug, S. A., K. J. Fischer, R. M. Hysmith and J. I. Ravdin

1985 Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. *J Infect Dis* 152(3):536-541

Lopez-Reyes, I., G. Garcia-Rivera, C. Banuelos, S. Herranz, O. Vincent, C. Lopez-Camarillo, L. A. Marchat and E. Orozco

2010 Detection of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport in *Entamoeba histolytica* and Characterization of the EhVps4 Protein. *J Biomed Biotechnol* 2010:890674.

Lottridge, Jillian M., Andrew R. Flannery, Jennifer L. Vincelli and Tom H. Stevens

2006 Vta1p and Vps46p regulate the membrane association and ATPase activity of Vps4p at the yeast multivesicular body. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(16):6202-6207.

Luquain, C., R. Dolmazon, J. M. Enderlin, C. Laugier, M. Lagarde and J. F. Pageaux

2000 Bis(monoacylglycerol) phosphate in rat uterine stromal cells: structural characterization and specific esterification of docosaheptaenoic acid. *Biochem J* 351 Pt 3:795-804.

Luyet, P. P., T. Falguieres, V. Pons, A. K. Pattnaik and J. Gruenberg

2008 The ESCRT-I subunit TSG101 controls endosome-to-cytosol release of viral RNA. *Traffic* 9(12):2279-2290.

Maki, M., Y. Kitaura, H. Satoh, S. Ohkouchi and H. Shibata

2002 Structures, functions and molecular evolution of the penta-EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1600(1-2):51-60.

Makino, A., K. Ishii, M. Murate, T. Hayakawa, Y. Suzuki, M. Suzuki, K. Ito, T. Fujisawa, H. Matsuo, R. Ishitsuka and T. Kobayashi

2006 D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol alters cellular cholesterol homeostasis by modulating the endosome lipid domains. *Biochemistry* 45(14):4530-4541.

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.

Marion, S., C. Laurent and N. Guillen

2005 Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cell Microbiol* 7(10):1504-1518.

Martínez-López, Carolina, Esther Orozco, Tomás Sánchez, Rosa María García-Pérez, Fidel Hernández-Hernández and Mario A. Rodríguez

2004 The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cellular Microbiology* 6(4):367-376.

Martínez-Palomo, A. (editor) 1982 *The biology of Entamoeba histolytica*. John Wiley and Sons G.B.

Mason, R. J., T. P. Stossel and M. Vaughan

1972 Lipids of alveolar macrophages, polymorphonuclear leukocytes, and their phagocytic vesicles. *J Clin Invest* 51(9):2399-2407.

Matsuo, H., J. Chevallier, N. Mayran, I. Le Blanc, C. Ferguson, J. Faure, N. S. Blanc, S. Matile, J. Dubochet, R. Sadoul, R. G. Parton, F. Vilbois and J. Gruenberg

2004a Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 303(5657):531-534.

2004b Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science*. 303(5657):531-534.

Matsuzawa, Y., B. J. Poorthuis and K. Y. Hostetler

1978 Mechanism of phosphatidylinositol stimulation of lysosomal bis (monoacylglyceryl)phosphate synthesis. *J Biol Chem* 253(19):6650-6653.

Maxfield, F. R. and T. E. McGraw

2004 Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(2):121-132.

mCochran, F. R., V. L. Roddick, J. R. Connor, J. T. Thornburg and M. Waite

1987 Regulation of arachidonic acid metabolism in resident and BCG-activated alveolar macrophages: role of lyso(bis)phosphatidic acid. In *J Immunol*, pp. 1877-1883. 1987/03/15 ed. vol. 138.

Megha and E. London

2004 Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. *J Biol Chem* 279(11):9997-10004.

Meza, I. and M. Clarke

2004 Dynamics of endocytic traffic of *Entamoeba histolytica* revealed by confocal microscopy and flow cytometry. *Cell Motil Cytoskeleton* 59(4):215-226.

Mitra, B. N., Y. Saito-Nakano, K. Nakada-Tsukui, D. Sato and T. Nozaki

2007 Rab11B small GTPase regulates secretion of cysteine proteases in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 9(9):2112-2125.

Mobius, W., E. van Donselaar, Y. Ohno-Iwashita, Y. Shimada, H. F. Heijnen, J. W. Slot and H. J. Geuze

2003 Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic* 4(4):222-231.

Morel, E. and J. Gruenberg

2009 Annexin A2 binding to endosomes and functions in endosomal transport are regulated by tyrosine 23 phosphorylation. *J Biol Chem* 284(3):1604-1611.

Mortuza, G. B., W. A. Neville, J. Delaney, C. J. Waterfield and P. Camilleri

2003 Characterisation of a potential biomarker of phospholipidosis from amiodarone-treated rats. *Biochim Biophys Acta* 1631(2):136-146.

Nickas, M. E. and M. P. Yaffe

1996 BRO1, a novel gene that interacts with components of the Pkc1p-mitogen-activated protein kinase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16(6):2585-2593.

Nielsen, E., S. Christoforidis, S. Uttenweiler-Joseph, M. Miaczynska, F. Dewitte, M. Wilm, B. Hoflack and M. Zerial

2000 Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *J Cell Biol* 151(3):601-612.

Ocádiz, Ramón, Esther Orozco, Eduardo Carrillo, Laura Itzel Quintas, Jaime Ortega-López, Rosa María García-Pérez, Tomas Sánchez, Beatriz A. Castillo-Juárez, Guillermina García-Rivera and Mario A. Rodríguez

2005 EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cellular Microbiology* 7(2):221-232.

Odorizzi, G., M. Babst and S. D. Emr

1998a Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell*. 95(6):847-858.

1998b Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* 95(6):847-858.

Odorizzi, G., D. J. Katzmann, M. Babst, A. Audhya and S. D. Emr

2003 Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 116(Pt 10):1893-1903.

Okada, M. and T. Nozaki

2006 New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Arch Med Res* 37(2):244-252.

Olivos-Garcia, A., E. Saavedra, E. Ramos-Martinez, M. Nequiz and R. Perez-Tamayo

2009 Molecular nature of virulence in *Entamoeba histolytica*. *Infect Genet Evol* 9(6):1033-1037.

Orozco, E., G. Guarneros, A. Martínez-Palomo and T. Sánchez

1983 *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med.* 158(5):1511-1521.

Petri, W. A., Jr.

2002 Pathogenesis of amebiasis. *Curr Opin Microbiol* 5(4):443-447.

Petri, W. A., Jr., M. P. Joyce, J. Broman, R. D. Smith, C. F. Murphy and J. I. Ravdin

1987 Recognition of the galactose- or N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba histolytica* by human immune sera. *Infect Immun* 55(10):2327-2331.

Petri, W. A., Jr., R. D. Smith, P. H. Schlesinger, C. F. Murphy and J. I. Ravdin

1987 Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* 80(5):1238-1244.

Pichler, H. and H. Riezman

2004 Where sterols are required for endocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1666(1-2):51-61.

Piper, R. C. and D. J. Katzmann

2007 Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23:519-547.

Pitt, A., L. S. Mayorga, P. D. Stahl and A. L. Schwartz

1992 Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J Clin Invest* 90(5):1978-1983.

Pons, J., N. Evrard-Todeschi, G. Bertho, J. Gharbi-Benarous, V. Tanchou, R. Benarous and J. P. Girault

2008 Transfer-NMR and docking studies identify the binding of the peptide derived from activating transcription factor 4 to protein ubiquitin ligase beta-TrCP. Competition STD-NMR with beta-catenin. *Biochemistry* 47(1):14-29.

Powell, R. R., B. H. Welter, R. Hwu, B. Bowersox, C. Attaway and L. A. Temesvari

2006 *Entamoeba histolytica*: FYVE-finger domains, phosphatidylinositol 3-phosphate biosensors, associate with phagosomes but not fluid filled endosomes. *Exp Parasitol* 112(4):221-231.

Rabinovitch, M.

1995 Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 5(3):85-87.

Ragland, B. D., L. S. Ashley, D. L. Vaux and W. A. Petri, Jr.

1994 *Entamoeba histolytica*: target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2. *Exp Parasitol* 79(3):460-467.

Raiborg, Camilla, Tor Erik Rusten and Harald Stenmark

2003 Protein sorting into multivesicular endosomes. *Current Opinion in Cell Biology* 15(4):446-455.

Ralston, K. S. and W. A. Petri, Jr.

2011 Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol* 27(6):254-263.

Raymond, C K, I Howald-Stevenson, C A Vater and T H Stevens

1992 Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Molecular Biology of the Cell* 3(12):1389-1402.

Reggiori, F. and H. R. Pelham

2001 Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and. *EMBO J.* 20(18):5176-5186.

Rodriguez, M. A., F. Hernandez, L. Santos, A. Valdez and E. Orozco

1989 *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Mol Biochem Parasitol* 37(1):87-99.

Rodriguez, M. A. and E. Orozco

1986 Isolation and characterization of phagocytosis- and virulence-deficient mutants of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 154(1):27-32.

2000 Characterization of the EhRabB recombinant protein of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 31(4 Suppl):S171-172.

Rodríguez, Mario Alberto, Fidel Hernández, Leopoldo Santos, Amelia Valdez and Esther Orozco

1989 *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Molecular and Biochemical Parasitology* 37(1):87-99.

Rodriguez-Paris, J. M., K. V. Nolta and T. L. Steck

1993 Characterization of lysosomes isolated from *Dictyostelium discoideum* by magnetic fractionation. *J Biol Chem* 268(12):9110-9116.

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.

Russell, M. R., D. P. Nickerson and G. Odorizzi

2006 Molecular mechanisms of late endosome morphology, identity and sorting. *Curr Opin Cell Biol.* 18(4):422-428.

Saito-Nakano, Y., B. J. Loftus, N. Hall and T. Nozaki

2005 The diversity of Rab GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* 110(3):244-252.

Saito-Nakano, Y., B. N. Mitra, K. Nakada-Tsukui, D. Sato and T. Nozaki

2007 Two Rab7 isoforms, EhRab7A and EhRab7B, play distinct roles in biogenesis of lysosomes and phagosomes in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 9(7):1796-1808.

Saito-Nakano, Y., T. Yasuda, K. Nakada-Tsukui, M. Leippe and T. Nozaki

2004 Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* 279(47):49497-49507.

Sateriale, A. and C. D. Huston

2011 A Sequential Model of Host Cell Killing and Phagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *J Parasitol Res* 2011:926706.

Sawyer, M. K., J. M. Bischoff, M. A. Guidry and R. E. Reeves

1967 Lipids from *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* 20(3):295-302.



Sbrissa, D., O. C. Ikononov, R. Deeb and A. Shisheva

2002 Phosphatidylinositol 5-phosphate biosynthesis is linked to PIKfyve and is involved in osmotic response pathway in mammalian cells. *J Biol Chem* 277(49):47276-47284.

Schaible, U. E., P. H. Schlesinger, T. H. Steinberg, W. F. Mangel, T. Kobayashi and D. G. Russell

1999 Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. *J Cell Sci* 112 ( Pt 5):681-693.

Schu, P. V., K. Takegawa, M. J. Fry, J. H. Stack, M. D. Waterfield and S. D. Emr

1993 Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 260(5104):88-91.

Scott, Anna, Hyoâ€ Young Chung, Malgorzata Gonciarzâ€ Swiatek, Gina C Hill, Frank G Whitby, Jason Gaspar, James M Holton, Ramya Viswanathan, Sanaz Ghaffarian, Christopher P Hill and Wesley I Sundquist

2005 *Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins* 24

Sengupta, K., V. I. Hernandez-Ramirez, J. L. Rosales-Encina, R. Mondragon, O. L. Garibay-Cerdenares, D. Flores-Robles, R. Javier-Reyna, S. Pertuz and P. Talamas-Rohana

2009 Physical, structural, and functional properties of the beta1 integrin-like fibronectin receptor (beta1EhFNR) in *Entamoeba histolytica*. *Infect Genet Evol* 9(5):962-970.

Serrano-Luna, J., M. Gutierrez-Meza, R. Mejia-Zepeda, S. Galindo-Gomez, V. Tsutsumi and M. Shibayama

2010 Effect of phosphatidylcholine-cholesterol liposomes on *Entamoeba histolytica* virulence. *Can J Microbiol* 56(12):987-995.

Shen, D., X. Wang and H. Xu

2011 Pairing phosphoinositides with calcium ions in endolysosomal dynamics: phosphoinositides control the direction and specificity of membrane trafficking by regulating the activity of calcium channels in the endolysosomes. *Bioessays* 33(6):448-457.

Shin, H. W., M. Hayashi, S. Christoforidis, S. Lacas-Gervais, S. Hoepfner, M. R. Wenk, J. Modregger, S. Uttenweiler-Joseph, M. Wilm, A. Nystuen, W. N. Frankel, M. Solimena, P. De Camilli and M. Zerial

2005 An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J Cell Biol* 170(4):607-618.

Shisheva, A.

2008 PIKfyve: Partners, significance, debates and paradoxes. *Cell Biol Int* 32(6):591-604.

Simonsen, A., R. Lippe, S. Christoforidis, J. M. Gaullier, A. Brech, J. Callaghan, B. H. Toh, C. Murphy, M. Zerial and H. Stenmark

1998 EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 394(6692):494-498.

Sobo, K., J. Chevallier, R. G. Parton, J. Gruenberg and F. G. van der Goot

2007 Diversity of raft-like domains in late endosomes. *PLoS One* 2(4):e391.

Sobo, K., I. Le Blanc, P. P. Luyet, M. Fivaz, C. Ferguson, R. G. Parton, J. Gruenberg and F. G. van der Goot

2007 Late endosomal cholesterol accumulation leads to impaired intra-endosomal trafficking. *PLoS One* 2(9):e851.

Stanley, S. L., Jr., A. Becker, C. Kunz-Jenkins, L. Foster and E. Li

1990 Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(13):4976-4980.

Stauffer, D. R., T. L. Howard, T. Nyun and S. M. Hollenberg

2001 CHMP1 is a novel nuclear matrix protein affecting chromatin structure and. *J Cell Sci.* 2001 114(13):2383-2393.

Stenmark, H., R. Aasland, B. H. Toh and A. D'Arrigo

1996 Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J Biol Chem* 271(39):24048-24054.

Stinchcombe, J., G. Bossi and G. M. Griffiths

2004 Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes. *Science.* 305(5680):55-59.

Storch, J. and Z. Xu

2009 Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochim Biophys Acta* 1791(7):671-678.

Strack, Bettina, Arianna Calistri, Stewart Craig, Elena Popova and Heinrich G. Goettlinger

2003 AIP1/ALIX Is a Binding Partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 Functioning in Virus Budding. *Cell* 114(6):689-699.

Tachibana, H., X. J. Cheng, H. Tsukamoto and J. Itoh

2009 Characterization of *Entamoeba histolytica* intermediate subunit lectin-specific human monoclonal antibodies generated in transgenic mice expressing human immunoglobulin loci. *Infect Immun* 77(1):549-556.

Takai, Y., T. Sasaki and T. Matozaki

2001 Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81(1):153-208.

Tanyuksel, M. and W. A. Petri, Jr.

2003 Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 16(4):713-729.

Tay, Lara (editor) 1998 *Parasitología Clínica.*

Thery, C., S. Amigorena, G. Raposo and A. Clayton

2006 Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3:Unit 3.22.

Tong, J., P. P. Borbat, J. H. Freed and Y. K. Shin

2009 A scissors mechanism for stimulation of SNARE-mediated lipid mixing by cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(13):5141-5146.

Trombetta, E. S. and I. Mellman

2005 Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol.* 23:975-1028.

Vajjhala, Parimala R., Elizabeth Catchpoole, Chau H. Nguyen, Carol Kistler and Alan L. Munn

2007 Vps4 regulates a subset of protein interactions at the multivesicular endosome. *FEBS Journal* 274(8):1894-1907.

Valenzuela, O., P. Moran, A. Gomez, K. Cordova, N. Corrales, J. Cardoza, N. Gomez, M. Cano and C. Ximenez

2007 epidemiology of amoebic liver abscess in Mexico: the case of Sonora. *Ann Trop Med Parasitol* 101(6):533-538.

van der Goot, F. G. and J. Gruenberg

2006 Intra-endosomal membrane traffic. *Trends Cell Biol* 16(10):514-521.

Vieira, O. V., R. E. Harrison, C. C. Scott, H. Stenmark, D. Alexander, J. Liu, J. Gruenberg, A. D. Schreiber and S. Grinstein

2004 Acquisition of Hrs, an essential component of phagosomal maturation, is impaired by mycobacteria. *Mol Cell Biol* 24(10):4593-4604.

Vito, P., L. Pellegrini, C. Guet and L. D'Adamio

1999 Cloning of AIP1, a novel protein that associates with the apoptosis-linked gene. *J Biol Chem.* 274(3):1533-1540.

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.

Von Schwedler, Uta K., Melissa Stuchell, Barbara MÃ¼ller, Diane M. Ward, Hyo-Young Chung, Eiji Morita, Hubert E. Wang, Thaylon Davis, Gong-Ping He, Daniel M. Cimbora, Anna Scott, Hans-Georg KrÃ¼sslich, Jerry Kaplan, Scott G. Morham and Wesley I. Sundquist

2003 The Protein Network of HIV Budding. *Cell* 114(6):701-713.

Waite, M., L. King, T. Thornburg, G. Osthoff and T. Y. Thuren

1990 Metabolism of phosphatidylglycerol and bis(monoacylglycerol)-phosphate in macrophage subcellular fractions. *J Biol Chem* 265(35):21720-21726.

Waite, M., V. Roddick, T. Thornburg, L. King and F. Cochran

1987 Conversion of phosphatidylglycerol to lyso(bis)phosphatidic acid by alveolar macrophages. *Faseb j* 1(4):318-325.

Watari, H., E. J. Blanchette-Mackie, N. K. Dwyer, J. M. Glick, S. Patel, E. B. Neufeld, R. O. Brady, P. G. Pentchev and J. F. Strauss, 3rd

1999 Niemann-Pick C1 protein: obligatory roles for N-terminal domains and lysosomal targeting in cholesterol mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(3):805-810.

Welter, B. H., R. C. Laughlin and L. A. Temesvari

2002 Characterization of a Rab7-like GTPase, EhRab7: a marker for the early stages of endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 121(2):254-264.

Wherrett, J. R. and S. Huterer

1973 Bis-(monoacylglycerol)-phosphate of rat and human liver: fatty acid composition and NMR spectroscopy. *Lipids* 8(9):531-533.

Wickner, W.

2010 Membrane fusion: five lipids, four SNAREs, three chaperones, two nucleotides, and a Rab, all dancing in a ring on yeast vacuoles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:115-136.

Worby, C. A. and J. E. Dixon

2002 Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12):919-931.

Wubbolts, R., R. S. Leckie, P. T. Veenhuizen, G. Schwarzmann, W. Mobius, J. Hoernschemeyer, J. W. Slot, H. J. Geuze and W. Stoorvogel

2003 Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 278(13):10963-10972.

Xu, Y., H. Hortsman, L. Seet, S. H. Wong and W. Hong

2001 SNX3 regulates endosomal function through its PX-domain-mediated interaction with PtdIns(3)P. *Nat Cell Biol* 3(7):658-666.

Xu, Z., W. Farver, S. Kodukula and J. Storch

2008 Regulation of sterol transport between membranes and NPC2. *Biochemistry* 47(42):11134-11143.

Yeo, S. C., L. Xu, J. Ren, V. J. Boulton, M. D. Wagle, C. Liu, G. Ren, P. Wong, R. Zahn, P. Sasajala, H. Yang, R. C. Piper and A. L. Munn

2003 Vps20p and Vta1p interact with Vps4p and function in multivesicular body sorting. *J Cell Sci.* 116(19):3957-3970.